

**TESE DE DOUTORADO**

**Impacto da estimulação  
eletroconvulsiva em vias de  
sinalização intracelular**

**Daniela Valadão Freitas Rosa**

**Orientador: Dr. Marco Aurélio Romano-Silva**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BELO HORIZONTE – DEZEMBRO/2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Daniela Valadão Freitas Rosa**

# **Impacto da estimulação eletroconvulsiva em vias de sinalização intracelular**

Tese de Doutorado submetida ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor(a) em Farmacologia.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Romano-Silva

**Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil  
2009**

“A mente humana é como pára-quedas:  
só funciona quando aberta.”

Elzi Nascimento

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)

Dedico esta tese aos meus pais.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Marco Aurélio pela confiança e credibilidade. Uma vez ouvi você dizer que aluno de doutorado deve ficar um tempo fora do país. Obrigada por ter incentivado. Só é possível ter a dimensão exata das mudanças, quando vivenciadas. Vivenciar toda a sua competência e respeito é uma grande aprendizagem. Você é um exemplo de pesquisador e é um prazer ser sua aluna! Muito obrigada!!!

Ao Prof. Marcus Vinícius, ao Prof. Luiz Armando De Marco, ao Prof. Marco Antônio Máximo Prado, ao Prof. Helton Reis e a Prof.<sup>a</sup> Wolfanga pela oportunidade de conviver com pesquisadores como vocês.

Aos alunos de iniciação científica, em especial ao Fabrício, pela paciência, atenção e por aguentarem com tanto carinho as “brigas” da tia Dany.

Ao Prof. João Quevedo e sua equipe, pela confiança e parceria.

Ao Renan, anjo da minha vida. Uma vez ouvi que “é melhor sermos extraordinários juntos, do que normais sozinhos”. Você é extraordinário sozinho e faz com que as pessoas percebam que também podem ser. Tenho o prazer de dividir a minha vida com você e não tem como definir o quão importante você é. Vou sentir muita falta do dia-a-dia ao seu lado. Desejo felicidade e sucesso sempre. Te amo muito!

Aos amigos do laboratório de Neurofarmacologia, Farmacologia Bioquímica e Molecular e Neurociência, presentes e passados, Alexandre Barros, Alexandre Magno, Alessandra Souza, Ana Cristina Pinheiro, Ana Cristina Magalhães, André Sampaio, Bernardo Motta, Bruno Rezende, Célio Castro, Cristina Martins, Daniel Carneiro, Danusa, Débora Miranda, Elizabete Miranda, Fabíola Ribeiro, Fabiana Caetano, Fabrício Lima, Fernando Caetano, Guilherme Pimenta, Janice Silva, Juliana Drummond, Juliana Garcia, Karen Torres, Livia Paulineli, Luciana Bastos, Luciene Vieira, Lucimar Teodoro, Maria Aparecida, ou melhor, Cidinha, Melissa Guimarães, Patrícia, Paulo Henrique, Paulo Melillo, Rodrigo Nicolato, Vítor. Na convivência acabamos adquirindo peculiaridades daqueles que nos rodeiam. Vocês fazem parte das minhas conquistas. Obrigada!

Ao Prof. Albert Wong, pela oportunidade e por disponibilizar a estrutura do laboratório durante o ano de 2009.



À Laura, pela amizade e paciência. Dividimos várias manhãs no Toronto Centre for Phenogenomics, e vários finais de semana “descobrimos” os detalhes de Toronto. Muito obrigada!!!

À Nipa, por dividir todos os experimentos desde a minha chegada, com a maior paciência possível.

À Mawahib, sempre atenciosa e disposta a ajudar. Obrigada por me lembrar sempre o quão prazeroso pode ser dividir experiências. Foi muito agradável dividir este ano com vocês!!!

Ao Frankie, Marc e Jean, pelo agradável convívio.

Aos meus irmãos, tia Vera e tio Omar, pelo apoio incondicional e por compreenderem a “distância”. A força, alegria e o incentivo de vocês foram fundamentais. A contribuição de cada um, com suas respectivas características, sempre foi importante para as minhas conquistas. Amo vocês !!!

À tia Aninha, por ser um eterno incentivo. Você sempre foi minha irmã, disposta a lutar pelo meu bem estar e crescimento. Te admiro e te amo muito!!! Muito obrigada!

Aos tios, primos, amigos e todos aqueles que, de certa forma, fazem parte desta conquista, cada um com sua participação, mas incentivando sempre.

À Carol, por me mostrar sempre que amizades verdadeiras são possíveis. Obrigada por estar sempre “por perto”.

À Sabrina, pelo apoio e carinho.

À Larissa, por aguentar todas as minhas oscilações de humor. Não tenho dúvida do seu carinho. Muito obrigada!

Aos meus pais, alicerces da minha vida, que contribuem sempre para que eu seja esta pessoa que vocês conhecem. Exemplos de profissionalismo, respeito e dignidade. Amo vocês mais que tudo !!!!

Ao Ricardo, pela compreensão, respeito e amor. Teremos muitos casos para contar e seja bem-vindo ao meu “infinito particular”.

À Deus, pela vida !!!

## Sumário

|                                           |                   |
|-------------------------------------------|-------------------|
| <b><i>Lista de abreviaturas</i></b> ..... | <b><i>V</i></b>   |
| <b><i>Lista de figuras</i></b> .....      | <b><i>VII</i></b> |
| <b><i>Lista de tabelas</i></b> .....      | <b><i>IX</i></b>  |
| <b><i>Resumo</i></b> .....                | <b><i>X</i></b>   |
| <b><i>Abstract</i></b> .....              | <b><i>XII</i></b> |

## **1. Introdução**

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 Eletroconvulsoterapia .....                                     | 2  |
| 1.1.1 Alterações estruturais após estimulação eletroconvulsiva..... | 7  |
| 1.2 Transmissão dopaminérgica .....                                 | 10 |
| 1.3 DARPP-32 .....                                                  | 14 |
| 1.4 Apoptose.....                                                   | 21 |
| 1.5 Akt .....                                                       | 24 |
| 1.6 GSK-3.....                                                      | 26 |
| 1.7 Bcl-2 e Bad .....                                               | 28 |

## **2. Objetivos**

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 2.1 Objetivo geral .....       | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 31 |

## **3. Material e Métodos**

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Aparato de estimulação eletroconvulsiva e soluções..... | 33 |
| 3.1.1 Aparato de estimulação eletroconvulsiva .....         | 33 |
| 3.1.2 Solução de lise .....                                 | 33 |

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 3.1.3 Solução de Bradford .....             | 33 |
| 3.1.4 Tampão de amostra para SDS-PAGE ..... | 34 |
| 3.1.5 Tampão para eletroforese .....        | 34 |
| 3.1.6 Tampão de transferência .....         | 34 |
| 3.1.7 Ponceau .....                         | 34 |
| 3.1.8 PBS 10X .....                         | 34 |
| 3.1.9 TBS 10X .....                         | 35 |
| 3.2 Experimento em modelo animal .....      | 35 |
| 3.3 Dosagem de proteínas .....              | 36 |
| 3.4 Imunoblots .....                        | 36 |
| 3.5 Análise dos imunoblots .....            | 38 |
| 3.6 Análise estatística .....               | 38 |

#### **4. Resultados**

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 Efeito da EEC aguda na expressão da DARPP e fosfo-Thr <sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado .....                                                                     | 41 |
| 4.2 Efeito da EEC crônica na expressão da DARPP e fosfo-Thr <sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado .....                                                                   | 42 |
| 4.3 Efeito da EEC na expressão de DARPP-32 no hipocampo .....                                                                                                                      | 44 |
| 4.4 Efeito da EEC na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr <sup>308</sup> , Bad, fosfo-Bad-Ser <sup>136</sup> , GSK-3, fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser <sup>9</sup> no córtex pré-frontal ..... | 45 |
| 4.5 Efeito da EEC na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr <sup>308</sup> , Bad, fosfo-Bad-Ser <sup>136</sup> , GSK-3, fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser <sup>9</sup> no estriado .....           | 48 |

|                                                                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.6 Efeito da EEC na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr <sup>308</sup> , Bad, fosfo-Bad-Ser <sup>136</sup> ,<br>GSK-3, fosfo-GSK-3β-Ser <sup>9</sup> no hipocampo ..... | 51         |
| <b>5. Discussão.....</b>                                                                                                                                             | <b>57</b>  |
| <b>6. Conclusão.....</b>                                                                                                                                             | <b>80</b>  |
| <b>7. Referências bibliográficas.....</b>                                                                                                                            | <b>83</b>  |
| <b>8. Anexo 1 - .....</b>                                                                                                                                            | <b>107</b> |

## 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                        |
| Bcl-2    | Célula B de linfoma 2                                |
| BDNF     | Fator neurotrófico derivado do cérebro               |
| cDNA     | Ácido desoxiribonucleico complementar                |
| Cdk-5    | Quinase dependente de ciclina 5                      |
| CK       | Caseína quinase                                      |
| COMT     | Catecol-O-metil-transferase                          |
| 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 desoxiribonucleico                             |
| dNTP     | Desoxiribonucleotídeo trifosfato                     |
| EEC      | Estimulação eletroconvulsiva                         |
| ECT      | Eletroconvulsoterapia                                |
| FGF-2    | Fator de crescimento para fibroblasto                |
| GABA     | Ácido $\gamma$ -aminobutírico                        |
| GRK2     | Proteína quinase 2 acoplada à proteína G             |
| L-DOPA   | 3,4-dihidroxifenilalanina                            |
| LTD      | Depressão de longa duração                           |
| LTP      | Potencial de longa duração                           |
| MAO      | Monoamino oxidase                                    |
| NMDA     | N-metil-D-aspartato                                  |
| NGF      | Fator de crescimento neuronal                        |

|      |                                       |
|------|---------------------------------------|
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| PBS  | Tampão fosfato salino                 |
| PKA  | Proteína quinase A                    |
| PKB  | Proteína quinase B                    |
| PKG  | Proteína quinase G                    |
| PP   | Proteína fosfatase                    |
| RNA  | Ácido ribonucleico                    |
| SDS  | Dodecil sulfato de sódio              |
| SNC  | Sistema nervoso central               |
| Ser  | Serina                                |
| TH   | Tirosina hidroxilase                  |
| Thr  | Treonina                              |
| VMAT | Transportador vesicular de monoaminas |

## Lista de figuras

|                   |                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Vias de síntese e degradação da dopamina.....                                                                                                                               | 08 |
| <b>Figura 2:</b>  | Modulação da adenilato ciclase mediada por receptores dopaminérgicos                                                                                                        | 09 |
| <b>Figura 3:</b>  | Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos .....                                                                                                                 | 11 |
| <b>Figura 4:</b>  | Sítos de fosforilação da DARPP-32 .....                                                                                                                                     | 12 |
| <b>Figura 5:</b>  | Mecanismos de integração envolvidos na sinalização dopaminérgica e glutamatérgica via cascatas quinase/fosfatase.....                                                       | 13 |
| <b>Figura 6:</b>  | Níveis de DARPP-32 e fosfo-Thr <sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado após EEC aguda .....                                                                          | 17 |
| <b>Figura 7:</b>  | Níveis de DARPP-32 e fosfo-Thr <sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado após EEC crônica.....                                                                         | 17 |
| <b>Figura 8:</b>  | Níveis de DARPP-32 no hipocampo após EEC aguda e crônica .....                                                                                                              | 26 |
| <b>Figura 9:</b>  | Níveis de Akt, fosfo-Akt-Thr <sup>308</sup> , Bad, fosfo-Bad-Ser <sup>136</sup> , GSK-3β, fosfo-GSK-3β-Ser <sup>9</sup> no córtex pré-frontal após EEC aguda e crônica..... | 27 |
| <b>Figura 10:</b> | Níveis de Akt, fosfo-Akt-Thr <sup>308</sup> , Bad, fosfo-Bad-Ser <sup>136</sup> , GSK-3β, fosfo-GSK-3β-Ser <sup>9</sup> no estriado após EEC aguda e crônica.....           | 27 |
| <b>Figura 11:</b> | Níveis de Akt, fosfo-Akt-Thr <sup>308</sup> , Bad, fosfo-Bad-Ser <sup>136</sup> , GSK-3β, fosfo-GSK-3β-Ser <sup>9</sup> no hipocampo após EEC aguda e crônica.....          | 27 |



|                   |                                                                                                       |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 12:</b> | Níveis de proteicos e de RNAm de DARPP-32 em cérebros de ratos ...                                    | 31 |
| <b>Figura 13:</b> | Vias pelas quais a transmissão serotoninérgica pode regular o estado de fosforilação da DARPP-32..... | 32 |

## Lista de tabelas

|                  |                                                                                     |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> | Valores estatisticamente significativos após estimulação eletroconvulsiva.<br>..... | 54 |
| <b>Tabela 2:</b> | Tabela resultados. ....                                                             | 55 |

# Resumo

Conhecidos há aproximadamente 2500 anos, os transtornos do humor continuam a dominar o interesse da saúde pública. Cerca de 5% dos pacientes com depressão não respondem a qualquer medida farmacológica e/ou psicoterápica. Para esses pacientes, a eletroconvulsoterapia (ECT) constitui uma importante oportunidade de melhora.

Devido às dificuldades na identificação dos mecanismos de ação da ECT, têm-se usado a estimulação eletroconvulsiva (EEC) aplicada experimentalmente a animais com o intuito de obter dados que contribuam para explicar alguns efeitos terapêuticos da ECT. Há relatos de alteração nos níveis da proteína DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina), proteína relevante na sinalização dopaminérgica, em pacientes com transtornos neuropsiquiátricos, mas busca-se compreender os mecanismos de sinalização afetados pela EEC.

Neste trabalho foram avaliados os níveis de expressão das proteínas DARPP-32, pDARPP-32 Thr<sup>34</sup>, Akt, pAkt Thr<sup>308</sup>, GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, Bad, pBad Ser<sup>136</sup> em três regiões cerebrais (estriado, córtex pré-frontal e hipocampo) de ratos submetidos à estimulação eletroconvulsiva aguda e crônica. A estimulação eletroconvulsiva aguda não gerou aumento na expressão de DARPP-32, pDARPP-32 Thr<sup>34</sup>, Akt, pAkt Thr<sup>308</sup>, Bad em nenhuma das regiões analisadas. Também não houve alterações de GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, no córtex pré-frontal e estriado. Houve alterações na expressão de GSK-3 $\beta$  e pBad Ser<sup>136</sup>, no hipocampo, após estimulação aguda. Tais resultados corroboram a ausência de eficácia dessa terapêutica de modo agudo usualmente.

Com a exceção de Bad e GSK-3 $\beta$ , no córtex pré-frontal e estriado, a estimulação crônica provocou alterações significativas em todas as áreas estudadas, o que está de acordo com a utilização de repetidas sessões desta técnica na clínica. Tais dados mostram uma maior eficiência da terapia crônica em relação à aguda e uma dinâmica temporal que favorece a aplicação da técnica num intervalo de 2-3 dias (tempo pelo qual manteve-se os níveis elevados das proteínas).

Estudos da sinalização dopaminérgica e apoptótica são importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos clínicos e adversos da ECT.

# **Abstract**

Known for more than 2500 years, mood disorders continue to dominate the interest of public health. About 5% of the patients with depression do not answer to any pharmacologic and/or psychotherapy measure. For these patients, the electroconvulsive therapy (ECT) constitutes an important chance of improvement.

Had to difficulties in the identification of ECT mechanisms of action, it has been used the electroconvulsive stimulation (ECS), applied experimentally in animals. It has been shown alteration in protein levels, like DARPP-32 (phosphoprotein regulated by cAMP and dopamine), a central protein in dopaminergic signaling.

We analyzed the expression levels of DARPP-32, pDARPP-32 Thr<sup>34</sup>, Akt, pAkt Thr<sup>308</sup>, GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, Bad, pBad Ser<sup>136</sup> in three brain areas (striatum, prefrontal cortex and hippocampus) of rats submitted to acute and chronic electroconvulsive stimulation. Acute electroconvulsive stimulation did not generate increase in the expression of DARPP-32, pDARPP-32 Thr<sup>34</sup>, Akt, pAkt Thr<sup>308</sup>, Bad in none of the analyzed regions. Also it did not have alterations of GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, in striatum and prefrontal cortex. It had alterations in the expression of GSK-3 $\beta$  and pBad Ser<sup>136</sup>, in hippocampus, after acute stimulation. Such results usually corroborate the absence of effectiveness on acute stimulation.

With the exception of Bad and GSK-3 $\beta$ , in prefrontal cortex and striatum, chronic stimulation provoked significant alterations in all brain areas studied, what it is in accordance with the use of repeated sessions of this technique. Such data show to a bigger efficiency of chronic therapy in relation to acute and a temporal dynamics that the application of the technique in a 2-3 interval days.

Studies of dopaminergic and apoptotic signaling are important for the understanding of the involved mechanisms in the clinical and adverse effect of the ECT.

# **1-Introdução**

## 1.1 - Eletroconvulsoterapia

As primeiras décadas do século XX presenciaram uma revolução no tratamento das doenças mentais. Antes disto, pessoas com psicoses eram usualmente colocadas em hospícios. Embora reformadores médicos bem intencionados, como Phillipe Pinel, tenham melhorado as condições dos sanatórios, nenhum tratamento era executado. A primeira revolução no tratamento foi colocada em movimento pela psicoterapia, baseada nas teorias da mente propostas pelo médico austríaco Sigmund Freud. Seu valor foi principalmente observado em transtornos mentais moderados, particularmente neuroses. No início de 1930, esses métodos começaram a ser suplementados por abordagens físicas usando drogas, terapia eletroconvulsiva e cirurgia. Entre 1917 e 1935, quatro métodos para produzir convulsões foram descobertos, testados e usados na prática psiquiátrica:

- febre induzida por malária, para tratar neurosífilis (Viena, Julius Wagner-Jauregg, em 1917);
- coma e convulsões induzidas por insulina, para tratar esquizofrenia (Berlim, Manfred J. Sakel, em 1927);
- convulsões induzidas por metrazol, para tratar esquizofrenia e psicoses afetivas (Budapeste por Ladislaus von Meduna, em 1934);
- terapia por choque eletroconvulsivo (Roma, Ugo Cerletti e Lucio Bini em 1938).

Cerletti descobriu que os choques elétricos gerados na eletroconvulsoterapia (ECT) transformava os pacientes difíceis e obsessivos em dóceis e controláveis (Royal College of Psychiatrists, 1989). O uso desta técnica difundiu-se rapidamente e nas duas primeiras



décadas do século XX houve uma progressiva aceitação e refinamento na aplicação. Inicialmente, a ECT era realizada com o paciente consciente, sem uso de anestesia ou relaxante muscular. Havia perda da consciência durante a aplicação da corrente, e os pacientes apresentavam contrações musculares incontroláveis e, com frequência, quebravam ossos, especialmente vértebras, e apresentavam distensão muscular devido às convulsões violentas induzidas pelo choque. Em 1939, Walter Freeman sugeriu que o curare poderia ser usado para reduzir as taxas de fraturas associadas à ECT, e em seguida logo se incorporou o uso sistemático de anestésicos gerais.

A partir dos anos 60, com o desenvolvimento de medicações eficazes para o tratamento de transtornos mentais e o movimento anti-psiquiátrico, a necessidade e uso da ECT diminuíram, mas não desapareceu. Uma queda de 46%, no uso da ECT, entre os anos de 1975 e 1980 foi demonstrada em um levantamento do National Institute of Mental Health, EUA (Busnello e cols., 1995).

Atualmente, a técnica é um procedimento pelo qual convulsões generalizadas, com duração de 25 a 250 segundos, são induzidas pela passagem de uma corrente elétrica através do cérebro, sob anestesia geral e relaxamento muscular, utilizada com finalidade terapêutica. Avanços no tratamento têm permitido uma redução dos efeitos adversos, principalmente cognitivos (NIH & NIMH Consensus Conference, 1985; Rudorfer e cols., 1997), sendo classificado como um método terapêutico eficaz, seguro, internacionalmente reconhecido e aceito, cuja prática requer consentimento informado, obtido do paciente para que se inicie o tratamento (Resolução CFM Nº 1.640/2002).

A ECT tem sido considerada efetiva no tratamento da depressão, mania e esquizofrenia (American Psychiatric Association, 1990; Abrams, 1992; Potter e Rudorfer, 1993). Não se trata de terapêutica de exceção por existirem indicações precisas e específicas (Resolução CFM No 1.640/2002), sendo mais freqüentemente utilizada no tratamento da depressão. Torna-se especialmente indicada quando uma resposta clínica rápida é essencial em pacientes gravemente doentes, quando há história de resposta positiva à ECT, ou há refratariedade ou intolerância à medicação, além de situações em que o paciente ou a família requerem o uso da técnica (Sackeim, 1994).

A aplicação da técnica muitas vezes é decisiva para a vida do paciente, evitando o suicídio por tratar com grande eficácia a depressão grave (The UK ECT Review Group, 2003). Cerca de 5% dos pacientes deprimidos não respondem a qualquer medida farmacológica e/ou psicoterápica (Post, 1999). Para esses pacientes, a ECT constitui uma importante oportunidade de melhora. Além disso, quadros depressivos graves com sintomas psicóticos respondem melhor a ECT que à farmacoterapia (Pande e cols., 1990; Parker e cols., 1992; The UK ECT Review Group, 2003). Estudos demonstram que a utilização da ECT diminui o tempo de internação e custos com o tratamento (Olfson e cols., 1998), dados relevantes considerando a realidade de saúde pública do Brasil. Foi demonstrado eficácia entre 85 e 90% nos casos de depressão maior, comparando-se, medicações antidepressivas são eficazes em 60-65% dos casos (Shergill S., 2001).

Os problemas na identificação dos mecanismos de ação da ECT recaem no fato de que esta afeta inúmeras vias no sistema nervoso central (SNC), além da dificuldade de definir-se neuroquimicamente as doenças para as quais é empregada. Dessa forma, a estimulação eletroconvulsiva (EEC), aplicada experimentalmente a animais tem sido amplamente utilizada como um modelo de ECT (Green e Nutt, 1987).

Os efeitos moleculares da EEC são diversos e compreendem aumento nos níveis de neurotransmissores, neuropeptídeos e remodelagem sináptica (Fochtmann e cols., 1994). Os experimentos com EEC crônicos têm mostrado efeito nas monoaminas cerebrais (Modigh, 1975). A EEC promove um aumento na transmissão serotoninérgica no hipotálamo induzindo dessensibilização dos autorreceptores pré-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub> (Dremencov e cols., 2002), provavelmente, tendo o sistema serotoninérgico como um dos alvos de sua ação nos transtornos do humor.

O tratamento com EEC aumenta a concentração de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR), principalmente nos interneurônios inibitórios do hipocampo (Smialowska e cols., 2002) o que pode estar relacionado com o aumento da concentração do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) em várias regiões cerebrais (Wiclosz e cols., 1985; Nutt e cols., 1981; Sanacora e cols., 2003). Ambos sistemas de neurotransmissores, provavelmente, também estão relacionados ao efeito antidepressivo da ECT.

Evidências sugerem que a EEC altera as concentrações de neurotrofinas em algumas regiões do cérebro. Os fatores neurotróficos são proteínas que estão envolvidas na

sobrevivência neuronal e plasticidade de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos no SNC e, provavelmente, exercem importante papel na fisiopatologia e tratamento da depressão (Angelucci e cols., 2003), caracterizando um alvo importante no mecanismo de ação da ECT.

No hipocampo, a EEC mostrou-se capaz de reverter a atrofia encontrada nesta região em pacientes depressivos (Smith e cols., 1995). Os mecanismos propostos para tal melhora são a regulação de fatores neurotróficos (Duman e Vaidya, 1998) e o aumento da neurogênese hipocampal (Jacobs e cols., 2000; Malberg e cols., 2000), aumentando a expressão de RNAm do fator de crescimento neuronal (NGF) (Follesa e cols., 1994), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e dos receptores de BDNF no sistema límbico (Nibuya e cols., 1995).

EEC pode prevenir apoptose neuronal induzida por ácido kaínico (Kondratyev e cols., 2001), diminuir a morte neuronal (Busnello e cols., 2006), e neutralizar a inibição, induzida por corticosterona, da neurogênese e gliogênese (Hellsten e cols., 2002; Wennstrom e cols., 2006) no hipocampo.

Além disso, relata-se proliferação glial no córtex frontal de ratos após repetidas EECs (Madsen e cols., 2005). A ação trófica da EEC é associada com ativação das cascatas de sinalização de sobrevivência celular. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) são supra-regulados por EEC (Nibuya e cols., 1995; Kondratyev e cols., 2001; Newton e cols., 2003), e EEC afeta

sinalização pró-sobrevivência relacionada à quinase regulada por sinalização extracelular (ERK), PKA e proteína quinase B (também denominada como Akt) (Kang e cols., 2006; Altar e cols., 2004). Sobrevivência e proliferação de células neuronais requerem não apenas ativação da sinalização de sobrevivência, mas também inibição da atividade da sinalização apoptótica. Então, a EEC pode afetar sinais apoptóticos para bloquear a morte celular, além de ter efeitos positivos na sinalização de sobrevivência (Raff e cols., 1993).

O fator de crescimento para o fibroblasto (FGF-2) está implicado na diferenciação de células progenitoras de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, sendo encontrado, também, na formação de novas sinapses, além de ter um efeito neuroprotetor. Após convulsões induzidas por EEC, ocorre um aumento na expressão de RNAm para FGF-2 no hipocampo, que permanece por muitas horas após a convulsão (Cole e cols., 1990).

#### 1.1.1 – Alterações estruturais após estimulação eletroconvulsiva

Sugere-se que problemas com proteínas envolvidas na matriz estrutural das sinapses (como as sinapsinas) podem ocorrer na esquizofrenia, uma das indicações da ECT, levando a um número reduzido de vesículas sinápticas, formação sináptica aberrante e retardo ou redução na formação das sinapses (Stahl, 2002). Estímulos elétricos induzem a ativação de proteínas de regulação associadas ao citoesqueleto. A sinapsina é uma destas proteínas e é fosforilada por várias proteínas quinases. A EEC induz uma mudança bidirecional na fosforilação da sinapsina. Imediatamente após a convulsão, ocorre um

rápido aumento na desfosforilação da sinapsina, o que implica uma maior rigidez na organização da actina-citoesqueleto, que modula a liberação de vesículas sinápticas. Esse fato impede que ocorra uma liberação maciça de neurotransmissores na fenda sináptica, provocada pela EEC, promovendo assim, um efeito protetor. No entanto, alguns minutos após a convulsão, ocorre um aumento na fosforilação da sinapsina, desaparecendo a rede de actina, aumentando a liberação de neurotransmissores e, possivelmente, induzindo plasticidade neuronal, tal como uma reorganização sináptica (Kondratyev e cols., 2001).

A entrada excessiva de cálcio dá início a várias cascatas intracelulares que acarretam a destruição da célula. Sugere-se que um desequilíbrio na concentração de cálcio possa estar relacionado à disfunção da memória, relatada por pacientes submetidos à ECT. Estudos utilizando bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  reforçam esta idéia, visto que, com o uso de bloqueadores destes canais, houve melhora na performance dos ratos nos testes de memória, em relação aos animais que não utilizaram estes bloqueadores (Lisanby e cols., 2000).

Além disso, outras alterações bioquímicas como o aumento da expressão de um grande número de genes, incluindo genes de expressão imediata, subunidades de canais de potássio e receptores foram relatadas (Burnet e cols., 1995; Chen e cols., 1995; Cole e cols., 1990; Pej e cols. 1997; Smith e cols., 1995).

Relatam-se experimentos realizados em amostras pós-morte de cérebro de indivíduos com esquizofrenia, onde a expressão de proteínas moduladoras da sinalização celular

foram investigadas. Ressalta-se que, em trabalho publicado em 2002 no *Archives of General Psychiatry* pelo grupo de Paul Greengard (Albert e cols., 2002), foi avaliada a expressão de DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina – peso molecular 32kDa) e de outras proteínas neuronais, analisadas por imunoblot em amostras pós-morte de cérebros de indivíduos esquizofrênicos, que tiveram idade, sexo e tempo de autólise pareados com controles, sendo a área de interesse a região dorsolateral do córtex pré-frontal. Foram pareados também indivíduos em uso de neurolépticos mas não esquizofrênicos, nesse caso com Doença de Alzheimer, com a finalidade de afastar possíveis influências do uso das medicações utilizadas. Assim, demonstraram que a DARPP-32 estava significativamente reduzida na região dorsolateral do córtex pré-frontal em mais esquizofrênicos que indivíduos controles pareados. As demais proteínas estudadas, sinapsina I e subunidade alfa da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, não estavam alteradas. Feldcamp e cols (2008) analisaram a expressão de DARPP-32 em amostras *post-mortem* de cérebros de pacientes com esquizofrenia que morreram por suicídio e acharam diminuição da expressão de RNAm para DARPP-32 associado ao suicídio em pacientes com esquizofrenia.

Sabe-se que proteínas envolvidas na regulação eletrofisiológica, transcricional, apoptose, respostas comportamentais a estímulos fisiológicos e farmacológicos, incluindo antidepressivos, neurolépticos e dependência de drogas são de extrema importância. Através da expressão destas, busca-se entender se a ECT causa algum tipo de alteração no sistema nervoso central que, possivelmente, possa reverter quadros de transtornos psiquiátricos (Svenningsson, 2004; Hanlon e Wallace, 2002).

## 1.2- Transmissão dopaminérgica

A dopamina ( $C_8H_{11}NO_2$ ), até a metade da década de 1950, era considerada exclusivamente um precursor intermediário da biossíntese de outros neurotransmissores, como epinefrina e norepinefrina. Diferenças marcantes na distribuição regional de dopamina e norepinefrina levaram investigadores suecos, na década de 1960, a propor um papel biológico específico (Carlsson e cols, 1958; Carlsoon e Waldeck, 1958).

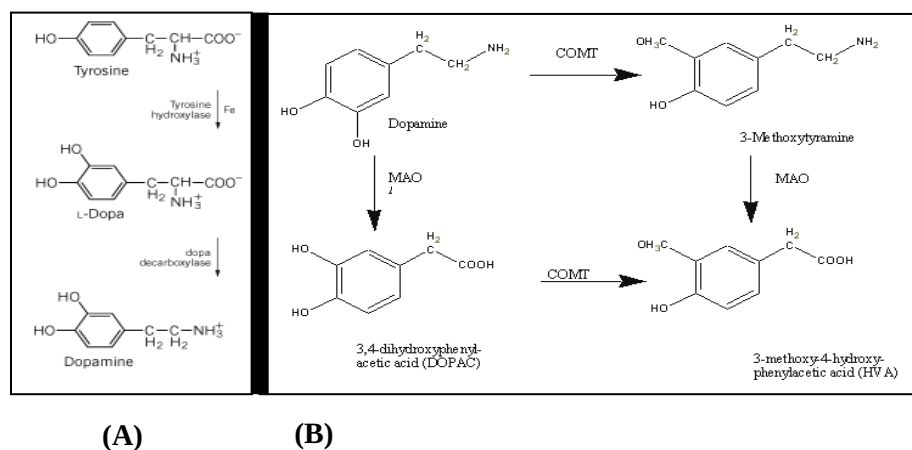
Diferente de outros sistemas de neurotransmissão, a dopamina se distribui de maneira circunscrita (Glenthoj, 1995) no SNC e também no sistema nervoso periférico. As principais projeções são simplificadaamente apresentadas a seguir:

- 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;
- 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;
- via nigroestriatal - projeta-se dos corpos celulares da substância negra do mesencéfalo por meio de axônios que terminam nos gânglios da base ou estriado;
- via túbero-infundibular- projeta do hipotálamo para a glândula pituitária anterior.



A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico sintetizado a partir da tirosina por duas reações sequenciais catalizadas pelas enzimas tirosina hidroxilase (TH) (formação de 3,4-dihidroxifenilalanina ou L-DOPA) e descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (AAAD) (Figura 1A). 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 contendo o neurotransmissor fundem-se à membrana do neurônio pré-sináptico, após influxo de cálcio pelos canais de cálcio sensíveis a voltagem (Staal e cols., 2004).

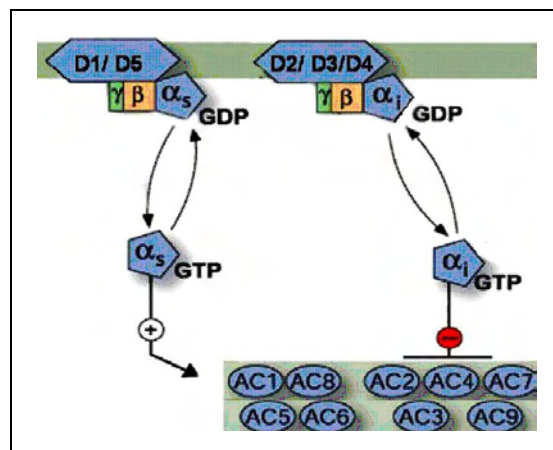
Após a liberação e interação da dopamina com receptores pós-sinápticos específicos ocorre a recaptação pelo transportador de dopamina (DAT) e posterior degradação, no citosol, em produtos inativos (figura 1B) pela monoamino oxidase (MAO) e pela catecol-O-metil-transferase (COMT). Esses produtos são 3-metoxitiramina, ácido diidroxifenilacético e o ácido homovanílico (Thorpe e cols., 1987)



**Figura 1:** Vias de síntese (1A) e degradação (1B) da dopamina

Os efeitos dopaminérgicos são exercidos pela ligação com receptores pré e pós-sinápticos. Em 1966, Van Rossum já apresentava tais receptores como importantes pontos modulatórios da via dopaminérgica e distúrbios a ela relacionados. Até 1990, acreditava-se que existiam somente dois tipos de receptores: D1 e D2. 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).

Os receptores do tipo D1 são acoplados a proteína  $G_s\alpha/G_{olf}\alpha$  (figura 2) que ativam a adenilato ciclase (AC) resultando no aumento dos níveis intracelulares do AMPc, já os do tipo D2 estão acoplados a  $G_i\alpha/G_o\alpha$  gerando inativação desta enzima e redução dos níveis de AMPc (Missale e cols., 1998; Vallone e cols., 2000).



**Figura 2:** Modulação da adenilato ciclase (AC) mediada por receptores dopaminérgicos (GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato)

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).

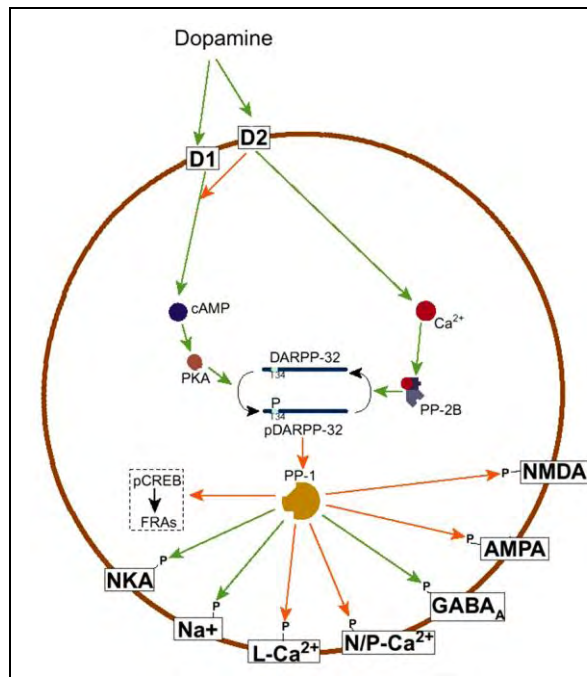
Disfunções desse neurotransmissor estão relacionadas com diversos transtornos neuropsiquiátricos. Estudos demonstrando que a maior parte da dopamina cerebral está confinada aos gânglios basais levaram a hipótese que essa estaria envolvida com o controle motor e que uma diminuição dos níveis estriatais dessa amina poderia ser a causa de sintomas extrapiramidais na doença de Parkinson (Kish e cols., 1988). A descoberta de profundas reduções de dopamina no estriado de pacientes com Parkinson e a demonstração que L-DOPA tem efeitos benéficos nesses pacientes substanciou a relevância clínica dessa teoria (Walton-Hadlock, 2005). Tal redução deve-se a degeneração dos neurônios capazes de sintetizá-la, presentes na substância negra (Lang e Lozano, 1996).

A esquizofrenia é um distúrbio com ampla variedade de sintomas, como o transtorno: afetivo, do pensamento, da percepção e da função psicomotora. Podem estar associados sintomas negativos como a falta de motivação, o que sugere disfunção nos circuitos de recompensa. Alguns sintomas são compatíveis como o aumento da dopamina no SNC e com o desenvolvimento anormal das projeções dopaminérgicas do córtex pré-frontal (Goldstein e Deutch, 1992).

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). Vias ainda não elucidadas na sinalização do sistema dopaminérgico podem gerar uma melhor compreensão quanto ao mecanismo responsável por essas patologias e, conseqüentemente, à identificação de novos alvos farmacológicos (Suo e cols, 2004).

### **1.3 – DARPP-32**

DARPP\_32 foi descoberta por S. Ivar Walaas e Dana W. Aswad (Walaas, Aswad e Greengard, 1983) e tem sido extensivamente estudada desde então, ocupando um papel importante na compreensão da sinalização dopaminérgica e suas interações com outros neurotransmissores, drogas terapêuticas e de abuso (Self e cols., 1998; Maldve e cols., 2002). Localiza-se em neurônios que possuem receptores dopaminérgicos sendo identificada como o maior alvo dos produtos da AC ativada por dopamina no estriado (Wallas e cols., 1983) (figura 3).



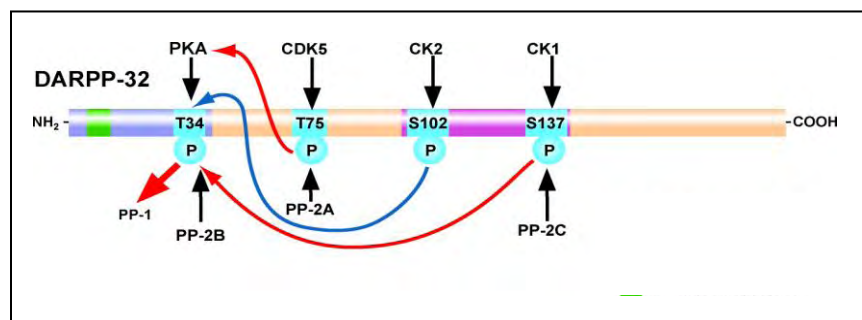
**Figura 3:** Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos (modificado de Greengard, 2001)

Existindo disponibilidade de AMPc, ocorre ativação da proteína quinase sensível a AMPc (PKA) que por sua vez atua fosforilando a DARPP-32 no resíduo de treonina na posição 34 (Thr<sup>34</sup>) (figura 4), passando a atuar como potente inibidor da proteína fosfatase 1 (PP-1) (Yan e cols., 1999). Além da Thr<sup>34</sup>, essa fosfoproteína apresenta outros três sítios de fosforilação:

- treonina na posição 75 (Thr<sup>75</sup>), que ao ser fosforilada pela quinase dependente de ciclina 5 (Cdk-5) provoca inibição de PKA;
- serina na posição 102 (Ser<sup>102</sup>), que fosforilada pela caseína quinase 2 (CK-2) favorece a fosforilação da Thr<sup>34</sup> pela PKA;

- serina na posição 137 (Ser<sup>137</sup>), fosforilada pela caseína quinase 1 (CK-1) passa a inibir a atividade da proteína fosfatase 2B (PP-2B) sobre o resíduo Thr<sup>34</sup> (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, receptores e fatores de regulação da transcrição gênica (Greengard e cols., 1999; Hsieh-Wilson e cols., 1999).



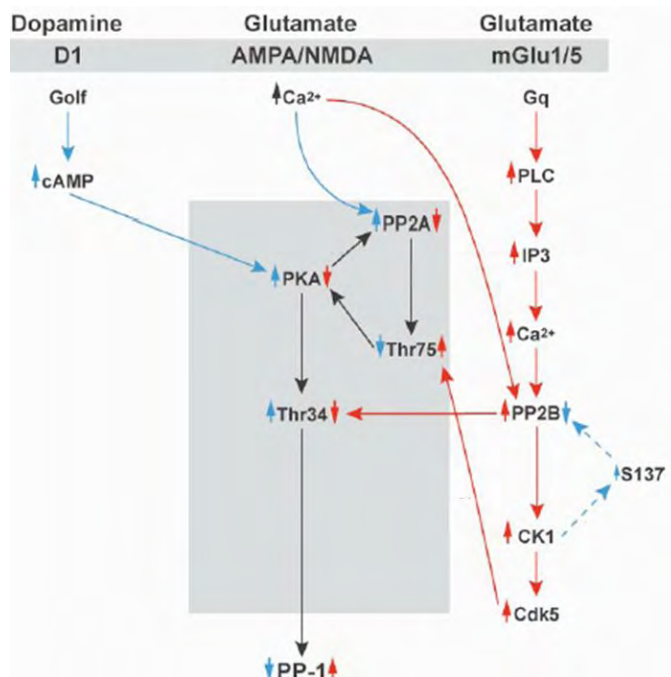
**Figura 4:** Sítos de fosforilação da DARPP-32 (adaptado de Svennigsson e cols., 2004). Em vermelho são indicadas vias inibitórias e em azul as estimulatórias.

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 papel importante na mediação dos efeitos deste neurotransmissor nas mudanças a 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. .

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 consequente modulação de sua atividade (Hyman e cols., 2001). Perturbações nos sistemas de neurotransmissores contribuem para a etiologia de vários transtornos neuropsiquiátricos. 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 Thr<sup>34</sup> e Ser<sup>137</sup> e diminuição na Thr<sup>75</sup> da DARPP-32 (Sveningsson e cols., 2002). As ações da serotonina na fosforilação da Thr<sup>34</sup> e Thr<sup>75</sup> são mediadas primariamente pela ativação de receptores 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>6</sub>, enquanto a regulação da Ser<sup>137</sup> é mediada primariamente via receptores 5-HT<sub>2</sub>. 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 Thr<sup>34</sup>, através da ativação da PP-2B induzida pelos receptores NMDA/AMPA (figura 5).



**Figura 5:** Mecanismos de integração envolvidos na sinalização dopaminérgica e glutamatérgica via cascatas quinase/fosfatase. Etapas da regulação da cascata PKA/PP-2A/Thr<sup>75</sup>-DARPP-32/PKA/Thr<sup>34</sup>-DARPP-32 que são pró-dopaminérgicas estão indicadas com setas azuis e as que são anti-dopaminérgicas com setas vermelhas (modificado de Greengard, 2001).

Além deste, o glutamato tem vários outros efeitos regulatórios na fosforilação da DARPP-32. Através da via mGluR1/CK1/Cdk5/fosfo-Thr<sup>75</sup>-DARPP-32, o glutamato antagoniza a sinalização PKA/fosfo-Thr<sup>34</sup>-DARPP-32. Porém, o glutamato pode potencializar a sinalização PKA/fosfo-Thr<sup>34</sup>-DARPP-32 através de três cascatas por:

- receptores NMDA-AMPA/Ca<sup>2+</sup>/PP-2A/desfosforilação da DARPP-32 na Thr<sup>75</sup>;
- favorecer a formação de AMPc acoplado ao receptor A<sub>2A</sub> mediada pela ativação de receptores mGlu5;



- aumentar a fosforilação na Ser<sup>137</sup> da DARPP-32 mediada através da ativação induzida do receptor mGlu da CK1 (Nishi e cols., 2003).

Estudos realizados em fatias estriatais mostraram que o GABA foi capaz de produzir um rápido aumento no estado de fosforilação da Thr<sup>34</sup>. Este efeito foi prevenido por baculina, antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>. GABA potencializou significativamente o aumento na fosforilação da Thr<sup>34</sup> da DARPP-32 produzido por forskolina, ativador da adenilato ciclase. Isto sugere que o GABA aumenta a fosforilação da Thr<sup>34</sup> através da inibição de PP-2B (Snyder e cols., 1994).

DARPP-32 está envolvida nas ações de uma variedade de substâncias usadas para o tratamento de vários transtornos psiquiátricos e neurológicos. Tratamento com drogas antipsicóticas (ou neurolépticas) representam a terapia mais comum para esquizofrenia. Um efeito comum das drogas antipsicóticas é agir como antagonista de receptores D<sub>2</sub> (Lindgren e cols., 2003). A ativação de receptores D<sub>2</sub> reduz o estado de fosforilação na Thr<sup>34</sup>.

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 Thr<sup>34</sup> e uma diminuição na fosforilação da Thr<sup>75</sup> no hipocampo, córtex frontal e estriado (Svenningsson e cols., 2002). A L-DOPA permanece como o tratamento farmacológico mais efetivo para

Doença de Parkinson. Evidências apontam para o envolvimento da DARPP-32 nos mecanismos da geração de discinesia induzida por L-DOPA (Picconi e cols., 2003). Relatou-se que neurônios estriatais de ratos discinéticos não mostram despotenciação em resposta à estimulação de baixa frequência de aferentes corticais. Falta de despotenciação pode refletir um estado alterado de transmissão sináptica estriatal, que pode produzir discinesia. A despotenciação é bloqueada pela ativação de receptores  $D_1$ , bem como por inibição de PP-1 (Picconi e cols., 2003). Animais discinéticos apresentam anormalmente altos níveis de fosforilação na Thr<sup>34</sup> (Picconi e cols., 2003). Baseado nestes dados, sugere-se que a discinesia pode resultar de mudanças específicas ocorridas ao longo da sinalização dopaminérgica  $D_1$ , levando a um aumento da fosforilação da Thr<sup>34</sup>, aumentando a inibição da atividade de PP-1 e perda de despotenciação.

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

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 desordens psicoativas e neurológicas.

## 1.4 – Apoptose

Um dos objetivos da biologia moderna é esclarecer quais são os mecanismos envolvidos na “decisão celular” para definir a morte celular programada. Apoptose é um processo complexo controlado não apenas por sinais externos, mas também por sinais genéticos internos. É um processo altamente eficiente que requer a interface de múltiplos fatores. Pode ser iniciado por estímulos de diversas origens que convergem para uma maquinaria de “morte” comum, envolvendo a ativação de proteases específicas, chamadas caspases. O processo apoptótico é regulado em vários “pontos específicos”. Um deles é controlado, principalmente, por membros da família Bcl-2. Homólogos de Bcl-2 podem ser definidos pela presença de sequências conservadas conhecidas como domínios homólogos (BH1-BH4). Em mamíferos, mais de trinta espécies foram descritas: algumas pertencem ao grupo de anti-apoptóticos (ex: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), que possuem os quatro domínios BH, enquanto outras pertencem ao grupo pró-apoptótico, como a subfamília Bax, que possui três dos quatro domínios (BH1, BH2 e BH3), e membros apenas de BH3, como Bid, Bim e Bad, que tem apenas o domínio BH3, necessário e suficiente para apoptose.

A principal função da família Bcl-2 é proteger a integridade mitocondrial e regular a liberação de proteínas mitocondriais para o citoplasma que estão envolvidas na sinalização apoptótica, como o citocromo C. Embora os mecanismos envolvidos nesta função seja controverso, foi demonstrado que membros da subfamília Bax, que são monômeros localizados no citoplasma de células viáveis, translocam para a mitocôndria e

oligomerizam durante apoptose. É proposto que estes oligômeros contribuam para a permeabilização da membrana mitocondrial externa. Por outro lado, membros anti-apoptóticos sequestram os pró-apoptóticos pela ligação ao domínio BH3. Durante a morte celular, apenas proteínas BH3 competem pelo domínio BH3 de membros anti-apoptóticos, prejudicando a habilidade destes de sequestrar membros tipo Bax (Viegas e cols., 2008).

A sinalização mitocondrial da apoptose acontece quando moléculas sequestradas entre a membrana mitocondrial externa e interna são liberadas para o citosol pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) (Chipuk e cols., 2008).

Relata-se também a importância de proteínas 14-3-3, que pertencem a uma família de proteínas ácidas altamente conservadas com peso molecular de 25-30 kDa. As proteínas 14-3-3 participam nas interações proteína-proteína dependentes de fosforilação que controlam a progressão do ciclo celular, início e manutenção de pontos críticos de dano do DNA, ativação de MAP kinases, prevenção de apoptose e coordenação da sinalização de integrinas e dinâmica do citoesqueleto. Alterações da expressão de proteínas 14-3-3 tem sido associadas com várias desordens, como câncer, doenças cardíacas e uma variedade de doenças neurodegenerativas. As proteínas 14-3-3 tem sido relacionadas por vários estudos recentes a potenciais bases genéticas da esquizofrenia (Bell e cols., 2000; Vawter e cols., 2001). Middleton e cols. relataram que o transcrito beta 14-3-3 pode ser único entre os genes 14-3-3 devido ao aumento associado na resposta ao haoperidol e diminuição no estado da doença (Middleton e cols., 2005). Foi demonstrado aumento da

expressão da proteína zeta/delta 14-3-3 em cérebros de ratos após estimulação eletroconvulsiva. Este achado pode ser associado com mecanismo terapêutico da ECT nos sintomas psicóticos.

Foi demonstrado aumento da expressão de proteínas de transferência de fosfatidilinositol (PI-TPs) depois de ECT. PI-TPs são responsáveis pelo transporte de fosfatidilinositol (PI) e outros fosfolípidos entre membranas. PI-TPs tem papel na “entrega” de PI para PI-4-quinase, que sintetiza PI-4-5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). Devido a alta afinidade de PI-TPs por PIP e PIP<sub>2</sub>, estes lípidos permanecem ligados a PI-TPs, que podem liberar estas substâncias para fosfolipase C (PLC) (Thomas e cols., 1993). Kauffman e cols identificaram PI-TP $\alpha$  como componente essencial para subsequente suprimento de substrato para PLC. Esta enzima hidroliza PIP<sub>2</sub> para gerar segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). A seguir, DAG ativa proteína quinase C (PKC) via fosforilação que inicia a cascata de MAPK. O sistema de segundo mensageiro pode estar envolvido na regulação do humor, envolve o metabolismo de fosfoinosítídeo (Pollack e cols., 1994). Neste sistema, PIP<sub>2</sub> é hidrolizado para segundo mensageiro pós-sináptico que contribui para estimulação celular crônica por alterar a atividade elétrica no neurônio. Inositol formado durante este processo é reciclado pela enzima inositol monofostato. Células no sistema nervoso central tem acesso limitado a fontes plasmáticas de inositol e dependem da síntese para a transdução dos sinais neuronais. Lítio, em concentrações terapêuticas bloqueia a atividade de inositol monofosfato, inibindo a hidrólise de fosfatos intermediários de inositol em inositol, que é necessário para re-síntese de PIP<sub>2</sub> (Manji e cols., 1996). Como resultado, níveis de PIP<sub>2</sub> são depletados, e o lípido não é capaz de

estimular a formação de quantidades adequadas de segundos mensageiros ou alterar a atividade elétrica. Por isso, expressão aumentada de PI-TP $\alpha$  em cérebros de ratos após estimulação eletroconvulsiva pode estar associado com o efeito estabilizador do humor da ECT (Lee e cols., 2009).

## 1.5 – Akt

Akt, serina-treonina proteína quinase (também conhecida como proteína quinase B, PKB) medeia muitos efeitos a partir de PI3K e, conseqüentemente, tem papel central em ambas sinalizações, normal e patológica, por PI3K.

Ativação de Akt é um processo de várias etapas envolvendo ambas, ligação na membrana e fosforilação. Sobre ativação de PI3K e produção de PtdIns-3,4,5-P3 e PtdIns-3,4-P2, Akt é recrutada para membrana plasmática, onde liga-se a estes fosfoinosítídeos através do domínio PH (Franke, Kaplan, Cantley, & Toker, 1997). A ativação envolve mudança conformacional e fosforilação. Um dos resíduos de fosforilação situa-se no loop do domínio de ativação da quinase (Thr 308 da Akt1) e é fosforilado por outra proteína contendo domínio PH, PDK1 (revisado por Alessi, 2001, 2004). Este é o principal evento de ativação da fosforilação. Além disso, um segundo resíduo de fosforilação na região C-terminal (Ser 473) é requerido para atividade completa ou máxima. A função da quinase serina 473 não está completamente estabelecida e o evento de fosforilação pode resultar da própria (Balendran et al., 1999), de quinases ligadas a integrinas (Persad et al., 2001) ou da auto-fosforilação da Akt.

Akt fosforila uma variedade de substratos envolvidos na regulação de importantes funções celulares, incluindo crescimento celular e sobrevivência.

O mecanismo comum pelo qual fosforilação mediada por Akt resulta em inibição do substrato é através da regulação da localização subcelular por interação com proteínas 14-3-3 (ex.: Bad). Como descrito anteriormente, proteínas 14-3-3 são citoplasmáticas e ligam-se especificamente a fosfoproteínas e as retem no citoplasma (Yaffe e cols., 1997) distantes dos seus alvos. Em particular o sítio “consenso” de fosforilação de Akt é também o de ligação de proteínas 14-3-3 (Yaffe e cols., 2001). Por exemplo, fosforilação de Bad por Akt inibe o efeito pró-apoptótico. No estado não fosforilado, Bad é transportado para a mitocôndria, onde forma um complexo com Bcl-2 ou Bcl-xl, inibindo a atividade anti-apoptótica destes. Inversamente, quando fosforilado, Bad associa-se com proteínas 14-3-3 no citoplasma.

Estudos recentes de associação genética tem estabelecido uma ligação entre a desregulação de Akt e esquizofrenia. A principal associação de haplótipos de Akt1 com esquizofrenia foi demonstrada em vários cohortes independentes de pacientes com esquizofrenia. Além disso, atividade reduzida de Akt ou níveis de expressão foram também mostrados em cérebro de pacientes com esquizofrenia (Tan e cols., 2008).

Devido ao fato de estimulação de receptores D2 estriatais, por dopamina, resultar em inibição de Akt (Amar e cols., 2008), é possível que perda parcial da função de Akt na

esquizofrenia resulte em respostas exacerbadas à estimulação do receptor D2, que são similares às observadas em camundongos Akt1-knockout. No mesmo sentido, antipsicóticos clássicos podem corrigir o desbalanço por prevenir maiores reduções da atividade de Akt por receptores D2. Além disso, os antipsicóticos atípicos tem demonstrado também ativação de Akt ou mimetize a atividade de Akt por aumentar a fosforilação dos seus substratos GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  (Aubry e cols., 2009).

## 1.6 – GSK-3

A associação de GSK-3 com desordens psiquiátricas é um conceito relativamente novo, que surgiu apenas em 1996. Na época, foi descoberto que GSK-3 era alvo do lítio, estabilizador do humor (Klein e Melton, 2006), tratamento inicial (primário) para transtorno do humor bipolar (Jope, 1999). Durante os dez anos seguintes, uma ampla variedade de estudos contribuiu para a hipótese que inibição de GSK-3 por lítio tem uma importante contribuição para a capacidade de estabilizador do humor exercida pelo lítio (Jope, 2004). Vários estudos não apenas reforçam a proposta que a inibição de GSK-3 é um importante alvo terapêutico para estabilização do humor, mas também indicam que a regulação de GSK-3 pode estar envolvida nos efeitos terapêuticos de outros medicamentos usados na prática psiquiátrica. Assim, evidências sugerem que a desregulação de GSK-3 pode ocorrer na depressão e esquizofrenia, bem como no transtorno bipolar.

O principal mecanismo fisiológico que regula a atividade desta proteína é a fosforilação, na região N-terminal, de um resíduo de serina (Ser9-GSK-3 $\beta$ , isoforma predominante no



cérebro, ou Ser21-GSK-3 $\alpha$ ). A fosforilação dessa serina inibe a atividade de GSK-3 e pode ser catalizada por várias quinases, como a Akt.

Outro método pelo qual a capacidade desta proteína de interagir com substratos é limitada, é pela regulação da localização subcelular. Por exemplo, níveis nucleares de GSK-3 são dinamicamente regulados com mudanças nos níveis de GSK-3 nuclear evidentes em várias condições, e isto afeta a habilidade de fosforilar substratos nucleares, como certos fatores de transcrição (Bijur e cols., 2001; Watcharasit e cols., 2002). Sugere-se também que a inibição da serina de GSK-3 por fosforilação de compartimentos seletivos subcelulares que modulam localmente a atividade desta proteína, seguindo a ativação de sinalização para a mitocôndria, pode ter como alvo GSK-3 mitocondrial (Bijur e Jope, 2003). Assim, mudanças subcelulares seletivas na fosforilação e localização de GSK-3 podem regular as ações nos substratos dentro destes compartimentos.

### Transtorno do humor e GSK-3

Transtorno afetivo bipolar e depressão maior tem prevalência, durante a vida, de aproximadamente 20%, e tem importância em saúde pública devido ao risco de suicídio, bem como outras causas (Nestler e cols., 2002; Berns e Nemeroff, 2003; Belmaker, 2004). Os determinantes fisiopatológicos do transtorno do humor bipolar e depressão são desconhecidos. Pesquisas sobre mecanismos causais tem sido dificultadas pela falta de modelos animais adequados para estes transtornos (Cryan e cols., 2002). Entretanto,

investigações dos mecanismos de ação de agentes terapêuticos tem conduzido a possíveis mecanismos patológicos, e estudos recentes tem mostrado um número de conexões relacionando GSK-3 a causas e, especialmente, à ação de agentes terapêuticos usados nestes transtornos.

### 1.7 – Bcl-2 e Bad

Organismos multicelulares eliminam excesso, dano ou células infectadas por um programa de “suicídio celular”, ou apoptose (Kerr e cols., 1972). Interesse no controle da apoptose tem crescido exponencialmente com o reconhecimento dos papéis vitais no desenvolvimento normal, homeostase tecidual, e defesa contra patógenos (Vaux, 1994), e a compreensão que distúrbios no processo apoptótico podem contribuir para câncer, doenças auto-imune e degenerativas (Chao e Korsmeyer, 1997).

Bcl-2 encontra-se na face citoplasmática da membrana mitocondrial externa, retículo endoplasmático e envelope nuclear e pode causar dano a estes compartimentos e afetar o comportamento destes, por modificar o fluxo de moléculas menores ou proteínas.

Sabe-se como a atividade de membros da família Bcl-2 é regulada por moléculas de transdução do sinal. Sabe-se que proteínas quinase reguladas por fator de crescimento

fosforilam membros da família Bcl-2 e regulam sua função. Um alvo da fosforilação por quinase regulada por fator de crescimento é Bad (Yang e cols., 1995). A função de Bad é modulada por dois sítios de fosforilação, serina 112 (Ser-112) e serina 136 (Ser-136) (Gajewski and Thompson, 1996; Wang et al., 1996; Zha et al., 1996).

Foi demonstrado que Akt fosforila Bad tanto in vivo quanto in vitro e que esta fosforilação bloqueia, de maneira eficaz, a morte celular induzida por Bad (Datta, 1997).

Bad encontra-se no citosol e é fosforilado nos seus resíduos de serina (Peso L, 1997). Fosforilação de Bad resulta no sequestro do Bad citosólico por proteínas 14-3-3 e inativação desta.

Apesar da alta eficácia no tratamento de desordens psiquiátricas, ECT é amplamente estigmatizada e ainda existem muitas questões sobre os efeitos terapêuticos e adversos, especialmente controvérsias se a técnica causa dano cerebral, seja funcional ou estrutural (Zupan e cols., 2008).

## **2-Objetivos**

## **Objetivo geral**

Investigar o papel de vias de sinalização dopaminérgicas e proteínas da sinalização apoptótica após estimulação eletroconvulsiva. Avaliar os níveis de expressão da DARPP-32, pDARPP-32 (Thr34), Akt, pAkt (Thr308), GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  (Ser9), Bad, pBad (Ser136) em cérebro de ratos submetidos à estimulação eletroconvulsiva aguda e crônica.

## **Objetivos específicos**

1. estudar o impacto da estimulação eletroconvulsiva na expressão da DARPP-32, pDARPP-32 (Thr34), Akt, pAkt (Thr308), GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  (Ser9), Bad, pBad (Ser136) em diferentes regiões cerebrais de ratos;
2. analisar o papel da estimulação eletroconvulsiva aguda e crônica sobre a expressão de das proteínas descritas anteriormente em cérebros de ratos;
3. avaliar a dinâmica temporal da expressão da DARPP-32, pDARPP-32 (Thr34), Akt, pAkt (Thr308), GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  (Ser9), Bad, pBad (Ser136) após a estimulação eletroconvulsiva.
4. avaliar a expressão de proteínas da sinalização apoptótica após estimulação eletroconvulsiva aguda e crônica.

## **3-Material e métodos**

### **3.1 – Aparato de estimulação eletroconvulsiva e soluções:**

#### 3.1.1 – Aparato de estimulação eletroconvulsiva:

Fabricante: Ugo Basile

#### 3.1.2 – Solução de lise:

20mM MOPS – pH7

2mM EGTA

5mM EDTA

30mM Floreto de sódio

40mM  $\beta$ -glicerofosfato – pH 7,2

20mM Pirofosfato

1mM Ortovanadato de sódio

1mM Fenilmetilsulfonil fluoreto

3mM Benzamidina

10 $\mu$ M Leupeptina

0,5% Nonidet P40

#### 3.1.3 – Solução de Bradford

0,06% (p/v) de azul de Comassie G-250

3% (v/v) de ácido perclórico

### 3.1.4 – Tampão de amostra para SDS-PAGE

| SUBSTÂNCIA                          | QUANTIDADE |
|-------------------------------------|------------|
| Tris-HCl 0,5 M + 0,4 % SDS (0,04 g) | 7 mL       |
| Glicerol                            | 3,6 mL     |
| SDS                                 | 1 g        |
| β-mercaptoetanol                    | 600 µL     |
| Azul de bromofenol                  | 1,2 mg     |

### 3.1.5 – Tampão para eletroforese

| SUBSTÂNCIA                              | QUANTIDADE     |
|-----------------------------------------|----------------|
| Tris                                    | 30,28 g        |
| Glicina                                 | 144 g          |
| SDS                                     | 5 g            |
| H <sub>2</sub> O destilada e deionizada | q.s.p. 1000 mL |

- pH = 8,3

### 3.1.6 – Tampão de transferência

| SUBSTÂNCIA                              | QUANTIDADE     |
|-----------------------------------------|----------------|
| Tris                                    | 11,63 g        |
| Glicina                                 | 5,86 g         |
| SDS                                     | 0,075 g        |
| Metanol                                 | 400 mL         |
| H <sub>2</sub> O destilada e deionizada | q.s.p. 2000 mL |

- pH = 9,0-9,5

### 3.1.7 – Ponceau

| SUBSTÂNCIA                              | QUANTIDADE    |
|-----------------------------------------|---------------|
| Ponceau                                 | 0,5 g         |
| Ácido acético                           | 1 mL          |
| H <sub>2</sub> O destilada e deionizada | q.s.p. 100 mL |

### 3.1.8 – PBS 10X

| SUBSTÂNCIA                                          | QUANTIDADE    |
|-----------------------------------------------------|---------------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 51,6 g        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O  | 11,75 g       |
| NaCl                                                | 20,0 g        |
| H <sub>2</sub> O destilada e deionizada             | q.s.p. 500 mL |

- pH = 7,4



### 3.1.9 - TBS 10X

Tris 20mM  
NaCl 137mM  
pH 7,4

## 3.2 - Experimento em Modelo Animal:

Animais Experimentais: foram utilizados ratos Wistar machos com 60 (sessenta) dias de vida. Os animais foram mantidos com comida e água disponíveis *ad libitum*, e mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 07:00h). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas para experimentação animal do *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), com a aprovação do comitê de ética local.

Eletrochoque: o aparato (Ugo Basile) produz uma corrente elétrica (150V, 60HZ) através de eletrodos (clipes) bilaterais fixados previamente nas orelhas dos animais. Cada estimulação produz uma convulsão tônico-clônica. Foram utilizados dois protocolos: agudo e crônico. Agudo – única estimulação. Crônico – 8 (oito) estimulações, distribuídas ao longo de 16 dias.

Coleta das amostras biológicas: a coleta do material biológico foi efetuada em diferentes tempos após a última estimulação: imediatamente após, 30 minutos, 03 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas após. Os animais foram sacrificados por decapitação; os cérebros foram removidos e fracionados nas seguintes regiões cerebrais de interesse: hipocampo,

estriado, córtex pré-frontal. Os tecidos foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores.

### **3.3 – Dosagem de proteína**

Para a quantificação protéica foi utilizado o método descrito por Bradford. Entre 1,0 e 2,0 $\mu\text{L}$  de extrato proteico 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 sérica bovina (BSA) (1 a 10 $\mu\text{g}$ ) foi utilizada.

### **3.4 – Imunoblot**

Para a preparação dos extratos para *imunoblot*, o material foi incubado com tampão de lise (20mM MOPS – pH7, 2mM EGTA, 5mM EDTA, 30mM Floreto de sódio, 40mM  $\beta$ -glicerofosfato – pH 7,2, 20mM Pirofosfato, 1mM Ortovanadato de sódio, 1mM Fenilmetilsulfonil fluoreto, 3mM Benzamidina, 10 $\mu\text{M}$  Leupeptina e 0,5% Nonidet P40) no gelo por 30 minutos e centrifugado a 13.000g por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e coletado o sobrenadante. Em seguida, foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, usando BSA como padrão. Quantidades iguais de proteína (50 $\mu\text{g}$ ) foram preparadas para eletroforese com tampão de amostra NuPAGE LDS (Invitrogen) e

10% de  $\beta$ -Mercaptoetanol, incubadas a 70°C por 10 minutos e aplicadas em gel Bis-Tris NuPAGE 4-12% (Invitrogen) para eletroforese. Após eletroforese, foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond – Amersham Biosciences) e coloração com Ponceau. A eletroforese e a transferência foram realizadas conforme orientações do kit. Para análise de proteínas fosforiladas, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS 1X contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de BSA por 50 minutos. Para análise de proteínas fosforiladas, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo anti-pDARPP-32(Thr34) (1:1000 – AB9206 – Chemicon); anti-pAkt (Thr308) (1:1000 – Cell Signalling), anti-pGSK-3 $\beta$  (Ser9) (1:1000 – Cell Signalling), anti-pBad(Ser136) (1:1000 – Cell Signalling) diluído em TBS 1X Tween 20 0,1%. As membranas foram lavadas 3 vezes de 7 minutos cada, com TBS 1X Tween 20 0,1% e em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse peroxidase-linked IgG (1:7000 - Molecular Probes), anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG (1:15000 - Molecular Probes) por uma hora em temperatura ambiente. As membranas foram submetidas à detecção quimioluminescente conforme instruções do kit ECL Plus (Amersham Biosciences), e visualizadas através do ImageQuant. Posteriormente foi realizado stripping da membrana e proteínas totais detectadas. Para análise de proteína total, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio PBS 1X contendo 0,5% de Tween 20 e 5% de leite desnatado por 50 minutos. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-actina (1:3000 - MAB1521R - Chemicon), anti-DARPP-32 (1:250 - H-62 - Santa Cruz), anti-Akt (1:1000 – 05-591 – Upstate), anti-GSK-3 $\beta$  (1:500 – Cell Signaling), anti-Bad (1:500 – Cell Signaling), incubadas *overnight* a 4°C. Após a incubação em anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas

com anticorpo secundário anti-mouse peroxidase-linked IgG (1:7000 - Molecular Probes), anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG (1:15000 - Molecular Probes) por uma hora em temperatura ambiente, sendo os anticorpos diluídos em PBS 1X Tween 20 0,5%. Os processos de detecção e visualização foram realizados de acordo com o descrito para os sítios de fosforilação.

### **3.5 – Análise dos imunoblots**

Bandas imunorreativas não saturadas foram submetidas à varredura densitométrica e à quantificação pelo Scion Image Software versão Beta 4.0.2 (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA). Os valores obtidos para proteínas totais e fosforiladas foram corrigidos pelos respectivos valores da actina.

### **3.6 – Análise estatística**

Para os dados de DARPP-32 e pDARPP-32 (Thr34), as análises foram realizadas pelo programa Sigmaplot/Sigmastat 9.0 através do teste de análise de variância (ANOVA) e foram considerados estatisticamente significativos para valores de  $p < 0.05$  e poder  $> 0,8$  e valores expressos com desvio padrão.

Para os dados de Akt, pAkt (Thr308), GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  (Ser9), Bad, pBad (Ser136), os valores também foram expressos com desvio padrão. Dados foram analisados como descrito por Souza e cols (2008), utilizando Kruskal-Wallis one way análise de variância (ANOVA) se tanto normalidade quanto teste de variância com valores de  $p < 0.050$  (H score reported). Se normalidade e teste de variância mostraram valores de  $p > 0.050$ , foi

aplicado one way ANOVA (F score reported). Valores relevantes ( $p < 0.050$ ) foram subsequentemente localizados e analisados utilizando Holm-Sidak (múltiplas comparações). Este teste pode ser utilizado para comparações pareadas e comparações versus grupo controle; é considerado como primeira linha para testes de múltiplas comparações (Souza e cols., 2008). Todos os resultados significativos foram corrigidos utilizando Holm-Sidak. Análise estatística foi realizada utilizando SigmaStat 3.0 (Systat Software).

## **4-Resultados**

#### 4.1 - Efeito da EEC aguda na expressão da DARPP-32 e fosfo-Thr<sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado

ECS agudo não alterou os níveis de DARPP-32 [ $H(6,35) = 6.87$ ,  $p = 0.333$ ]; e fosfo-Thr<sup>34</sup> [ $F(6,35) = 2.337$ ,  $p = 0.061$ ] no córtex pré-frontal e os níveis de DARPP-32 [ $F(6,35) = 2.115$ ;  $p = 0.083$ ] estriatais também não foram alterados. Houve alterações nos níveis estriatais de fosfo-Thr<sup>34</sup> [ $H(6,35) = 19.490$ ;  $p = 0.003$ ], embora não houvesse significância estatística quando comparado com o grupo controle.

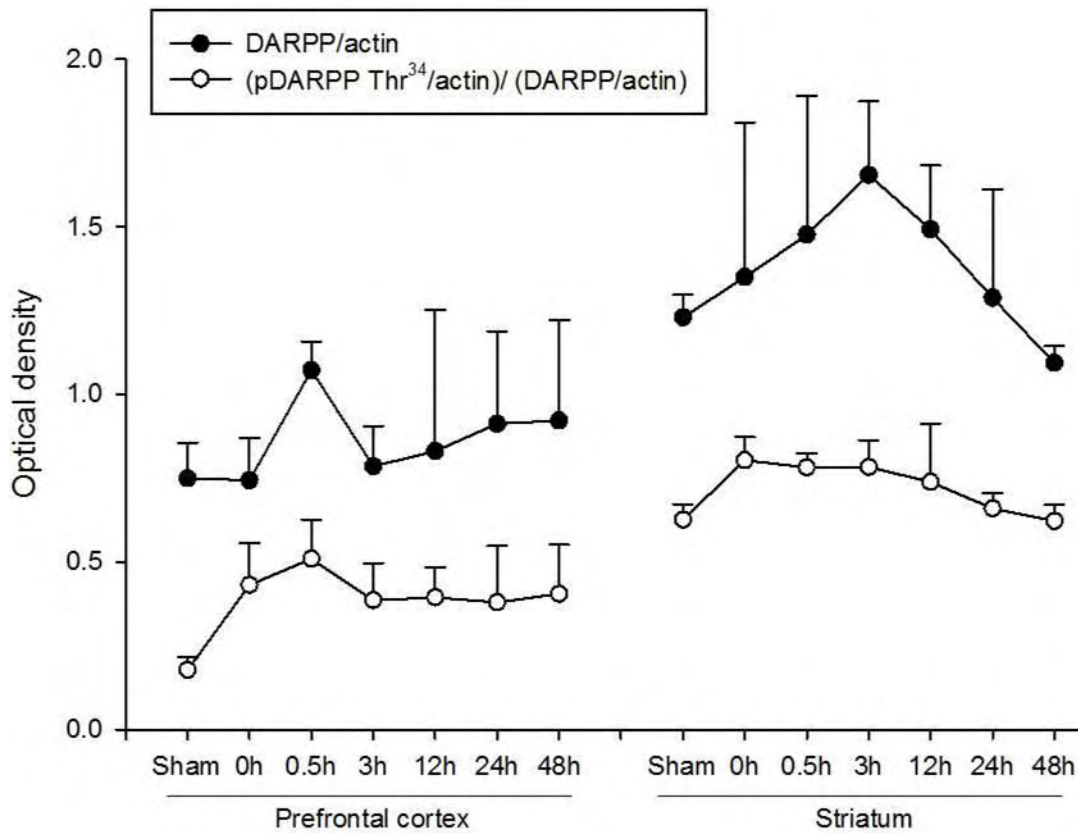


Figura 6: Níveis de DARPP-32 e fosfo-Thr<sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado após EEC aguda.

#### 4.2 - Efeito da EEC crônica na expressão de DARPP-32 e fosfo-Thr<sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado

A expressão de DARPP-32 no córtex pré-frontal foi aumentada nos tempos de: 30 minutos ( $t = 3.868$ ;  $p < 0.001$ ) e 3 horas ( $t = 4.448$ ;  $p < 0.001$ ) após a última estimulação, quando comparada com o grupo controle. Também houve alterações na expressão de DARPP-32 no tempo de 12 ( $t = 2.585$ ;  $p = 0.017$ ) e 24 horas ( $t = 2.355$ ;  $p = 0.028$ ) após a última estimulação, com a expressão retornando ao basal após 48 horas ( $t = 2.035$ ;  $p = 0.054$ ).

A expressão de fosfo-Thr<sup>34</sup> aumentou no tempo zero ( $t = 5.128$ ;  $p < 0.001$ ), 30 minutos ( $t = 8.310$ ;  $p < 0.001$ ), 3 horas ( $t = 7.863$ ;  $p < 0.001$ ), 12 horas ( $t = 4.098$ ;  $p < 0.001$ ) e 24 horas ( $t = 2.880$ ;  $p = 0.008$ ) após a última estimulação. Além disto, os níveis de fosfo-Thr<sup>34</sup> retornaram ao basal após a última estimulação ( $t = 1.558$ ;  $p = 0.133$ ).

Houve aumentos dos níveis estriatais de DARPP-32 nos tempos: zero ( $t = 4.273$ ;  $p < 0.001$ , corrected significance level  $p = 0.025$ ), 30 minutos ( $t = 6.431$ ;  $p < 0.001$ ), 3 ( $t = 9.129$ ;  $p < 0.001$ ), 12 ( $t = 6.247$ ;  $p < 0.001$ ) e 24 horas ( $t = 4.359$ ;  $p < 0.001$ ) após a última estimulação quando comparado ao grupo controle, com a expressão retornando ao basal em 48 horas ( $t = 1.436$ ;  $p = 0.161$ ).

Houve aumentos da expressão de fosfo-Thr<sup>34</sup> estriatais nos tempos: 30 minutos ( $t = 5.933$ ;  $p < 0.001$ ), 3 ( $t = 8.447$ ;  $p < 0.001$ ), 12 ( $t = 3.333$ ;  $p = 0.002$ ) e 24 horas ( $t = 3.613$ ;  $p =$



0.001) após a última estimulação do protocolo crônico, com a expressão retornando ao basal com 48 horas ( $t = 0.480$ ;  $p = 0.634$ ).

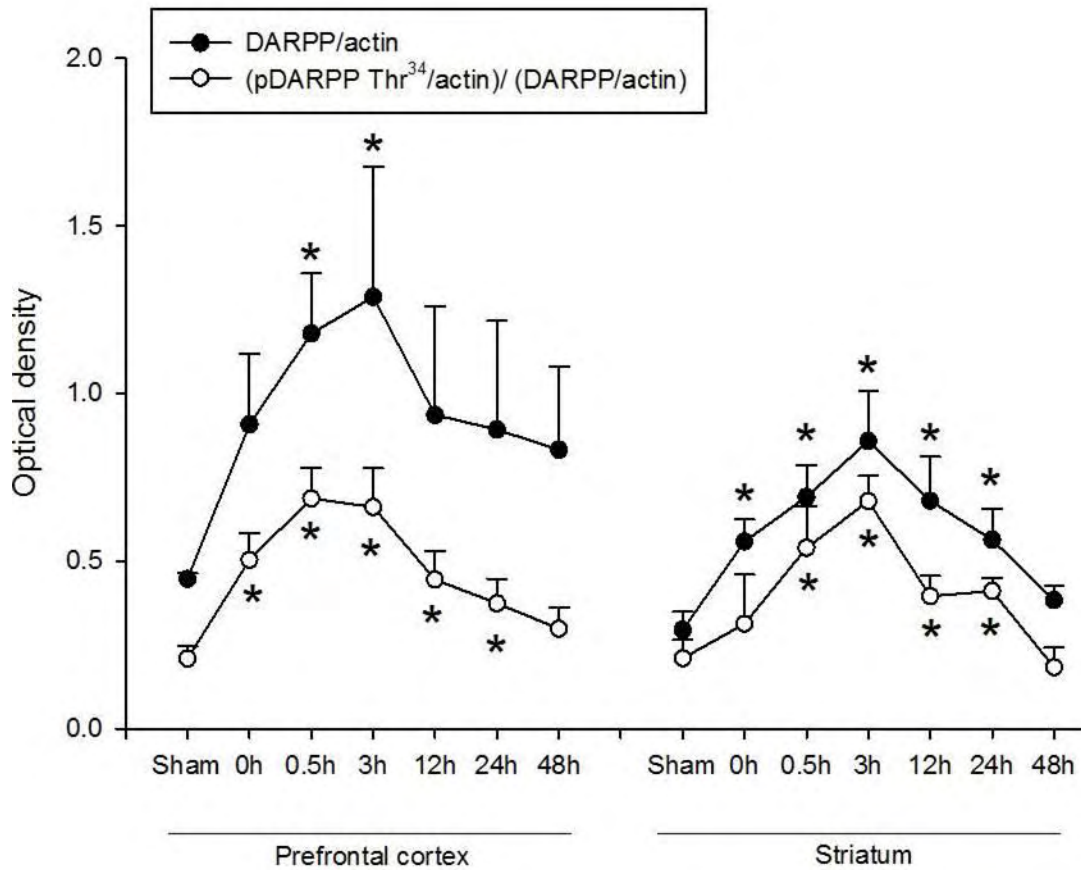


Figura 7: Níveis de DARPP-32 e fosfo-Thr<sup>34</sup> no córtex pré-frontal e estriado após EEC crônica

### 4.3 - Efeito da EEC na expressão de DARPP-32 no hipocampo

Não houve alteração na expressão de DARPP-32 após estimulação aguda (Fig. 3A [F(6,35)= 1.117;P= 0.379]). Houve aumento da expressão de DARPP-32 no tempo zero após a estimulação crônica (p<0.05) (Fig. 3B [F(6,35)= 4.594;P= 0.002]).

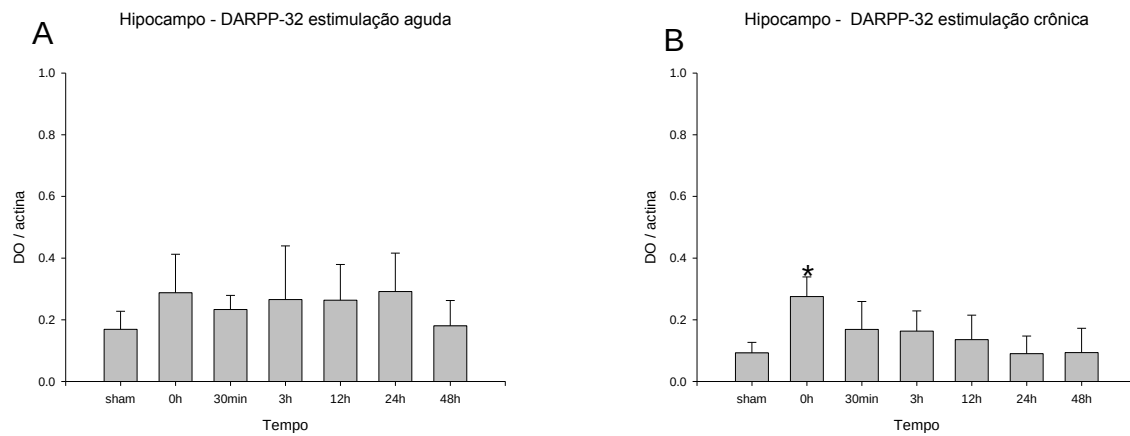


Figura 8: Níveis de DARPP-32 no hipocampo após EEC aguda e crônica

#### 4.4 - Efeito da EEC na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3 $\beta$ , fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> no córtex pré-frontal

Não houve aumento da expressão de Akt, nem de fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> após estimulação aguda, mas houve aumento da expressão de Akt, no tempo de 12 horas, e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, nos tempos de 30 minutos e 3 horas, após estimulação crônica. Não houve alterações na expressão de Bad, nem de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> após estimulação aguda. Também não houve alteração na expressão de Bad após estimulação crônica, mas houve aumentos na expressão de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, nos tempos de 3, 12 e 24 horas. Estimulação eletroconvulsiva aguda não gerou alterações na expressão de GSK-3 $\beta$ , nem de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>. Também não houve alteração na expressão de GSK-3 $\beta$  após estimulação crônica, mas houve aumentos de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> em todos os tempos analisados, ou seja, zero hora, 30 minutos, 3, 12 24 e 48 horas.

Abaixo encontram-se os valores estatísticos de cada comparação:

Não houve alterações na expressão de Akt [F(6,35) = 0.454; p = 0.834] ou fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> [F(6,35) = 0.345; p = 0.905] depois da estimulação aguda (Figura 4A). Entretanto, aumentos significativos na expressão de Akt [F(6,35) = 2.63; p = 0.046; controle x 12h t = 3.46; p = 0.002] e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> [F(6,35) = 9.93; p = 0.00003; controle x 0.5h t = 2.88; p = 0.008; controle x 3h t = 6.84; p < 0.000001] foram observados depois da estimulação crônica (Figura 4A). Não houve alteração na expressão de Bad [F(6,35) = 1.99; p = 0.109] e fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> [F(6,35) = 0.771; p = 0.601] depois da estimulação

aguda (Figura 4B). Embora não tenha sido observada alteração significativa na expressão de Bad depois da estimulação crônica [ $F(6,35) = 972$ ;  $p = 0.471$ ], houve aumento de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> [ $F(6,35) = 3.65$ ;  $p = 0.015$ ; controle x 0.5h  $t = 2.77$ ;  $p = 0.012$ ; controle x 3h  $t = 3.98$ ;  $p = 0.0008$ ; controle x 12h  $t = 3.16$ ;  $p = 0.005$ ] depois da EEC crônica (Figura 4B). Não houve diferenças na expressão de GSK-3 $\beta$  [ $F(6,35) = 1.96$ ;  $p = 0.107$ ] e fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> [ $F(6,35) = 1.01$ ;  $p = 0.436$ ] após EEC aguda (Figura 4C). Embora expressão de GSK-3 $\beta$  não tenha sido alterada [ $F(6,35) = 1.08$ ;  $p = 0.398$ ], houve aumento significativo de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> após estimulação crônica [ $F(6,35) = 2.94$ ;  $p = 0.027$ ; controle x 3h  $t = 3.63$ ;  $p = 0.001$ ] (Figura 4C). As razões entre proteínas fosforiladas/totais foram analisadas através dos diferentes tempos (Figura 4D). A razão fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>/Akt não foi alterada após estimulação aguda [ $F(6,35) = 0.432$ ;  $p = 0.851$ ], mas houve aumento após estimulação crônica [ $F(6,35) = 3.11$ ;  $p = 0.024$ ; controle x 12h  $t = 4.22$ ;  $p = 0.0003$ ]. Não houve alteração na razão fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>/Bad após EEC aguda [ $F(6,35) = 0.378$ ;  $p = 0.885$ ], mas houve alteração após estimulação crônica [ $F(6,35) = 5.86$ ;  $p = 0.001$ ; controle x 3h  $t = 5.09$ ;  $p = 0.00007$ ; controle x 12h  $t = 4.60$ ;  $p = 0.0002$ ; controle x 24h  $t = 2.80$ ;  $p = 0.011$ ]. A razão fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>/GSK-3 não foi alterada após EEC aguda [ $F(6,35) = 0.336$ ;  $p = 0.911$ ], mas houve aumentos após estimulação crônica [ $F(6,35) = 6.02$ ;  $p = 0.0006$ ; controle x 0h  $t = 2.25$ ;  $p = 0.033$ ; controle x 0.5h  $t = 4.69$ ;  $p = 0.00009$ ; controle x 3h  $t = 5.34$ ;  $p = 0.00002$ ; controle x 12h  $t = 3.76$ ;  $p = 0.0009$ ; controle x 24h  $t = 3.38$ ;  $p = 0.002$ ; controle x 48h  $t = 3.28$ ;  $p = 0.003$ ].

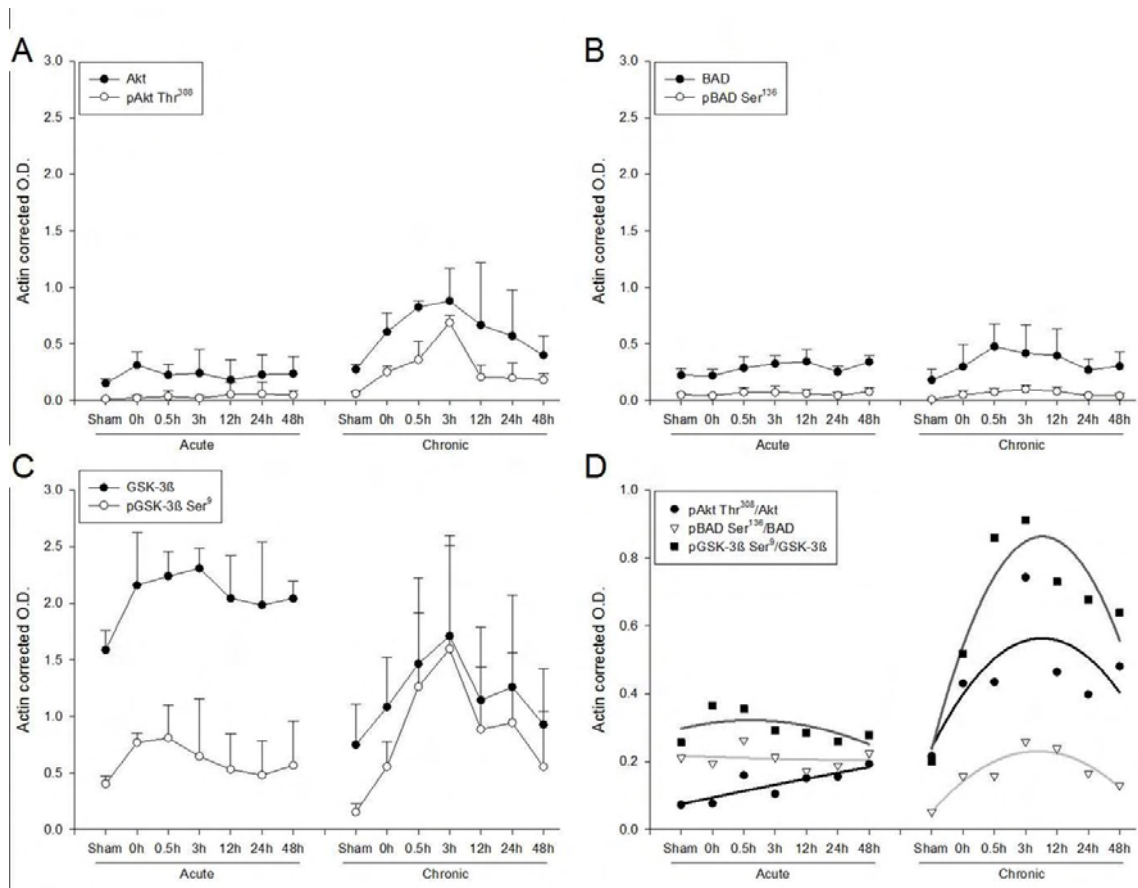


Figura 9: Níveis de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3β, fosfo-GSK-3β-Ser<sup>9</sup> no córtex pré-frontal após EEC aguda e crônica.

#### 4.5 - Efeito da EEC na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3 $\beta$ , fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> no estriado

Não houve alterações após estimulação aguda em nenhuma das seguintes proteínas: Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3 $\beta$  e fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>. Houve aumentos da expressão de Akt e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> nos tempos de zero hora, 30 minutos, 3, 12, 24 e 48 horas após estimulação crônica. Não houve alterações da expressão de GSK-3 $\beta$  após estimulação crônica, mas houve aumentos nos tempos de zero hora, 30 minutos, 3, 12, 24 e 48 horas, na expressão de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>. Não houve alterações na expressão de Bad após estimulação crônica, mas houve aumentos de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> nos tempos de 30 minutos, 3 e 12 horas.

Abaixo encontram-se os valores estatísticos de cada comparação.

Não houve diferenças na expressão de Akt [F(6,35) = 1.53; p = 0.206] e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> [F(6,35) = 1.93; p = 0.111] após estimulação aguda (Figura 5A). Entretanto, houve aumentos significativos na expressão de Akt [F(6,35) = 26.17; p < 0.000001; controle x 0h t = 3.27; p = 0.002; controle x 0.5h t = 1.13; p < 0.000001; controle x 3h t = 10.03; p < 0.000001; controle x 12h t = 9.32; p < 0.000001; controle x 24h t = 6.18; p = 0.000001; controle x 48h t = 6.38; p < 0.000001] e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> [F(6,35) = 36.55; p < 0.000001; controle x 0h t = 4.97; p = 0.00003; controle x 0.5h t = 11.77; p < 0.000001; controle x 3h t = 11.17; p < 0.000001; controle x 12h t = 9.08; p < 0.000001; controle x 24h t = 4.48; p = 0.0001; controle x 48h t = 4.34; p = 0.0001] após estimulação crônica

(Figura 5A). Não houve alteração na expressão de Bad [F(6,35) = 1.19; p = 0.336] ou fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> [F(6,35) = 0.68; p = 0.660] após estimulação aguda (Figura 5B). Não houve alteração significativa na expressão de Bad [F(6,35) = 7.53; p = 0.000071; controle x 0h t = 4.84; p = 0.00004; controle x 0.5h t = 4.73; p = 0.00005; controle x 3h t = 4.30; p = 0.0001; controle x 12h t = 2.91; p = 0.006], nem de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> [F(6,35) = 6.13; p = 0.0003; controle x 0.5h t = 4.33; p = 0.0001; controle x 3h t = 4.37; p = 0.0001; controle x 12h t = 3.08; p = 0.004] após EEC crônica (Figura 5B). Não houve alteração na expressão de GSK-3 $\beta$  [F(6,35) = 1.70; p = 0.156] e fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> [F(6,35) = 1.12; p = 0.373] após EEC aguda (Figura 5C). Embora a expressão de GSK-3 $\beta$  total não ter sido alterada após estimulação crônica [F(6,35) = 0.867; p = 0.530], e expressão de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> foi significativamente aumentada [F(6,35) = 13.24; p < 0.000001; controle x 0.5h t = 6.01; p = 0.000002; controle x 3h t = 7.55; p < 0.000001; controle x 12h t = 4.13; p = 0.0003; controle x 24h t = 3.36; p = 0.002] (Figura 5C). As razões entre proteínas fosforiladas/totais foram analisadas através dos diferentes tempos (Figura 5D). A razão fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> / Akt não foi alterada após estimulação aguda [F(6,35) = 2.42; p = 0.052], mas houve aumento após EEC crônica [F(6,35) = 44.48; p < 0.000001; controle x 0h t = 10.38; p < 0.000001; controle x 0.5h t = 13.29; p < 0.000001; controle x 3h t = 10.77; p < 0.000001; controle x 12h t = 8.52; p < 0.000001; controle x 24h t = 4.31; p = 0.0001; controle x 48h t = 3.79; p = 0.0007]. Não houve alteração de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>/Bad após EEC aguda [F(6,35) = 1.84; p = 0.126], mas houve alterações após estimulação crônica [F(6,35) = 4.40; p = 0.002; controle x 0.5h t = 3.78; p = 0.0007; controle x 3h t = 3.98; p = 0.0004; controle x 12h t = 3.20; p = 0.003]. A razão fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>/ GSK-3 $\beta$  não foi alterada após estimulação aguda [F(6,35) = 1.22; p =

0.324], mas houve aumentos após estimulação crônica [ $F(6,35) = 28.42$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 0h t = 3.06;  $p = 0.004$ ; controle x 0.5h t = 8.99;  $p < 0.000001$ ; controle x 3h t = 11.19;  $p < 0.000001$ ; controle x 12h t = 7.71;  $p < 0.000001$ ; controle x 24h t = 6.23;  $p < 0.000001$ ; controle x 48h t = 4.68;  $p = 0.00006$ ].

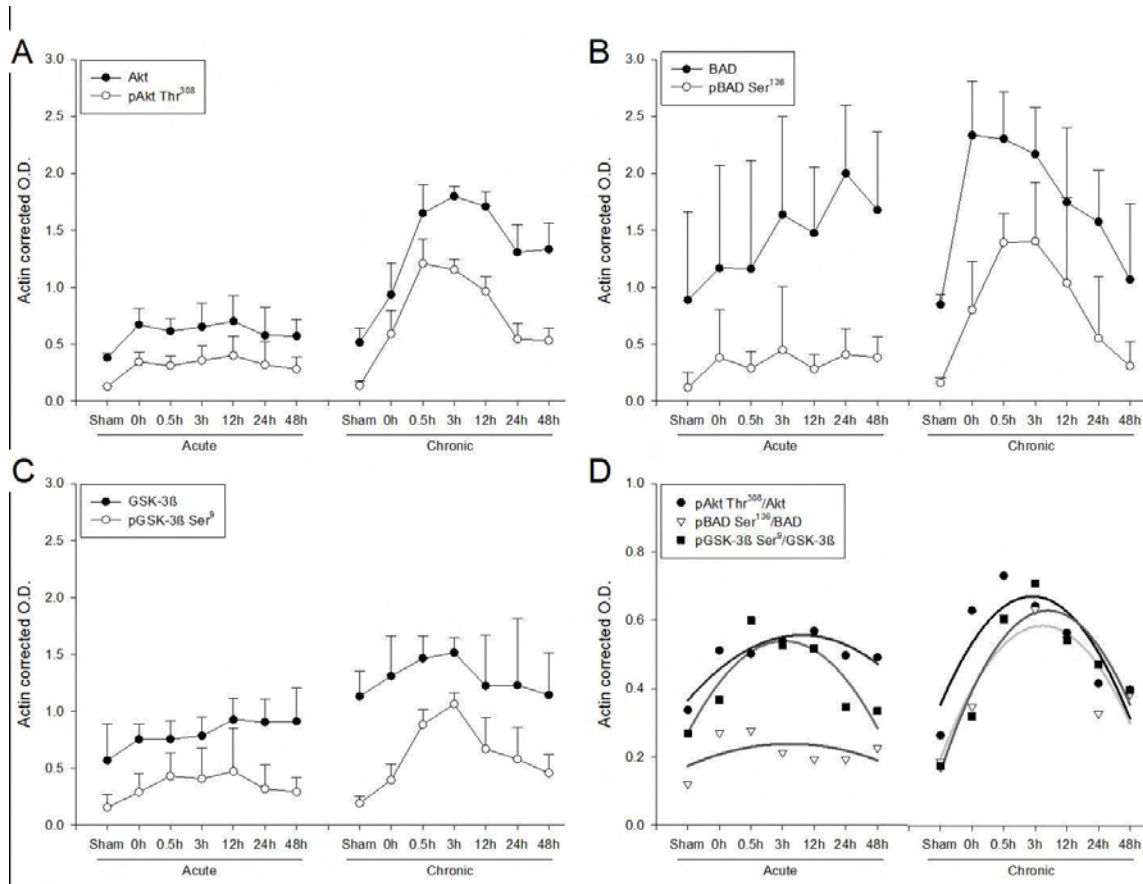


Figura 10: Níveis de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3β, fosfo-GSK-3β-Ser<sup>9</sup> no estriado após EEC aguda e crônica.



#### 4.6 - Efeito da EEC na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3 $\beta$ , fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> no hipocampo

Não houve alterações na expressão de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> e Bad, após estimulação aguda, mas houve aumentos na expressão de GSK-3 $\beta$ , nos tempos de zero hora, 30 minutos, 3 e 12 horas, e de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, nos tempos de 30 minutos e 3 horas. Houve aumentos em todas as proteínas analisadas, após estimulação crônica. Houve aumentos da expressão de Akt, nos tempos de zero hora, 30 minutos, 3, 12, 24 e 48 horas e de fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, nos tempos de 30 minutos e 3 horas. Houve aumentos na expressão de GSK-3 $\beta$ , nos tempos de zero hora, 30 minutos e 3 horas, e de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>, nos tempos de zero hora, 30 minutos, 3, 12, 24 e 48 horas. Houve aumentos na expressão de Bad, nos tempos de zero hora, 30 minutos, 3, 12, 24 e 48 horas, e de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, nos tempos de 30 minutos, 3, 12, 24 e 48 horas.

Abaixo encontram-se os valores estatísticos de cada comparação.

Não houve alterações na expressão de Akt [F(6,35) = 1.08; p = 0.398] e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> [equal variance < 0.05; H(6,35) = 9.20; p = 0.162] após estimulação aguda (Figura 6A). Entretanto, aumentos significativos da expressão de Akt [F(6,35) = 20.74; p < 0.000001; controle x 0h t = 7.71; p < 0.000001; controle x 0.5h t = 8.43; p < 0.000001; controle x 3h t = 7.57; p < 0.000001; controle x 12h t = 4.34; p = 0.0001; controle x 24h t = 2.53; p = 0.016; controle x 48h t = 2.68; p = 0.011] e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> [F(6,35) = 11.86; p = 0.000001; controle x 0h t = 3.63; p = 0.001; controle x 0.5h t = 6.55; p < 0.000001; controle x 3h t = 5.77; p = 0.000003; controle x 12h t = 2.70; p = 0.011] foram

observados após estimulação crônica (Figura 6A). Não foi observada alteração da expressão de Bad após estimulação aguda [ $F(6,35) = 2.41$ ;  $p = 0.052$ ]; houve aumentos da expressão de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> alterada [ $F(6,35) = 4.01$ ;  $p = 0.005$ ; controle x 3h t = 4.20;  $p = 0.0002$ ] após EEC aguda (Figura 6B). Houve aumentos significativos na expressão de Bad [ $F(6,35) = 22.73$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 0h t = 3.90;  $p = 0.0005$ ; controle x 0.5h t = 7.45;  $p < 0.000001$ ; controle x 3h t = 3.99;  $p = 0.0004$ ] e fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> [ $F(6,35) = 53.92$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 0h t = 5.51;  $p = 0.000007$ ; controle x 0.5h t = 13.77;  $p < 0.000001$ ; controle x 3h t = 4.93;  $p = 0.00003$ ; controle x 12h t = 2.88;  $p = 0.007$ ] após estimulação crônica (Figura 6B). Houve diferenças significativas na expressão de GSK-3 $\beta$  [ $F(6,35) = 2.75$ ;  $p = 0.031$ ; controle x 0h t = 2.85;  $p = 0.008$ ; controle x 0.5h t = 3.82;  $p = 0.0006$ ; controle x 3h t = 2.69;  $p = 0.017$ ; controle x 12h t = 2.59;  $p = 0.014$ ; controle x 24h t = 2.43;  $p = 0.021$ ], embora não tenha sido observada diferença na expressão de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> após estimulação aguda [ $F(6,35) = 2.24$ ;  $p = 0.068$ ] (Figura 6C). Aumento significativo da expressão de GSK-3 $\beta$  [ $F(6,35) = 8.40$ ;  $p = 0.00002$ ; controle x 0h t = 2.65;  $p = 0.012$ ; controle x 0.5h t = 4.44;  $p = 0.0001$ ; controle x 3h t = 5.66;  $p = 0.000004$ ; controle x 12h t = 4.18;  $p = 0.0002$ ; controle x 24h t = 2.83;  $p = 0.008$ ] e fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> [ $F(6,35) = 15.02$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 0.5h t = 5.31;  $p = 0.00001$ ; controle x 3h t = 7.45;  $p < 0.000001$ ; controle x 12h t = 4.91;  $p = 0.00003$ ; controle x 24h t = 2.60;  $p = 0.014$ ] após estimulação crônica foram observados (Figura 6C). As razões entre proteínas fosforiladas/totais foram analisadas através dos diferentes tempos (Figura 6D). Não houve alteração de fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>/Akt após estimulação aguda [ $F(6,35) = 1.05$ ;  $p = 0.420$ ], mas houve aumentos após EEC crônica [ $F(6,35) = 5.99$ ;  $p = 0.0004$ ; controle x 0.5h t = 4.53;  $p = 0.00009$ ; controle x 3h t = 4.35;  $p =$

0.0001]. Houve alterações de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>/Bad após estimulação aguda [ $F(6,35) = 4.49$ ;  $p = 0.002$ ; controle x 0.5h  $t = 4.01$ ;  $p = 0.0004$ ; controle x 3h  $t = 3.20$ ;  $p = 0.003$ ] e crônica [ $F(6,35) = 32.35$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 0h  $t = 4.99$ ;  $p = 0.00002$ ; controle x 0.5h  $t = 10.37$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 3h  $t = 4.07$ ;  $p = 0.0003$ ; controle x 12h  $t = 3.71$ ;  $p = 0.0008$ ]. Não houve alteração de fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>/ GSK-3 $\beta$  após estimulação aguda [ $F(6,35) = 1.15$ ;  $p = 0.355$ ], mas houve aumentos após EEC crônica [ $F(6,35) = 15.62$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 0.5h  $t = 6.14$ ;  $p = 0.000001$ ; controle x 3h  $t = 7.20$ ;  $p < 0.000001$ ; controle x 12h  $t = 5.23$ ;  $p = 0.00001$ ; controle x 24h  $t = 3.29$ ;  $p = 0.002$ ].

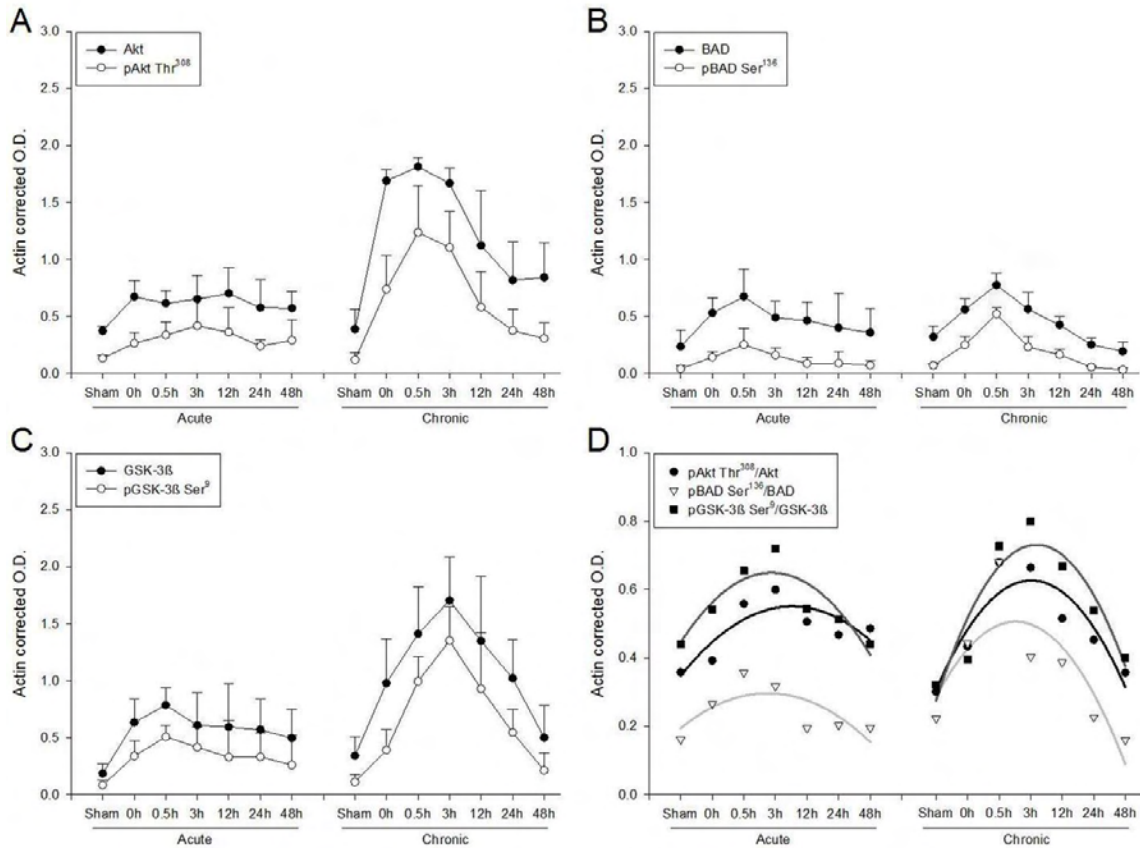


Figura 11: Níveis de Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad, fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3 $\beta$ , fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> no hipocampo após EEC aguda e crônica

|                      | Akt |  |  |  |  |  | pAkt Thr <sup>308</sup> |  |  |  |  |  | pAkt Thr <sup>308</sup><br>/Akt |  |  |  |  |  | BAD |  |  |  |  |  | pBAD Ser <sup>136</sup> |  |  |  |  |  | pBAD Ser <sup>136</sup><br>/BAD |  |  |  |  |  | GSK-3β |  |  |  |  |  | pGSK-3β |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|----------------------|-----|--|--|--|--|--|-------------------------|--|--|--|--|--|---------------------------------|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|--|--|-------------------------|--|--|--|--|--|---------------------------------|--|--|--|--|--|--------|--|--|--|--|--|---------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Prefrontal<br>cortex |     |  |  |  |  |  |                         |  |  |  |  |  |                                 |  |  |  |  |  |     |  |  |  |  |  |                         |  |  |  |  |  |                                 |  |  |  |  |  |        |  |  |  |  |  |         |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Tabela 1 – Valores estatisticamente significativos após ECS.

Córtex pré-frontal – estimulação aguda:

| proteínas                | 0h | 30min | 03h | 12h | 24h | 48h |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Akt                      |    |       |     |     |     |     |
| pAkt Thr <sup>308</sup>  |    |       |     |     |     |     |
| Bad                      |    |       |     |     |     |     |
| pBad Ser <sup>136</sup>  |    |       |     |     |     |     |
| GSK-3β                   |    |       |     |     |     |     |
| pGSK-3β Ser <sup>9</sup> |    |       |     |     |     |     |

Córtex pré-frontal – estimulação crônica:

| proteínas                | 0h | 30min | 03h | 12h | 24h | 48h |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Akt                      |    |       |     | X   |     |     |
| pAkt Thr <sup>308</sup>  |    |       |     | X   |     |     |
| Bad                      |    |       |     |     |     |     |
| pBad Ser <sup>136</sup>  |    |       | X   | X   |     |     |
| GSK-3β                   |    |       |     |     |     |     |
| pGSK-3β Ser <sup>9</sup> | X  | X     | X   | X   | X   | X   |

Estriado – estimulação aguda:

| proteínas                | 0h | 30min | 03h | 12h | 24h | 48h |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Akt                      |    |       |     |     |     |     |
| pAkt Thr <sup>308</sup>  |    |       |     |     |     |     |
| Bad                      |    |       |     |     |     |     |
| pBad Ser <sup>136</sup>  |    |       |     |     |     |     |
| GSK-3β                   |    |       |     |     |     |     |
| pGSK-3β Ser <sup>9</sup> |    |       |     |     |     |     |

Estriado – estimulação crônica:

| proteínas                | 0h | 30min | 03h | 12h | 24h | 48h |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Akt                      | X  | X     | X   | X   | X   | X   |
| pAkt Thr <sup>308</sup>  | X  | X     | X   | X   | X   | X   |
| Bad                      |    |       |     |     |     |     |
| pBad Ser <sup>136</sup>  |    | X     | X   | X   |     |     |
| GSK-3β                   |    |       |     |     |     |     |
| pGSK-3β Ser <sup>9</sup> | X  | X     | X   | X   | X   | X   |

Hipocampo – estimulação aguda:

| proteínas                | 0h | 30min | 03h | 12h | 24h | 48h |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Akt                      |    |       |     |     |     |     |
| pAkt Thr <sup>308</sup>  |    |       |     |     |     |     |
| Bad                      |    |       |     |     |     |     |
| pBad Ser <sup>136</sup>  |    | X     | X   |     |     |     |
| GSK-3β                   | X  | X     |     |     |     |     |
| pGSK-3β Ser <sup>9</sup> |    |       |     |     |     |     |

Hipocampo – estimulação crônica:

| proteínas                | 0h | 30min | 03h | 12h | 24h | 48h |
|--------------------------|----|-------|-----|-----|-----|-----|
| Akt                      | X  | X     | X   | X   | X   | X   |
| pAkt Thr <sup>308</sup>  |    | X     | X   |     |     |     |
| Bad                      | X  | X     | X   |     |     |     |
| pBad Ser <sup>136</sup>  | X  | X     | X   | X   |     |     |
| GSK-3β                   | X  | X     | X   | X   | X   |     |
| pGSK-3β Ser <sup>9</sup> |    | X     | X   | X   | X   |     |

Tabela 2 – resumo dos resultados



## 5-Discussão

Nutt e Gutt (2008) revisaram os efeitos de um tratamento com oito sessões de ECT e propuseram que ECT influencia neurotransmissores monoaminérgicos em cada estágio do tratamento. Após a primeira e segunda estimulações, observou-se aumento na função do receptor de dopamina, e os pacientes melhoraram o apetite e motivação. Depois da estimulação eletroconvulsiva inicial, pacientes com depressão grave (mesmo com apenas uma estimulação) podem, algumas vezes, ter um curto período, no qual aceitam água e comida e depois retornam ao estado depressivo. Após estimulações adicionais, o interesse dos pacientes torna-se mais duradouro e, com o tempo, apetite e motivação são recuperados. O que sugere uma ligação direta entre esta mudança da função dopaminérgica e estes comportamentos.



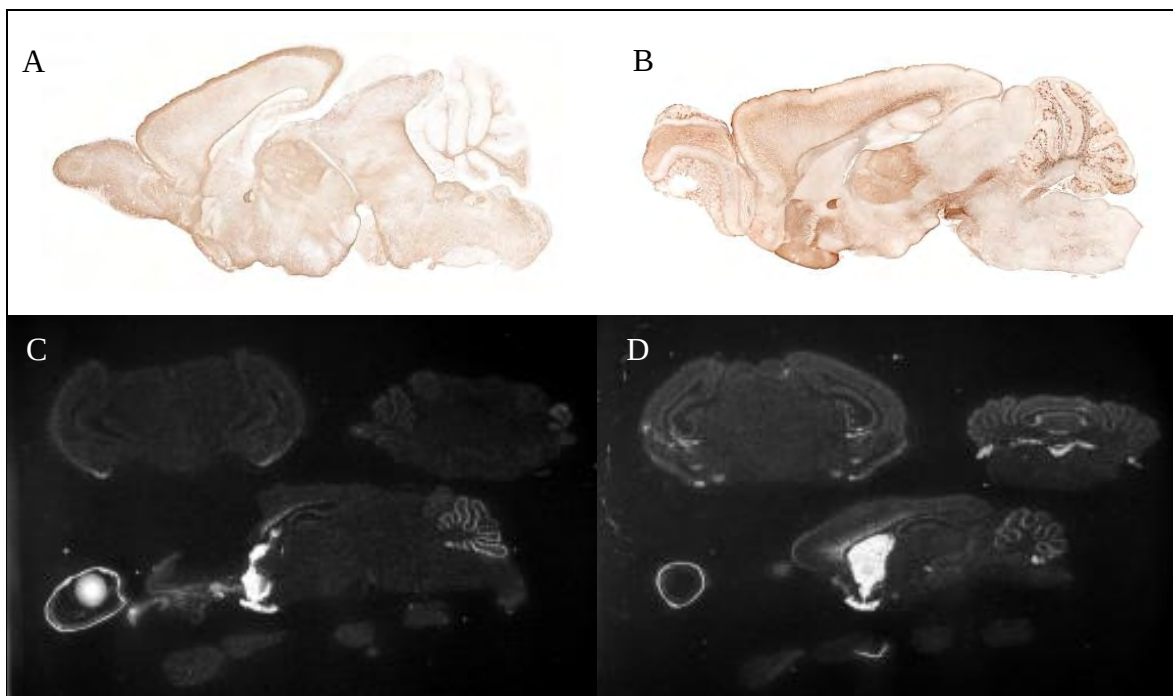
Da terceira a quinta estimulações, há aumento da norepinefrina sináptica. Os mecanismos para este aumento devem-se, provavelmente, a algumas mudanças na regulação de receptores auto-inibitórios, que inibem a liberação de norepinefrina, e torna-se dessensibilizado depois de algumas estimulações. Esta dessensibilização leva ao aumento de norepinefrina, que leva ao aumento da energia e atenção. Neste ponto, os pacientes tornam-se mais ativos apesar de ainda apresentarem ideação depressiva .

Da sexta a oitava estimulações, grandes benefícios para os pacientes podem ser vistos quando os sintomas da depressão remitem completamente. A função serotoninérgica é aumentada neste estágio do tratamento, e acredita-se estar associada com mudança positiva no comportamento, perda da negatividade na cognição, e fim da ansiedade que frequentemente coexiste com depressão (Nut e Gutt, 2008).

Baseado em dados provenientes de estudos de tratamentos farmacológicos e ECT, é possível relacionar sintomas da depressão a mecanismos neuroquímicos específicos. Norepinefrina pode estar relacionada a alerta e energia, bem como ansiedade, atenção e interesse no cotidiano da vida; serotonina à ansiedade, obsessões e compulsões; e dopamina à atenção, motivação, prazer e recompensa, bem como interesse. Aumento de um destes três neurotransmissores pode elevar o humor, mas outros elementos da depressão podem ser particularmente responsáveis para um determinado neurotransmissor.

Já foi mostrado que a sinalização dopaminérgica realça a expressão de DARPP-32 e sua fosforilação. Nomikos e cols (1991) mostraram aumento dos níveis estriatais de dopamina superior a 1310% do nível basal com a administração da EEC. Yoshida e cols. (1997) mostraram maiores efeitos das concentrações extracelulares de dopamina, pós-EEC, no estriado comparado ao córtex frontal. Nossos resultados também mostraram que a fosforilação da DARPP-32 induzida por EEC foi maior no estriado que no córtex pré-frontal. EEC aguda não aumentou a expressão de DARPP-32, nem de fosfo-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> em nenhuma região cerebral analisada. EEC crônica induziu mudanças significativas na expressão de DARPP-32 e fosfo-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> no córtex pré-frontal, estriado e expressão de DARPP-32 no tempo de zero hora no hipocampo. Estes resultados corroboram nossos resultados prévios, que mostram alteração da expressão proteica, principalmente após EEC crônica (Rosa e cols. 2007). Têm sido proposto que os maiores benefícios da ECT são por tratamento crônico e sessões repetidas na prática clínica (Tess e Sametana, 2009). O relato da maioria dos estudos que avaliaram expressão proteica ou liberação de neurotransmissor é de que mudanças mais significativas acontecem mais após EEC crônica, que EEC aguda (Nomikos et al. 1991, Nibuya et al. 1995, Smith and Sharp 1997, Yoshida et al. 1997, Hsieh et al. 1998, Yoshida et al. 1998, Zetterstrom et al. 1998, Glass 2001), o que corrobora dados estatisticamente significativos após estimulação crônica.

Há radioimunoensaios que indicam a presença de DARPP-32 no estriado, córtex, hipocampo, que foram confirmados pelos dados encontrados, para essas, regiões neste trabalho (figura 7).

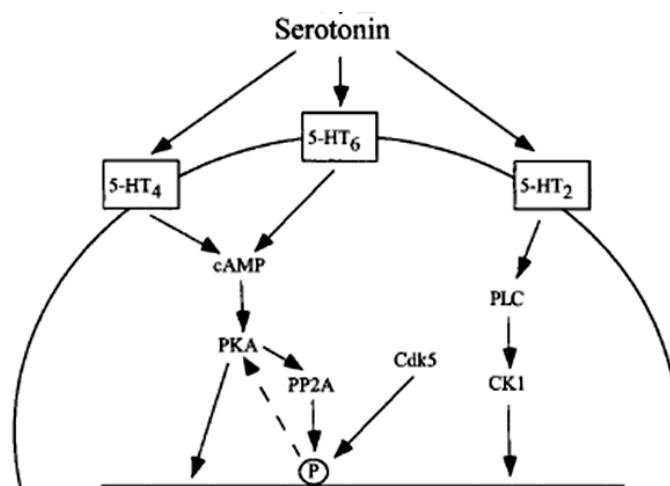


**Figura 12:** Níveis de proteicos (A, B) e de RNAm (C,D) de DARPP-32 em cérebros de ratos (modificado de <http://www.pubmed.com>).

Guitari e Nestler (1992) demonstraram indução de aumento da imunoreatividade de DARPP-32 por administração crônica de lítio. Administração crônica de imipramina ou tanilcipromina produziu aumento similar nos níveis da DARPP-32 no córtex frontal. Níveis aumentados de DARPP-32 podem refletir um efeito funcional comum no córtex frontal após exposição de longo tempo ao lítio e outros medicamentos antidepressivos, um efeito possivelmente relacionado às ações clínicas destes medicamentos. No córtex pré-frontal, a dopamina tem papel definido na regulação da atenção e motivação. Apesar da falta de forte evidência, acredita-se que uma relativa disfunção da dopamina no córtex pré-frontal possa contribuir para a perda de energia mental, perda da iniciativa e fadiga, que comumente acompanham a depressão (Nutt e cols., 2008). Nossos resultados

mostraram aumento na expressão de DARPP-32 e fosfo-DARPP-32-Thr<sup>34</sup>, em vários tempos de estimulação, no córtex pré-frontal pós-estimulação crônica.

Sabe-se, também, que córtex pré-frontal e estriado recebem fibras, convergentes, aferentes serotoninérgicas e dopaminérgicas. Foi demonstrado que EEC tem efeitos no sistema serotoninérgico, como: aumento da transmissão serotoninérgica no hipotálamo, via dessensibilização de auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub>; diminuição da expressão de RNAm do transportador de serotonina (5-HTT); e/ou aumento do receptor 5-HT<sub>2A</sub> por protocolos de EEC aguda e crônica. Estes dados podem explicar, parcialmente, a eficácia da ECT na depressão resistente à farmacoterapia (Dremencov e cols., 2002). Regulação de DARPP-32 induzida por serotonina foi, também, demonstrada por Svenningsson (2002), sendo mediada primariamente via ativação de 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>6</sub>, regulando a fosforilação na Thr<sup>34</sup> e Thr<sup>75</sup>, enquanto a regulação da Ser<sup>137</sup> era mediada primariamente por receptores 5-HT<sub>2</sub>. Estes três caminhos parecem inibir PP1 através de mecanismos sinérgicos. Sabe-se que a desfosforilação de CREB está sob o controle de PP1. De acordo com o que tem sido proposto, sugere-se um possível aumento nos níveis de expressão da DARPP-32, não apenas pela ativação da via dopaminérgica através de receptores de dopamina do tipo 1 (D<sub>1</sub>), mas possivelmente por ativação de receptores serotoninérgicos (figura 8).





**Figura 13:** Vias pelas quais a transmissão serotoninérgica pode regular o estado de fosforilação da DARPP-32. Modificado de Svenningsson e cols., 2002.

Outra possível explicação para a alteração dos níveis de DARPP-32 são as possíveis ações do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na expressão desta proteína. O BDNF pertence a uma família de neurotrofinas que interage com alta afinidade aos receptores de proteína quinase (TrK). O gene do BDNF apresenta uma estrutura complexa com múltiplos elementos regulatórios e quatro promotores que são expressos diferencialmente nos tecidos centrais e periféricos (Nagatsu e Sawada, 2005).

Neurotrofinas regulam a sobrevivência e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento, mas evidências crescentes também indicam que elas estão envolvidas em várias funções na fase adulta, incluindo processos de plasticidade. A expressão de BDNF no sistema nervoso central é modificada por vários tipos de injúrias cerebrais (estresse, isquemia, atividade convulsiva, hipoglicemia, entre outras) e alterações na sua expressão podem contribuir para algumas patologias, como depressão, epilepsia, doença de Alzheimer e de Parkinson.

Em cultura de células estriatais embrionárias de camundongos, a dopamina tem sido mostrada capaz de regular os níveis de RNAm e proteína de BDNF através da ativação de receptores D<sub>1</sub>. Além disso, o elemento responsivo à AMPc (CRE) foi identificado no promotor III do BDNF humano, que participa da modulação dopaminérgica na expressão de BDNF via receptor do tipo D<sub>1</sub>. Estes dados apontam para a importância da regulação dopaminérgica do BDNF na via nigroestriatal (Fang e cols, 2003; Kuppers e cols, 2001)

Relata-se que a indução de convulsões químicas ou elétricas aumenta a expressão de BDNF e de seu receptor TrkB no cérebro de roedores. Estudos sugerem que a ativação dos receptores NMDA contribui para a regulação do BDNF e para as mudanças morfológicas a ela associadas (Zetterstrom e cols., 1998). As cascatas a partir da ativação do BDNF promovem aumento na fosforilação de CREB, que é um fator de transcrição, e pode favorecer o aumento na expressão de DARPP-32.

Além do estriado, receptores D<sub>1</sub> são expressos no córtex e regiões límbicas, que enviam projeções glutamatérgicas para o estriado. Ativação de receptores D<sub>1</sub> podem afetar a liberação de glutamato estriatal, que pode resultar em mudanças na fosforilação de ambas, Thr<sup>34</sup> e Thr<sup>75</sup>, em neurônios estriato-nigrais e estriato-palidais (Nishi e cols., 2005).

Receptores D<sub>1</sub> também foram encontrados nos terminais estriato-nigrais, e estimulação destes receptores pode aumentar a liberação de GABA na área tegumentar ventral. Isto

poderia resultar em níveis dopaminérgicos estriatais diminuídos e poderia explicar o aumento observado na fosforilação da Thr<sup>34</sup> em neurônios D2 (Bateup e cols., 2008). Pode-se observar nos nossos resultados aumento na expressão de DARPP-32 e fosfo-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> em vários tempos, no estriado, após estimulação crônica.

Antidepressivos inibidores da recaptação seletiva de serotonina (SSRI), como a fluoxetina, têm mostrado realçar a sinalização de PKA em vários níveis, no hipocampo e córtex frontal (Svenningsson e cols., 2002). Depressão e sintomas depressivos estão frequentemente presentes em pacientes com esquizofrenia. Uma variedade de mudanças no sistema serotoninérgico são associadas com comportamento suicida em ambos, transtornos do humor e psicótico (De Luca e cols., 2007). Baseado na associação de mudanças no sistema serotoninérgico e suicídio, relatos prévios de alterações da DARPP-32 na esquizofrenia e interação entre sinalização serotoninérgica e DARPP-32, Feldcamp (2008) analisou a expressão de DARPP-32, em cérebro pós-morte, de pacientes com esquizofrenia que morreram por suicídio e relatou associação da diminuição da expressão de RNAm de DARPP-32 e suicídio em pacientes com esquizofrenia.

Os resultados demonstraram que EEC aguda não alterou a expressão de DARPP-32 e fosfo-DARPP-32-Thr<sup>34</sup>, mas estimulação crônica induziu aumento de DARPP-32 e fosfo-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> em vários tempos após a última estimulação no córtex pré-frontal e estriado, e no tempo zero no hipocampo, o que corrobora com prévios resultados do nosso grupo. A indução de DARPP-32 afeta vários caminhos de sinalização diferentes, como os que envolvem receptores, canais iônicos e fatores de transcrição

(Svenningsson e cols., 2004; Greengard, 2001). Resultados na expressão de proteínas envolvidas nestas sinalizações são relevantes para distúrbios psiquiátricos e tratamento, particularmente ECT e podem contribuir para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela melhora clínica do paciente.

Sugere-se que um dos mecanismos pelos quais a ECT acarreta em melhora clínica seja através de mecanismos de plasticidade glial e neuronal, com destaque para a enolase neuronal específica (Manev e cols., 2003). Enolase neuronal específica (NSE) é uma enzima de sinalização glicolítica, sendo a isoforma  $\gamma\gamma$  predominantemente neuronal. Uma vez que NSE não é fisiologicamente secretada, aumentos nos níveis periféricos têm sido relacionados, especificamente, a dano neuronal, como mostrado em danos cerebrais traumáticos (Herrmann e cols., 1999) e crises epilépticas (Rabinowicz e cols., 1996). Busnello e cols (2006) mostraram que níveis de NSE no líquido cérebro-espinhal, de ratos, permaneceu constante, em todas as medidas, em modelos de estimulação eletroconvulsiva aguda e crônica. Estes resultados estão de acordo com trabalhos que sugerem que EEC não causa dano neuronal.

Ainda assim, um dos objetivos da biologia moderna é elucidar quais são os mecanismos envolvidos na “decisão celular” para morte celular programada. Apoptose é um processo complexo, que é controlado não apenas por sinais externos, mas também por um programa genético interno (Viegas, 2008). Estudos avaliando a expressão de proteínas envolvidas nesta sinalização ainda são escassos. Os resultados deste trabalho mostraram alterações significativas na expressão das seguintes proteínas: Akt, fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, Bad,



fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, GSK-3 $\beta$ , fosfo-GSK-3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup>, após EEC, principalmente estimulação crônica. Tais proteínas participam da sinalização apoptótica e o aumento observado nos resíduos de fosforilação sugere “neuroproteção” após EEC.

Fosfatidilinositol 3-Kinase (PI3K) exerce um papel crucial nas alterações dos efeitos em amplas funções celulares em resposta à sinais extracelulares. Um efetor chave de PI3K é Akt, que em resposta à ativação de PI3K fosforila e regula a atividade de vários alvos, incluindo quinases, fatores de transcrição e outras moléculas regulatórias. Akt é regulador chave de várias funções celulares críticas, como metabolismo de glicose, proliferação celular e sobrevivência. Ativação de Akt envolve ambos, ligação à membrana e fosforilação.

Foi descrito que camundongos *Knock-out* para Akt1 são menores e têm tempo de vida menor quando expostos à estresse genotóxico, comparado com selvagens. Além disso, eles mostram aumento da apoptose espontânea (Chen e cols., 2001; Cho, Mu e cols., 2001).

Tem sido mostrado que EEC induz neurogênese no hipocampo de ratos e esta é uma região relacionada à patogênese de desordens psiquiátricas, como depressão (Madsen e cols., 2000; Scott e cols., 2000). Os efeitos da EEC na sinalização PI3K-Akt no cérebro de ratos não é bem definida (Kang e cols., 2004). Relata-se que ativação de PI3K-Akt está envolvida, independente do seu papel no desenvolvimento e sobrevivência celular, na memória e plasticidade sináptica (Li e cols., 2001; Sweatt, 2001). Estes dados também

sugerem que o sistema PI3K-Akt é um dos mediadores potenciais dos efeitos moleculares da EEC. Foi mostrado por Kang e cols (2004) que EEC ativa Akt no hipocampo de ratos.

Foi analisada por Brywe e cols. (2005) a expressão de Akt após injúria cerebral, no hipocampo e córtex cerebral. Após dano cerebral, por isquemia hipóxica, Brywe cols (2005) mostraram que o efeito protetor cerebral foi acompanhado por aumento da fosforilação de Akt. Fosforilação de Akt pode inibir apoptose por inativar vários alvos pró-apoptóticos, incluindo Bad e GSK-3 (Datta e cols., 1997; Pap e Cooper, 1998). Nossos resultados corroboram estes dados e mostrando aumentos na fosforilação da Akt-Thr<sup>308</sup>, no hipocampo, após EEC crônica. Houve aumentos na expressão de Akt e fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup>, em vários tempos analisados, no estriado e em alguns tempos no córtex pré-frontal, após estimulação crônica.

Existem evidências de que a sinalização por Akt tem um papel na patogênese da esquizofrenia. Estas incluem evidências convergentes para diminuição dos níveis proteicos de Akt1 e níveis da fosforilação do substrato em cérebro de alguns indivíduos com esquizofrenia (Emamian e cols., 2004; Zhao e cols., 2006) e evidências farmacológicas indicando que medicamentos usados no controle de psicoses, como lítio, haloperidol e clozapina, podem agir como ativadores da sinalização de Akt in vivo (Emamian e cols., 2004; Beaulieu e cols., 2004), ou in vitro (Beaulieu e cols., 2005). Além disso, Akt é chave de uma sinalização intermediária do receptor D2, alvo de medicamentos antipsicóticos melhor estabelecido. A função de Akt é importante para transmissão dopaminérgica normal e expressão de comportamentos associados à

dopamina (Beaulieu e cols., 2005) em várias maneiras distintas, mas talvez cooperativo com DARPP-32, tradicionalmente associada com receptores D1.

Dados diversos e convergentes de ambos, in vivo e relatos pós-morte, sugerem que o córtex pré-frontal seja central na fisiopatologia da esquizofrenia (Mirnics, 2001; Davis e cols., 2003). Embora estudos de indivíduos com esquizofrenia sejam, em princípio, confundidos pelo efeito do tratamento e do curso da doença, estudos mais recentes em modelos animais têm levado a genes candidatos à susceptibilidade (Paterlini e cols., 2005; Koike e cols., 2006), que são livres de influências, e também revelaram déficits no funcionamento do córtex pré-frontal. Trabalhos em modelos animais têm mostrado que atividade de Akt correlaciona e modula os efeitos da transmissão dopaminérgica no gating sensorio-motor (Emamian e cols., 2004) e atividade locomotora (Beaulieu e cols., 2004), dois comportamentos usados como modelo para sintomas positivos, da doença, em camundongos. Foi mostrado por Lai e cols (2006) que a deficiência de *Akt1* cria um contexto permissivo para interações gene-gene e gene-ambiente, que pode modular o funcionamento do córtex pré-frontal e afetar o risco à doença e expressão da síndrome clínica.

A replicação da associação do gene *Akt1* em amostras de famílias, em indivíduos caucasianos, reforça o envolvimento da sinalização de Akt na esquizofrenia, talvez compreendendo um fenótipo clínico maior, que inclui desordens do humor. Foi mostrado por Thiselton e cols (2008) que a sinalização de Akt pode estar comprometida em pacientes com esquizofrenia e transtorno do humor bipolar, via expressão reduzida de RNAm para específicas isoformas de Akt.

Relata-se que espécies reativas a oxigênio, derivadas de hipóxia e reoxigenação durante isquemia cerebral focal transitória, são associadas com vias de sinalização que levam a morte ou sobrevivência neuronal, dependendo da severidade e duração do insulto isquêmico. A sinalização de sobrevivência de Akt é regulada por estresse oxidativo. Song e cols (2008) induziram isquemia cerebral moderada em camundongos, mais especificamente no córtex e estriado. Após a utilização do inibidor da fosforilação de Akt, houve aumento do volume do infarto isquêmico e fragmentação do DNA relacionada à apoptose. Apesar de não existirem muitos dados avaliando a expressão de Akt após EEC, fica clara a importância desta via de sinalização, principalmente quando relacionada a possíveis danos cerebrais. Os resultados deste estudo confirmam dados da literatura e foi observado aumento da fosforilação de Akt, que indica proteção em relação à apoptose.

Foi demonstrado em vários estudos que Akt fosforila várias moléculas de sinalização, como GSK-3 (Brunet e cols., 2001; Kandel and Hay, 1999). GSK-3 é ativo constitutivamente e pode ser inativado através da fosforilação de resíduos de serina, Ser<sup>21</sup> (GSK-3 $\alpha$ ) e Ser<sup>9</sup> (GSK-3 $\beta$ ), dos seus respectivos domínios regulatórios amino-terminal (Joje e Johnson, 2004). Estudos da sinalização celular alterada em resposta à persistentes níveis elevados de dopamina celular identificaram uma redução na fosforilação/atividade de Akt e uma ativação concomitante de ambos, GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  no estriado de camundongos knockout para o transportador de dopamina (DAT-KO).

Foi demonstrado que ativação de PI3K e que a fosforilação de Akt medeiam sobrevivência neuronal induzida por fator de crescimento in vitro (Kulik e cols., 1997). Como dito, fosforilação de Akt pode inibir apoptose por inativar vários alvos pró-apoptóticos (Datta e col., 1997; Pap e Cooper., 1998; Brunet e cols., 1999). GSK-3 $\beta$  tem papel na apoptose e tem sido sugerido ser um alvo chave da sinalização de sobrevivência PI3K/Akt (Pap e Cooper, 1998). Após isquemia hipóxica em cérebros de ratos, GSK-3 $\beta$  é ativado por desfosforilação e translocado para o núcleo, onde pode contribuir para o dano cerebral (Brywe e cols., 2005), e já foi mostrado que a inibição de GSK-3 $\beta$  reduz o tamanho do infarto em modelo de trauma (Kelly e cols., 2003).

A descoberta que o lítio inibia diretamente GSK-3 (Klein e Melton, 1996) introduziu o conceito que esta ação pode contribuir para os efeitos terapêuticos, e que GSK-3 poderia estar desregulada nos transtornos do humor. Foi demonstrado que tratamento crônico (4 semanas), in vivo, com doses terapeuticamente relevantes de lítio aumentou em várias vezes a fosforilação da Ser<sup>9</sup> da GSK-3 em regiões cerebrais de camundongo (De Sarno e cols., 2002). Aumento na fosforilação da serina, seguido de administração de lítio indica que efeito inibitório moderado do lítio na GSK-3 é amplificado por este mecanismo de fosforilação.

Outras terapias usadas para transtornos do humor também tem sido relacionadas à inibição desta proteína. É intrigante o fato de que três terapias para estabilização do humor, lítio, ácido valpróico e eletroconvulsoterapia tenham mecanismo de ação comum,

gerando inibição de GSK-3. Estes relatos suportam as evidências de que a inibição de GSK-3 contribui para ações terapêuticas dos estabilizadores do humor.

Evidências mais diretas de prejuízo na sinalização Akt/GSK-3 em indivíduos com esquizofrenia foi relatada. Emamian e cols. (2004) relataram diminuição de aproximadamente 50% nos níveis proteicos da Akt1 no córtex frontal e em linfócitos de indivíduos com esquizofrenia comparado com controles. Administração de haloperidol em camundongos aumentou a ativação da fosforilação de Akt e a fosforilação da serina de GSK-3 no cérebro. A diminuição da sinalização de Akt para GSK-3 na esquizofrenia e modulação corretiva por antagonista dopaminérgico suporta um papel potencial da sinalização acoplada ao receptor de dopamina para Akt e GSK-3 na patogênese da esquizofrenia. Também foram relatado níveis diminuídos da fosforilação da ser<sup>9</sup>-GSK-3 em amostras de indivíduos com esquizofrenia comparados com controles, como avaliado por análises de imunoblot (Emamian e cols., 2004).

Medicamentos que agem na neurotransmissão serotoninérgica, como SSRI, inibidores da monoamina oxidase e antidepressivos tricíclicos, tem mostrado inibir GSK-3 $\beta$  por aumentar a fosforilação na região amino-terminal em várias regiões cerebrais, como: córtex frontal, hipocampo e estriado de camundongos normais (Beaulieu e cols., 2004). Antipsicóticos típicos, como haloperidol, exercem a maioria das suas ações por bloquear receptores de dopamina do tipo D2, sugerindo papel para neurotransmissão dopaminérgica na etiologia da esquizofrenia. É possível que a regulação da sinalização Akt/GSK-3 por receptores D2 possa ser crítica para a ação de antipsicóticos típicos (Jope

e Roh, 2006). Além disso, antipsicóticos atípicos têm mostrado ativar Akt por aumentar a fosforilação do seu substrato, GSK-3 $\beta$ . Nossos resultados corroboram a ação de antipsicóticos e medicamentos que agem na sinalização serotoninérgica e houve aumentos na expressão de fosfo-Akt-Thr<sup>308</sup> e fosfo-GSK3 $\beta$ -Ser<sup>9</sup> após estimulação crônica no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal; uma vez que ECT é usada no tratamento de desordens psiquiátricas, o possível envolvimento na ação de drogas psicotrópicas aumenta a possibilidade de que essas moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de várias condições psiquiátricas, como esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão maior. Além disso, redução nos níveis proteicos de Akt tem sido observado no cérebro de pacientes com esquizofrenia .

Um dos mecanismos pelos quais a fosforilação mediada por Akt resulta em inibição do substrato, é através da regulação da localização subcelular por interação com proteínas 14-3-3 (por exemplo, Bad). Proteínas 14-3-3 são proteínas citoplasmáticas que ligam especificamente a fosfoproteínas e as retém no citoplasma (Yaffe e cols., 1997), longe dos seus alvos. Em particular, o sítio consenso de fosforilação de Akt, é também o de ligação com proteínas 14-3-3 (Yaffe e cols., 2001). Por exemplo, a fosforilação de Bad, por Akt, inibe o efeito pró-apoptótico. No estado não fosforilado, Bad é levado para mitocôndria, onde forma um complexo com Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ou Bcl-XL, inibindo a atividade anti-apoptótica destes. Quando fosforilado, Bad associa a proteínas 14-3-3 no citoplasma. Middleton e cols (2005) relataram que o transcrito beta 14-3-3 poderia ser o único entre os genes 14-3-3 a estar associado com aumento na resposta à haloperidol e diminuição no estado da doença. Lee e cols (2009) relataram aumento da

expressão da proteína 14-3-3 zeta/delta em cérebro de ratos tratados com EEC. Estes dados sugerem uma associação com mecanismos terapêuticos da ECT nos sintomas psicóticos. Foi demonstrado por Jeon (2008) aumento da ligação de Bad a proteínas 14-3-3, sugerindo que repetidas EEC sequestram o Bad apoptótico e liberam Bcl-XL (pró-sobrevivência). A inativação de Bad pode ser um mecanismo anti-apoptótico observado após repetidas EEC no córtex frontal de ratos (Jeon e cols., 2008).

Análise estrutural e funcional indicam que o papel chave para fatores de sobrevivência é inibir a atividade de Bad. Na ausência de estímulo de sobrevivência, Bad endógeno é desfosforilado e encontrado na membrana mitocondrial externa. Fatores de sobrevivência, agindo através de quinases como Akt e PKA, induzem fosforilação de Bad endógeno em dois sítios evolucionariamente conservados, Ser<sup>112</sup> e Ser<sup>136</sup>, que levam a translocação de Bad da mitocôndria para o citoplasma e inibição da morte dependente de Bad (revisado por Datta e cols., 1999; Datta, 2000).

Sabe-se que entre as moléculas de regulação central da morte celular em eucariotos, estão membros da família Bcl-2. Já foi descrito que a expressão de BDNF e Bcl-2 são reguladas por CREB, e tem papéis importantes na sobrevivência celular, plasticidade, crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses (Lindholm e cols., 1993). BDNF é expresso, em humanos, no hipocampo e cerca o neocórtex através do desenvolvimento, maturação e envelhecimento, e está envolvido no crescimento inicial e manutenção dos neurônios através da vida. Bcl-2 age como proteína de sobrevivência celular anti-apoptótica e tem atividade neurotrófica no sistema nervoso central (Adams e



Cory, 1998). Níveis proteicos diminuídos de BDNF e Bcl-2 tem sido relacionados com a patogênese do transtorno bipolar.

Neuroproteção pode ser importante no tratamento do transtorno bipolar, uma vez que estudos in vivo e pós-morte revelaram atrofia cerebral significativa em pacientes com este diagnóstico, com diminuição da espessura cortical, bem como números reduzidos e/ou tamanho da glia e neurônios. Estas mudanças foram atribuídas a fatores de sobrevivência neuronal reduzidos.

Estabilizadores do humor, como carbamazepina (CBZ) e lamotrigina (LTG), são aprovados pelo FDA como monoterapia para o transtorno bipolar. CBZ é mais usada para tratamento da mania, enquanto LTG é mais usada para fase depressiva e ciclagem rápida. O mecanismo comum destes dois medicamentos pode envolver a correção de caminhos de sinalização em áreas cerebrais específicas e prevenção da perda de células cerebrais e atrofia pelos efeitos no BDNF e Bcl-2, entre outros fatores. A este respeito, dois estabilizadores do humor aprovados, lítio e valproato (VPA), aumentaram níveis cerebrais de BDNF e Bcl-2 quando administrados cronicamente em ratos (Chuang, 2005).

Não existe consenso de como a transcrição de Bcl-2 no cérebro é supra-regulada por administração crônica de estabilizadores do humor. Estudos sugerem que BDNF pode regular os níveis de Bcl-2 através da ativação de MAPK e fosforilação de CREB (Bonni, 1999). Bcl-2 is reprimido por AP-2 (activator protein (AP)-2 transcription factor), que pode induzir apoptose. Administração crônica de CBZ diminui a atividade de ligação de

AP-2 ao DNA e a subunidade AP-2 $\alpha$  no córtex frontal de ratos, que pode permitir o aumento da proteína Bcl-2.

Pode-se concluir que administração crônica de CBZ e LTG, em ratos, supra-regula os níveis proteicos e RNAm de BDNF e Bcl-2, no córtex frontal. Este efeito comum, comparado com os relatos sobre VPA e lítio, sugere que estabilizadores do humor no transtorno bipolar tem ação de regular as reduções nos níveis de BDNF e Bcl-2, o que tem sido descrito em cérebros com transtorno bipolar.

A regulação de Bad por eventos de fosforilação sugere que Bad é o ponto de convergência para múltiplas sinalizações que cooperam em promover a sobrevivência celular (Bonni A, 1999). Foi mostrado que Akt fosforila Bad na Ser<sup>136</sup> in vitro e in vivo. A interrupção da atividade de Akt resulta na perda da fosforilação de Bad na Ser<sup>136</sup>, e sabe-se que este resíduo de fosforilação é suficiente para promover a sobrevivência (Datta e cols., 1997).

Em resposta a sinais de morte, membros pró-apoptóticos tornam-se ativos e translocam para a mitocôndria, onde a membrana mitocondrial torna-se permeável ao citocromo C, que ativa caspase e leva à apoptose (Casillas-Ramirez e cols., 2006). Como dito anteriormente, Akt inativa Bad através da fosforilação. Bad fosforilado dissocia-se do fator de sobrevivência Bcl-xL e liga à proteínas 14-3-3, permitindo Bcl-XL exercer sua função anti-apoptótica e prevenir a liberação do citocromo C mitocondrial para o citoplasma (Harada e cols., 2004). Com isto, fosforilação de Bad induzida por Akt inibe

apoptose (Harada e cols., 2004). Nós analisamos a expressão de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup> e houve aumentos após estimulação crônica, em vários tempos, no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal.

Regulação da sinalização por, pelo menos, dois neurotransmissores (dopamina e serotonina) e três classes de medicamentos psicotrópicos (antipsicótico, estabilizador do humor e antidepressivo) sugere que Akt e GSK-3 podem agir como integradores do sinal, permitindo coordenação e cooperação precisas de respostas da sinalização de receptores de serotonina e dopamina, com cada um ou com aqueles relacionados a outros neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento. Inibição de GSK-3 $\beta$  também pode demonstrar efeitos da ação do lítio, antidepressivos e antipsicóticos, que são com frequência usados como combinação terapêutica para várias condições psiquiátricas. Além disso, nós demonstramos aumento da expressão de fosfo-Bad-Ser<sup>136</sup>, que sugere que Akt, GSK-3 e Bad podem estar envolvidas numa sinalização de “proteção” após estimulação eletroconvulsiva. Resultados com a expressão de proteínas envolvidas nesta sinalização são relevantes para desordens psiquiátricas e tratamento, em particular ECT e podem contribuir para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na melhora clínica dos pacientes psiquiátricos.

Questiona-se como estaria a expressão destas proteínas após crises convulsivas epiléticas. Sabe-se que, além do valor intrínseco de estudar o processo da doença em uma das desordens neurológicas mais comuns, pesquisa em epilepsia é um excelente modelo para compreensão de mecanismos básicos do funcionamento do SNC e

plasticidade, em particular no cérebro humano, por diversas razões. Primeiramente, convulsões são conhecidas por iniciar um grande número de mudanças plásticas em um nível cerebral molecular e celular. Muitos mecanismos de plasticidade têm sido reconhecidos como componetes chave para a função cerebral normal (ex., desenvolvimento cerebral, aprendizado e memória) ou em outras desordens neurológicas. Segundo, a compreensão da base celular de descargas sincronizadas de maneira anormal de neurônios durante crises epilépticas pode permitir a compreensão para mecanismos da sincrinozação cerebral normal. Finalmente, a necessidade de utilizar registros de eletrodos invasivos (profundo ou subdural) em pacientes com epilepsia resulta em oportunidades únicas de estudar processos cognitivos humanos at extremely high time em altas resoluções por campo de registro ou mesmo unidades potenciais únicas durante testes cognitivos (Beck e Elger, 2008).

Sabe-se que Bad dissocia de proteínas 14-3-3 e desloca Bax, que é pró-apoptótico, da anti-apoptótica Bcl-Xl. Bax, subsequentemente transloca para a mitocôndria, induz a liberação de citocromo C e ativação de caspase. Henshall e cols (2002) mostraram que convulsões evocadas por micro-injeção de ácido kaínico na amígdala de ratos induziu morte neuronal unilateral na região piramidal CA3, com características de apoptose. No hipocampo e córtex controle, foi observado que Bad estava constitutivamente ligado a 14-3-3, enquanto Bcl-Xl à Bax. Dentre o dano hipocampal, convulsões induziram a dissociação de Bad de 14-3-3 e subsequente dimerização de Bad com Bcl-Xl. Além disso, foi observado, no cortex que não teve dano, aumento da fosforilação de Akt. Estes

dados sugerem que a morte celular através da sinalização de Bad pode reforçar a morte neuronal induzida por convulsão.

Foi demonstrado, este ano, por Piermartiri e cols (2009), que atorvastatina tem efeito protetor contra morte celular hipocampal produzida por convulsão induzida por ácido quinolínico. Houve, também, aumento da fosforilação de Akt (Piermartiri e cols., 2009).

Sabe-se que o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) tem papel bem estabelecido como fator angiogênico; e recentemente, foi mostrado proteger neurônios da morte celular in vivo e in vitro. Enquanto o potencial de VEGF tem sido demonstrado como fator protetor na isquemia e excitotoxicidade in vitro, seu papel na perda neuronal induzida por convulsão tem sido menos estudada. Um papel potencial nas convulsões foi sugerido por Newton e cols (2003), relatando aumento de RNAm em áreas cerebrais susceptíveis à perda celular, após convulsões induzidas por eletrochoque. Nicoletti e cols (2008) avaliaram a expressão proteica de VEGF após status epilepticus induzido por pilocarpina e observaram uma supra-regulação nos neurônios e glia no hipocampo, tálamo, amígdala e neocórtex, após 24 horas de status epilepticus. VEGF induziu preservação significativa de neurônios hipocampais, sugerindo papel neuroprotetor (Nicoletti e cols., 2008).

Embora a manifestação chave para todas as epilepsias seja convulsões recorrentes, as etiologias podem aumentar ou diminuir a probabilidade do cérebro humano de gerar atividade neuronal sincronizada e convulsões são diversas (Beck e Elger, 2008).

Convulsões epiléticas são associadas com tumores no SNC, anormalidades no desenvolvimento, inflamação, em menor proporção à mutação em um gene, mas um grande número ainda tem etiologia desconhecida (epilepsias idiopáticas). Os dados relacionando crises convulsivas e apoptose são claros no sentido de haver dependência da duração e frequência da crise. Alguns estudos demonstram a utilização de ECT em distúrbios mentais associadas com epilepsia e relataram eficácia na utilização da técnica (Marchetti e cols., 2003). Porém, ainda há necessidade de estudos de proteínas da sinalização apoptótica em modelos animais associando epilepsia e ECT.

ECT é uma opção terapêutica altamente eficaz, predominantemente para depressão, mas também para esquizofrenia. Não é utilizada apenas em tratamentos agudos, mas também na prevenção de recaída, durante o tratamento de manutenção. Apesar de pesquisas recentes terem contribuído para que este seja um tratamento seguro e bem tolerado, os mecanismos de ação ainda precisam ser elucidados. Estudos da sinalização após ECT podem contribuir para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na melhora clínica e os efeitos adversos.



## 6-Conclusão

A análise realizada nos permitiu concluir que:

- Não houve alteração na expressão tanto de DARPP-32 quanto pDARPP-32 (Thr34) no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo após estimulação eletroconvulsiva aguda.
- Houve alterações significativas tanto de DARPP-32 quanto pDARPP-32 (Thr34) no córtex pré-frontal e estriado, em vários tempos, após estimulação eletroconvulsiva crônica.



- Não houve alteração tanto de Akt quanto pAkt Thr<sup>308</sup>, nas regiões analisadas, após EEC aguda.
- Houve alterações significativas tanto de Akt quanto pAkt Thr<sup>308</sup> no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo, em vários tempos, após estimulação eletroconvulsiva crônica.
- Não houve alteração tanto de GSK-3 $\beta$  quanto pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, no córtex pré-frontal e estriado, após EEC aguda.
- Houve alterações na expressão de GSK-3 $\beta$ , no hipocampo, após EEC aguda, mas não houve alteração de pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>.
- Houve alterações significativas tanto de GSK-3 $\beta$  quanto pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, no hipocampo, e de pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>, no córtex pré-frontal e estriado, após EEC crônica.
- Não houve alteração de Bad, nas regiões analisadas, após EEC aguda; houve alteração de pBad Ser<sup>136</sup>, no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal e estriado, após EEC aguda.
- Não houve alteração de Bad, no córtex pré-frontal e estriado, após estimulação crônica, mas houve no hipocampo.
- Houve alterações significativas de pBad Ser<sup>136</sup>, em todas as regiões analisadas, após estimulação crônica.
- Alterações significativas foram observadas em grande número após estimulação crônica e não aguda.
- Alterações nas proteínas da via de sinalização apoptótica parecem ter efeito neuroprotetor após estimulação eletroconvulsiva.



## **7-Referência bibliográficas**

Abrams, R. (1992). "Who benefits from ECT?" Br J Psychiatry 161: 129.

Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science 281(5381): 1322-1326.

Albert, K. A., H. C. Hemmings, Jr., et al. (2002). "Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia." Arch Gen Psychiatry 59(8): 705-712.

Alessi, D. R. (2001). "Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture." *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2): 1-14.

Altar, C. A., P. Laeng, et al. (2004). "Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways." *J Neurosci* 24(11): 2667-2677.

Amar, S., G. Shaltiel, et al. (2008). "Possible involvement of post-dopamine D2 receptor signalling components in the pathophysiology of schizophrenia." *Int J Neuropsychopharmacol* 11(2): 197-205.

Angelucci, F., L. Aloe, et al. (2003). "Electroconvulsive stimuli alter nerve growth factor but not brain-derived neurotrophic factor concentrations in brains of a rat model of depression." *Neuropeptides* 37(1): 51-56.

Balendran, A., R. Currie, et al. (1999). "Evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates phosphorylation of p70 S6 kinase in vivo at Thr-412 as well as Thr-252." *J Biol Chem* 274(52): 37400-37406.

Bateup, H. S., P. Svenningsson, et al. (2008). "Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs." *Nat Neurosci* 11(8): 932-939.

Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, et al. (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." *Cell* 122(2): 261-273.

Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, et al. (2004). "Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 5099-5104.

Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, et al. (2004). "Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 5099-5104.

Beck, H. and C. E. Elger (2008). "Epilepsy research: a window onto function to and dysfunction of the human brain." *Dialogues Clin Neurosci* 10(1): 7-15.

Bell, R., J. Munro, et al. (2000). "Systematic screening of the 14-3-3 eta (eta) chain gene for polymorphic variants and case-control analysis in schizophrenia." *Am J Med Genet* 96(6): 736-743.

Belmaker, R. H. (2004). "Bipolar disorder." *N Engl J Med* 351(5): 476-486.

Berns, G. S. and C. B. Nemeroff (2003). "The neurobiology of bipolar disorder." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 123C(1): 76-84.

Bibb, J. A., G. L. Snyder, et al. (1999). "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons." *Nature* 402(6762): 669-671.

Bijur, G. N. and R. S. Jope (2001). "Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta." *J Biol Chem* 276(40): 37436-37442.

Bijur, G. N. and R. S. Jope (2003). "Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria." *Neuroreport* 14(18): 2415-2419.

Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* 286(5443): 1358-1362.

Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* 286(5443): 1358-1362.

Brunet, A., S. R. Datta, et al. (2001). "Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway." *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 297-305.

Brywe, K. G., A. L. Leverin, et al. (2005). "Growth hormone-releasing peptide hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation." *Endocrinology* 146(11): 4665-4672.

Busnello, J. V., R. Leke, et al. (2006). "Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity." *Life Sci* 78(26): 3013-3017.

Calabresi, P., P. Gubellini, et al. (2000). "Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity." *J Neurosci* 20(22): 8443-8451.

Carlsson, A., M. Lindqvist, et al. (1958). "On the presence of 3-hydroxytyramine in brain." *Science* 127(3296): 471.

Carlsson, A. and B. Waldeck (1958). "A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine)." *Acta Physiol Scand* 44(3-4): 293-298.

Casillas-Ramirez, A., I. B. Mosbah, et al. (2006). "Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation." *Life Sci* 79(20): 1881-1894.

Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1997). "BCL-XL-regulated apoptosis in T cell development." *Int Immunol* 9(9): 1375-1384.

Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 276(34): 31858-31862.

Chen, X., H. Thakkar, et al. (2001). "Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer." *Oncogene* 20(42): 6073-6083.

Chipuk, J. E. and D. R. Green (2008). "How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?" *Trends Cell Biol* 18(4): 157-164.

Chuang, D. M. (2005). "The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials." *Ann N Y Acad Sci* 1053: 195-204.

Coleman, A. B. (2003). "Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2." *Drug Resist Updat* 6(2): 85-94.

Cryan, J. F., A. Markou, et al. (2002). "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs." *Trends Pharmacol Sci* 23(5): 238-245.

Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* 91(2): 231-241.

Datta, S. R., A. Katsov, et al. (2000). "14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation." *Mol Cell* 6(1): 41-51.

De Luca, V., O. Likhodi, et al. (2007). "Differential expression and parent-of-origin effect of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene C102T polymorphism: analysis of suicidality in schizophrenia and bipolar disorder." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B(3): 370-374.

De Sarno, P., X. Li, et al. (2002). "Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium." *Neuropharmacology* 43(7): 1158-1164.



DeGiorgio, C. M., P. S. Gott, et al. (1996). "Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus." *Epilepsia* 37(7): 606-609.

del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, et al. (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." *Science* 278(5338): 687-689.

Desdouits, F., J. C. Siciliano, et al. (1998). "Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons." *Biochem J* 330 ( Pt 1): 211-216.

Dremencov, E., E. Gur, et al. (2002). "Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hypothalamus." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26(6): 1029-1034.

Duman, R. S. and V. A. Vaidya (1998). "Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures." *J ECT* 14(3): 181-193.

Emamian, E. S., D. Hall, et al. (2004). "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 $\beta$  signaling in schizophrenia." *Nat Genet* 36(2): 131-137.

Fang, H., J. Chartier, et al. (2003). "Transcriptional activation of the human brain-derived neurotrophic factor gene promoter III by dopamine signaling in NT2/N neurons." *J Biol Chem* 278(29): 26401-26409.

Feldcamp, L. A., R. P. Souza, et al. (2008). "Reduced prefrontal cortex DARPP-32 mRNA in completed suicide victims with schizophrenia." *Schizophr Res* 103(1-3): 192-200.

Fochtmann, L. J. (1994). "What do rodents and test tubes teach us about ECT?" *Convuls Ther* 10(4): 287-297.

Follesa, P., K. Gale, et al. (1994). "Regional and temporal pattern of expression of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA in rat brain following electroconvulsive shock." *Exp Neurol* 127(1): 37-44.

Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." *Science* 275(5300): 665-668.

Gajewski, T. F. and C. B. Thompson (1996). "Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence." *Cell* 87(4): 589-592.

Giros, B., M. Jaber, et al. (1996). "Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter." *Nature* 379(6566): 606-612.

Glass, R. M. (2001). "Electroconvulsive therapy: time to bring it out of the shadows." *JAMA* 285(10): 1346-1348.

Glenthoj, B. Y. (1995). "The brain dopaminergic system. Pharmacological, behavioural and electrophysiological studies." *Dan Med Bull* 42(1): 1-21.

Goldstein, M. and A. Y. Deutch (1992). "Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia." *FASEB J* 6(7): 2413-2421.

Greengard, P. (2001). "The neurobiology of dopamine signaling." *Biosci Rep* 21(3): 247-269.

Greengard, P., P. B. Allen, et al. (1999). "Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade." *Neuron* 23(3): 435-447.

Guitart, X. and E. J. Nestler (1992). "Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in rat frontal cortex." *J Neurochem* 59(3): 1164-1167.

Harada, N., E. Hatano, et al. (2004). "Akt activation protects rat liver from ischemia/reperfusion injury." *J Surg Res* 121(2): 159-170.

Henshall, D. C., T. Araki, et al. (2002). "Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death." *J Neurosci* 22(19): 8458-8465.

Hsieh, T. F., S. Simler, et al. (1998). "BDNF restores the expression of Jun and Fos inducible transcription factors in the rat brain following repetitive electroconvulsive seizures." *Exp Neurol* 149(1): 161-174.

Jeon, W. J., S. H. Kim, et al. (2008). "Repeated electroconvulsive seizure induces c-Myc down-regulation and Bad inactivation in the rat frontal cortex." *Exp Mol Med* 40(4): 435-444.

Joep, R. S. (1999). "Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium." *Mol Psychiatry* 4(2): 117-128.

Joep, R. S. (1999). "A bimodal model of the mechanism of action of lithium." *Mol Psychiatry* 4(1): 21-25.

Joep, R. S. and G. V. Johnson (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem Sci* 29(2): 95-102.

Joep, R. S. and G. V. Johnson (2004). "The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3." *Trends Biochem Sci* 29(2): 95-102.

Joep, R. S. and M. S. Roh (2006). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions." *Curr Drug Targets* 7(11): 1421-1434.

Kandel, E. S. and N. Hay (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." *Exp Cell Res* 253(1): 210-229.

Kang, U. G., M. S. Roh, et al. (2004). "Activation of protein kinase B (Akt) signaling after electroconvulsive shock in the rat hippocampus." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(1): 41-44.

Kavelaars, A., P. M. Cobelens, et al. (2005). "Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene." *J Neuroimmunol* 161(1-2): 162-168.

Kelly, S., H. Zhao, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor Chir025 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia." *Exp Neurol* 188(2): 378-386.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.

Kim, M. J., S. L. Cotman, et al. (2003). "The heparan sulfate proteoglycan agrin modulates neurite outgrowth mediated by FGF-2." *J Neurobiol* 55(3): 261-277.

Klein, P. S. and D. A. Melton (1996). "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8455-8459.

Koike, H., P. A. Arguello, et al. (2006). "Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3693-3697.

Kondratyev, A., N. Sahibzada, et al. (2001). "Electroconvulsive shock exposure prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus." *Brain Res Mol Brain Res* 91(1-2): 1-13.

Kulik, G., A. Klippel, et al. (1997). "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt." *Mol Cell Biol* 17(3): 1595-1606.

Kuppers, E. and C. Beyer (2001). "Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells." *Neuroreport* 12(6): 1175-1179.

Lai, W. S., B. Xu, et al. (2006). "Akt1 deficiency affects neuronal morphology and predisposes to abnormalities in prefrontal cortex functioning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(45): 16906-16911.

Lee, C. S., K. R. Kang, et al. (2009). "Proteomic analysis of rat brains following exposure to electroconvulsive therapy." *J Korean Med Sci* 24(1): 132-137.

Levant, B. (1997). "The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance." *Pharmacol Rev* 49(3): 231-252.

Levant, B. and N. R. Vansell (1997). "In vivo occupancy of D2 dopamine receptors by nafadotride." *Neuropsychopharmacology* 17(2): 67-71.

Li, Y., D. Dowbenko, et al. (2002). "AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival." *J Biol Chem* 277(13): 11352-11361.

Lindgren, N., A. Usiello, et al. (2003). "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* 100(7): 4305-4309.

Lindholm, D., G. Dechant, et al. (1993). "Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity." *Eur J Neurosci* 5(11): 1455-1464.

Lisanby, S. H., J. H. Maddox, et al. (2000). "The effects of electroconvulsive therapy on memory of autobiographical and public events." *Arch Gen Psychiatry* 57(6): 581-590.

Madsen, T. M., M. H. Greisen, et al. (2000). "Electroconvulsive stimuli enhance both neuropeptide Y receptor Y1 and Y2 messenger RNA expression and levels of binding in the rat hippocampus." *Neuroscience* 98(1): 33-39.

Maldve, R. E., T. A. Zhang, et al. (2002). "DARPP-32 and regulation of the ethanol sensitivity of NMDA receptors in the nucleus accumbens." *Nat Neurosci* 5(7): 641-648.

Manev, H., T. Uz, et al. (2003). "Glia as a putative target for antidepressant treatments." *J Affect Disord* 75(1): 59-64.

Manji, H. K., Y. Bersudsky, et al. (1996). "Modulation of protein kinase C isozymes and substrates by lithium: the role of myo-inositol." *Neuropsychopharmacology* 15(4): 370-381.

Manji, H. K., G. Chen, et al. (1996). "Regulation of signal transduction pathways by mood-stabilizing agents: implications for the delayed onset of therapeutic efficacy." *J Clin Psychiatry* 57 Suppl 13: 34-46; discussion 47-38.

Marchetti, R. L., L. A. Fiore, et al. (2003). "Safety and efficacy of ECT in mental disorders associated with epilepsy: report of three cases." *J ECT* 19(3): 173-176.

Matsuyama, S., R. Fukui, et al. (2003). "Regulation of DARPP-32 Thr75 phosphorylation by neurotensin in neostriatal neurons: involvement of glutamate signalling." *Eur J Neurosci* 18(5): 1247-1253.

Middleton, F. A., L. Peng, et al. (2005). "Altered expression of 14-3-3 genes in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 30(5): 974-983.

Middleton, F. A., L. Peng, et al. (2005). "Altered expression of 14-3-3 genes in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 30(5): 974-983.

Mirnics, K., F. A. Middleton, et al. (2000). "Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex." *Neuron* 28(1): 53-67.

Nagatsu, T. and M. Sawada (2005). "Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines." *Curr Pharm Des* 11(8): 999-1016.



Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." *Neuron* 34(1): 13-25.

Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." *Neuron* 34(1): 13-25.

Nestler, E. J., E. Gould, et al. (2002). "Preclinical models: status of basic research in depression." *Biol Psychiatry* 52(6): 503-528.

Newton, S. S., E. F. Collier, et al. (2003). "Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors." *J Neurosci* 23(34): 10841-10851.

Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J Neurosci* 15(11): 7539-7547.

Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J Neurosci* 15(11): 7539-7547.

Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J Neurosci* 15(11): 7539-7547.

Nicoletti, J. N., S. K. Shah, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus." *Neuroscience* 151(1): 232-241.

Nishi, A., G. L. Snyder, et al. (1999). "Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons." *J Neurochem* 72(5): 2015-2021.

Nishi, A., Y. Watanabe, et al. (2005). "Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(4): 1199-1204.

Nomikos, G. G., A. P. Zis, et al. (1991). "Electroconvulsive shock produces large increases in interstitial concentrations of dopamine in the rat striatum: an in vivo microdialysis study." *Neuropsychopharmacology* 4(1): 65-69.

Nutt, D. J. (2008). "Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder." *J Clin Psychiatry* 69 Suppl E1: 4-7.

Nutt, D. J. (2008). "Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder." *J Clin Psychiatry* 69 Suppl E1: 4-7.

Olfson, M. and H. H. Goldman (1992). "Psychiatric outpatient practice: patterns and policies." *Am J Psychiatry* 149(11): 1492-1498.

Pande, A. C. and L. J. Grunhaus (1990). "ECT for Depression in the Presence of Myasthenia Gravis." *Convuls Ther* 6(2): 172-175.

Pap, M. and G. M. Cooper (1998). "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway." *J Biol Chem* 273(32): 19929-19932.

Parker, V., M. S. Nobler, et al. (2001). "A unilateral, prolonged, nonconvulsive seizure in a patient treated with bilateral ECT." *J ECT* 17(2): 141-145.

Paterlini, M., S. S. Zakharenko, et al. (2005). "Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice." *Nat Neurosci* 8(11): 1586-1594.

Pei, Q., P. W. Burnet, et al. (1997). "Differential effects of acute and chronic electroconvulsive shock on the abundance of messenger RNAs for voltage-dependent potassium channel subunits in the rat brain." *Neuroscience* 78(2): 343-350.

Persad, S., S. Attwell, et al. (2001). "Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343." *J Biol Chem* 276(29): 27462-27469.

Picconi, B., D. Centonze, et al. (2003). "Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia." *Nat Neurosci* 6(5): 501-506.

Piermartiri, T. C., S. Vandesen-Filho, et al. (2009). "Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake." *Neurotox Res* 16(2): 106-115.

Potter, W. Z. (1994). "ECT methodologic issues." *Psychopharmacol Bull* 30(3): 455-459.

Rosa, D. V., R. P. Souza, et al. (2007). "DARPP-32 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation." *Brain Res* 1179: 35-41.

Rudorfer, M. V. and B. D. Lebowitz (1999). "Progress in ECT research." *Am J Psychiatry* 156(6): 975.

Sackeim, H. A. (1994). "Continuation therapy following ECT: directions for future research." *Psychopharmacol Bull* 30(3): 501-521.

Sanacora, G., G. F. Mason, et al. (2003). "Increased cortical GABA concentrations in depressed patients receiving ECT." *Am J Psychiatry* 160(3): 577-579.

Scott, B. W., J. M. Wojtowicz, et al. (2000). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures." *Exp Neurol* 165(2): 231-236.

Self, D. W., L. M. Genova, et al. (1998). "Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior." *J Neurosci* 18(5): 1848-1859.

Shergill, S. S., M. M. Robertson, et al. (1999). "Outcome in refractory depression." *J Affect Disord* 54(3): 287-294.

Smialowska, M., B. Szewczyk, et al. (2002). "Effect of chronic imipramine or electroconvulsive shock on the expression of mGluR1a and mGluR5a immunoreactivity in rat brain hippocampus." *Neuropharmacology* 42(8): 1016-1023.

Snyder, G. L., G. Fisone, et al. (1994). "Phosphorylation of DARPP-32 is regulated by GABA in rat striatum and substantia nigra." *J Neurochem* 63(5): 1766-1771.

Song, Y. S., P. Narasimhan, et al. (2008). "The role of Akt signaling in oxidative stress mediates NF-kappaB activation in mild transient focal cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(12): 1917-1926.

Staal, R. G., E. V. Mosharov, et al. (2004). "Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore." *Nat Neurosci* 7(4): 341-346.

Svenningsson, P., A. Nishi, et al. (2004). "DARPP-32: an integrator of neurotransmission." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269-296.

Svenningsson, P., A. Nishi, et al. (2004). "DARPP-32: an integrator of neurotransmission." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269-296.

Sweatt, J. D. (2001). "The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory." *J Neurochem* 76(1): 1-10.

Tan, H. Y., K. K. Nicodemus, et al. (2008). "Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans." *J Clin Invest* 118(6): 2200-2208.

Tess, A. V. and G. W. Smetana (2009). "Medical evaluation of patients undergoing electroconvulsive therapy." *N Engl J Med* 360(14): 1437-1444.

Thiselton, D. L., V. I. Vladimirov, et al. (2008). "AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families." *Biol Psychiatry* 63(5): 449-457.

Thomas, G. M., E. Cunningham, et al. (1993). "An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling." *Cell* 74(5): 919-928.

Tsuang, J. and T. W. Fong (2004). "Treatment of patients with schizophrenia and substance abuse disorders." *Curr Pharm Des* 10(18): 2249-2261.

Tsuang, M., K. Domschke, et al. (2004). "Agoraphobic behavior and panic attack: a study of male twins." *J Anxiety Disord* 18(6): 799-807.

Tupala, E. and J. Tiihonen (2004). "Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28(8): 1221-1247.

Vallone, D., R. Picetti, et al. (2000). "Structure and function of dopamine receptors." *Neurosci Biobehav Rev* 24(1): 125-132.

Vaux, D. L., G. Haecker, et al. (1994). "An evolutionary perspective on apoptosis." *Cell* 76(5): 777-779.

Vawter, M. P., T. Barrett, et al. (2001). "Application of cDNA microarrays to examine gene expression differences in schizophrenia." *Brain Res Bull* 55(5): 641-650.

Viegas, L. R., E. Hoijman, et al. (2008). "Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids." *J Steroid Biochem Mol Biol* 109(3-5): 273-278.

Walaas, S. I., D. W. Aswad, et al. (1983). "A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions." *Nature* 301(5895): 69-71.

Walaas, S. I., A. C. Nairn, et al. (1983). "Regional distribution of calcium- and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-regulated protein phosphorylation systems in mammalian brain. I. Particulate systems." *J Neurosci* 3(2): 291-301.

Walton-Hadlock, J. L. (2005). "Levodopa and the progression of Parkinson's disease." *N Engl J Med* 352(13): 1386; author reply 1386.

Watcharasit, P., G. N. Bijur, et al. (2002). "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and p53 after DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 7951-7955.

Wennstrom, M., J. Hellsten, et al. (2006). "Corticosterone-induced inhibition of gliogenesis in rat hippocampus is counteracted by electroconvulsive seizures." *Biol Psychiatry* 59(2): 178-186.

Wunderlich, M. T., A. D. Ebert, et al. (1999). "Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage." *Stroke* 30(6): 1190-1195.

Yaffe, M. B. and A. E. Elia (2001). "Phosphoserine/threonine-binding domains." *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 131-138.

Yaffe, M. B., K. Rittinger, et al. (1997). "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity." *Cell* 91(7): 961-971.

Yan, Z., L. Hsieh-Wilson, et al. (1999). "Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin." *Nat Neurosci* 2(1): 13-17.

Yan, Z., L. Hsieh-Wilson, et al. (1999). "Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin." *Nat Neurosci* 2(1): 13-17.



Yang, E., J. Zha, et al. (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." *Cell* 80(2): 285-291.

Yoshida, K., H. Higuchi, et al. (1997). "Dopamine releasing response in rat striatum to single and repeated electroconvulsive shock treatment." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21(4): 707-715.

Zetterstrom, T. S., Q. Pei, et al. (1998). "Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration." *Brain Res Mol Brain Res* 57(1): 106-110.

Zha, J., H. Harada, et al. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." *Cell* 87(4): 619-628.

Zhao, H., R. M. Sapolsky, et al. (2006). "Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke." *Mol Neurobiol* 34(3): 249-270.

Zupan, G., K. Pilipovic, et al. (2008). "Oxidative stress parameters in different rat brain structures after electroconvulsive shock-induced seizures." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(3): 771-777.



## 8-Anexo 1

**Repeated electroconvulsive stimulation increases DARPP-32 phosphorylation in rat prefrontal cortex and striatum**

Daniela V. F. Rosa<sup>1,2</sup>, Renan P. Souza<sup>3</sup>, Alexandre G. Barros<sup>1,2</sup>, Fabrício F. Lima<sup>1,2</sup>,  
Gustavo Feier<sup>4</sup>, Marcus V. Gomez<sup>2</sup>, João Quevedo<sup>4</sup> and Marco A. Romano-Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa em Neuropsiquiatria Clínica e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901 Minas Gerais, Brazil;

<sup>2</sup>Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901 Minas Gerais, Brazil;

<sup>3</sup>Neurogenetics Section, Centre for Addiction and Mental Health, 250 College Street, Toronto M5T1R8 Ontario, Canada;

<sup>4</sup>Laboratorio de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

**Running title:** Electroconvulsive stimulation effects on DARPP-32

**Keywords:** electroconvulsive therapy; protein expression; dopaminergic signaling; western blot; animal model.

**Corresponding author:**

Marco A. Romano-Silva, MD, PhD

Departamento de Saúde Mental - UFMG

Av Alfredo Balena, 190

30130-100 Belo Horizonte-MG, Brazil

Phone: +5531-3409 9135 Fax: +5531-3499-2983

e-mail: [romano-silva@ufmg.br](mailto:romano-silva@ufmg.br)

## Abstract

Electroconvulsive therapy is an effective and safe treatment for psychiatric disorders. Animal experiments have shown many effects of the electroconvulsive stimulation (ECS). Our group has reported increased hippocampal and striatal DARPP-32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa) expression after chronic ECS procedure in a previous study. The aim of this work was to analyze whether a single ECS stimulation (acute) or eight ECS every other day (chronic group) alters DARPP-32 levels and DARPP-32-Thr<sup>34</sup> phosphorylation in the striatum and prefrontal cortex of Wistar rats. We found alterations on striatal phospho-Thr<sup>34</sup> after acute ECS, although single procedure did not change prefrontal cortical DARPP-32, prefrontal cortical phospho-Thr<sup>34</sup> or striatal DARPP-32. We observed enhanced prefrontal cortical DARPP-32 expression half and three hours after the last session of the chronic ECS. Prefrontal cortical phospho-Thr<sup>34</sup> and striatal DARPP-32 level increased at time zero, half, three, 12 and 24 hours after the last session of the chronic stimulation, returning to the basal after 48 hours. Striatal phospho-Thr<sup>34</sup> increased at half, three, 12 and 24 hours after the last session of the chronic protocol, returning to the basal after 48 hours. These findings corroborate with our previous study and add data regarding increased DARPP-32 activity after multiple ECS. Results on expression of proteins involved in signaling pathways are relevant for neuropsychiatric disorders and treatment, in particular electroconvulsive therapy and can contribute to shed light on the mechanisms underlying its therapeutic effects.

## Introduction

Induction of seizures in the form of electroconvulsive therapy (ECT) has been an effective and safe treatment for more than 60 years in major depression and in some cases of acute mania or schizophrenia whereas antipsychotic treatment has failed. A course of ECT for major depression generally consists of six up to 12 sessions with most patients receiving three treatments per week (Tess and Smetana 2009). Animal experiments have shown many effects of the electroconvulsive stimulation (ECS). ECS affects several brain regions, particularly the hippocampus, frontal cortex, neostriatum, entorhinal cortex, temporal-parietal cortex, and several monoaminergic nuclei that project to these areas (Dremencov et al. 2002). Those findings contributed toward a better understanding of the therapeutic and side effects of ECT.

Our group reported increased hippocampal and striatal DARPP-32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa) expression after chronic ECS procedure in a previous study (Rosa et al. 2007a). DARPP-32 function depends on its relative state of phosphorylation at two main regulatory sites, threonine 34 (Thr<sup>34</sup>) and threonine 75 (Thr<sup>75</sup>). When DARPP-32 is phosphorylated at Thr<sup>34</sup> by protein kinase A (PKA), it becomes a potent inhibitor of protein phosphatase 1 (PP-1), which in turn regulates the phosphorylation state of several classes of effectors proteins, including transcription factors, ionotropic receptors and ion channels (Greengard et al. 1999). PKA also phosphorylates and activates protein phosphatase 2A (PP-2A), which dephosphorylates DARPP-32 at Thr<sup>75</sup>. When phosphorylated at Thr<sup>75</sup> by cdk5, DARPP-32 becomes an inhibitor of PKA signalling, thereby relieving inhibition of PP-1 (Bibb et al. 1999).

Guitart and Nestler (Guitart and Nestler 1992) demonstrated increased DARPP-32 expression after chronic administration of lithium as well as imipramine or tranylcypromine in frontal cortex (Guitart and Nestler 1992). Pharmacological studies have shown that a variety of therapeutic agents also regulate DARPP-32-Thr<sup>34</sup> phosphorylation. Antipsychotics (e.g. haloperidol) increase Thr<sup>34</sup> phosphorylation (Bateup et al. 2008). Svenningsson et al (Svenningsson et al. 2006) have shown phosphorylation changes in prefrontal cortex and striatum after acute fluoxetine administration in mice. Chronic fluoxetine treatment increases DARPP-32 mRNA and protein in addition to phosphorylation changes (Svenningsson et al. 2006). Psychostimulants also modulate DARPP-32-Thr<sup>34</sup> phosphorylation (Bateup et al. 2008)

The aim of this work was to analyze whether electroconvulsive stimulation alters DARPP-32 levels and DARPP-32-Thr<sup>34</sup> phosphorylation in the Wistar rat brain. As we have not found significant alterations in DARPP-32 expression in the whole cortex after ECS (Rosa et al. 2007a), we have decided to analyze specifically the prefrontal area of the cortex. Previous findings have shown that DARPP-32 expression in the prefrontal cortex is sensitive to various conditions (Guitart and Nestler 1992, Feldcamp et al. 2008). Striatal DARPP-32 evaluation was also interesting because DARPP-32 is a key regulator of signalling in striatal neurons (Bateup et al. 2008). Our results have shown no DARPP-32 and phospho-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> changes after acute ECS. However, chronic ECS have induced a sustained increase of DARPP-32 and phospho-Thr<sup>34</sup> expression after the last stimulation.

## Methods

This study is in accordance with the National Institutes of Health guidelines and it was conducted after approval from the Universidade do Extremo Sul Catarinense Ethics Committee. Our group has published some reports using this experimental design (Rosa et al. 2007a, Rosa et al. 2007b) although samples analyzed in this study are independent. This protocol closely resembles ECT in clinical practice, either in number of sessions or in stimulation intensity. Adult male Wistar rats (250-300g) housed in groups of five with free access to food and water (12-hour light/dark cycle) were submitted to either a single (acute group) or eight ECS every other day (chronic group) using bilateral ear clip electrode (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds). Rats were killed by decapitation at different time points (zero, half, three, 12, 24 and 48 hours) after the last ECS in each group (n = 5 animals per time point after each treatment). The sham groups (acute and chronic) were handled identically to ECS-stimulated rats except no current was passed.

Souza et al. (Souza et al. 2009) describes protein extraction and electrophoresis. Membranes were sequentially immunoblotted using antibodies raised against phospho-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> (1:500 - Cell Signaling), DARPP-32 (1:500 - H-62 – Santa Cruz Biotechnology) and actin (Chemicon International) overnight. Goat anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-linked IgG (Molecular Probes) and ECL immunoblotting detection system (Amersham Biosciences) revealed primary antibody binding. Image Quant (GE Healthcare) detected chemiluminescence and Scion Image version Beta 4.0.2 (Scion Image software) quantified apparent bands by densitometry. Individual immunoblots included samples from control and electroconvulsive stimulation tissue.



If normality and equal variance tests reached values above 0.05, mean differences were accessed using one-way analysis of variance (ANOVA) (F values were reported) followed by Holm-Sidak multiple-comparison procedure that was derived from the interaction error term for the mixed-model ANOVA. This test can be used for both pairwise comparisons and comparisons versus a control group (performed in these analyses); it is more powerful than the Tukey test and is recommended as the first line procedure for most multiple comparison testing (Souza et al. 2009). If normality or equal variance tests presented values below 0.05, non-parametric Kruskal-Wallis one-way ANOVA (H values were reported) compared mean values. Values of  $p < 0.05$  indicate nominally significant. If the p-value was below the corrected significance level, the association was statistically significant. We have reported corrected significance levels for each association from the Holm-Sidak multiple-comparison. Graphs present values expressed as mean  $\pm$ SD (n=5 for each group).

## Results

Figure 1 presents DARPP-32 and phospho-Thr<sup>34</sup> expression after single ECS session. Acute ECS did not change prefrontal cortical DARPP-32 [ $H(6,35) = 6.87$ ,  $p = 0.333$ ]; prefrontal cortical phospho-Thr<sup>34</sup> [ $F(6,35) = 2.337$ ,  $p = 0.061$ ] or striatal DARPP-32 [ $F(6,35) = 2.115$ ;  $p = 0.083$ ]. Striatal phospho-Thr<sup>34</sup> was altered [ $H(6,35) = 19.490$ ;  $p = 0.003$ ] although no specific time points were significantly increased when compared with the control group.

Figure 2 shows DARPP-32 and phospho-Thr<sup>34</sup> expression after repeated ECS. Prefrontal cortical DARPP-32 expression was increased half ( $t = 3.868$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.010$ ) and three ( $t = 4.448$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.008$ ) hours after the last session of chronic ECS when compared to control group [ $F(6,35) = 4.053$ ;  $p = 0.007$ ]. We also observed nominal difference for DARPP-32 expression 12 ( $t = 2.585$ ;  $p = 0.017$ ; corrected significant level  $p = 0.012$ ) and 24 ( $t = 2.355$ ;  $p = 0.028$ ; corrected significance level  $p = 0.025$ ) hours after the last session with expression returning to basal level after 48 hours ( $t = 2.035$ ;  $p = 0.054$ ).

Prefrontal cortical phospho-Thr<sup>34</sup> expression increased at time zero ( $t = 5.128$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.012$ ), half ( $t = 8.310$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.008$ ), three ( $t = 7.863$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.010$ ), 12 ( $t = 4.098$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.016$ ) and 24 ( $t = 2.880$ ;  $p = 0.008$ ; corrected significance level  $p = 0.025$ ) hours after the last session of chronic stimulation [ $F(6,35) = 19.170$ ;  $p < 0.001$ ]. Furthermore, cortical phospho-Thr<sup>34</sup> level return to basal 48 hours after the last session ( $t = 1.558$ ;  $p = 0.133$ ).

Striatal DARPP-32 expression increased at zero ( $t = 4.273$ ;  $p < 0.001$ , corrected significance level  $p = 0.025$ ), half ( $t = 6.431$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.001$ ), three ( $t = 9.129$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.008$ ), 12 ( $t = 6.247$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.012$ ) and 24 ( $t = 4.359$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.016$ ) hours after the last session of the chronic protocol when compared to sham group [ $F(6,35) = 19.298$ ;  $P < 0.001$ ] with expression returning to basal after 48 hours ( $t = 1.436$ ;  $p = 0.161$ ).

Striatal phospho-Thr<sup>34</sup> expression increased at half ( $t = 5.933$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.012$ ), three ( $t = 8.447$ ;  $p < 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.008$ ), 12 ( $t = 3.333$ ;  $p = 0.002$ ; corrected significance level  $p = 0.016$ ) and 24 ( $t = 3.613$ ;  $p = 0.001$ ; corrected significance level  $p = 0.012$ ) hours after the last session of the chronic protocol [ $F(6,35) = 20.264$ ;  $p < 0.001$ ] with expression returning to basal after 48 hours ( $t = 0.480$ ;  $p = 0.634$ ).

## Discussion

Acute ECS has not generated main changes in the DARPP-32 or phospho-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> levels in prefrontal cortex and striatum whereas the chronic protocol induced significant changes in both regions. These results corroborate our previous findings showing protein expression alteration mainly after repeated ECS procedures (Rosa et al. 2007a, Rosa et al. 2007b). It has been proposed greater benefits of ECT from chronic treatment and repeated sessions in the clinical practice (Tess and Smetana 2009). Most of the ECS studies that evaluated protein expression or neurotransmitter release also found more significant changes after multiples ECS procedures rather than acute ECS (Nomikos et al. 1991, Nibuya et al. 1995, Smith and Sharp 1997, Yoshida et al. 1997, Hsieh et al. 1998, Yoshida et al. 1998, Zetterstrom et al. 1998)

Dopaminergic pathways enhance DARPP-32 expression and phosphorylation. Nomikos et al. (Nomikos et al. 1991) showed interstitial striatal dopamine elevation up to 1310% of baseline when ECS was administered. Yoshida et al. (Yoshida et al. 1997, 1998) showed a greater effect on extracellular concentrations of dopamine after repeated

ECS in the striatum than in the frontal cortex. Our results have also shown that ECS-induced DARPP-32 phosphorylation was greater in the striatum than in the prefrontal cortex. ECS increases also other proteins that could modulate DARPP-32 phosphorylation and expression such as tyrosine kinase receptor B (TrkB) (Nibuya et al. 1995), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Nibuya et al. 1995, Zetterstrom et al. 1998) as well as transcription factors (Hsieh et al. 1998, Conti et al. 2007). Other findings showed that enhancement of dopamine function by repeated ECS requires concomitant activation of D1-like and D2-like dopaminergic receptors (Smith and Sharp 1997). DARPP-32 plays a central role in the dopaminergic signalling converging D1-like and D2-like receptor pathways (Svenningsson et al. 2004).

Prefrontal cortex and striatum receive serotonergic and dopaminergic converging afferent fibers. ECS has effects on the serotonergic system: increased serotonergic transmission in the hypothalamus via desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors; decreased serotonin transporter 5-HTT mRNA expression; and/or increased 5-HT<sub>2A</sub> receptor by acute and/or chronic ECS protocols, partially explain the ECT efficiency on medication-resistant depression (Yoshida et al. 1998, Bijak et al. 2001, Dremencov et al. 2002). Strome et al. (Strome et al. 2005) have showed decreased binding to 5-HT<sub>2</sub> receptors in nonhuman primates after ECS using *in vivo* positron emission tomography. Serotonin-induced regulation of DARPP-32 phosphorylation is mediated primarily via activation of 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>6</sub> (Svenningsson et al. 2002). Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor presents functional alterations after ECS in rats (Bijak et al. 2001).

In conclusion, our results showed that repeated ECS was able to modulate DARPP-32 and phospho-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> levels in the rat striatum and prefrontal

cortex. Single ECS has not shown main changes, although we observed a differential phospho-DARPP-32-Thr<sup>34</sup> level in the striatum. The induction of DARPP-32 phosphorylation affects several different downstream pathways such as those involving receptors, ion channels and transcription factors (Svenningsson et al. 2004). Results on protein profile involved in signaling pathways are relevant for neuropsychiatric disorders and treatment, in particular ECT and can contribute to shed light on the mechanisms underlying its therapeutic and side effects.

### **Acknowledgement**

DVFR is holder of CNPq studentship (201527/2008-1). RPS is holder of CIHR postdoctoral fellow. MARS and JQ are CNPq research fellows. Financial support from CNPq Universal (#471837/2004-0), Programa Institutos do Milênio/CNPq/FINEP, FAPEMIG (# CBB-453/04), FAPESC, Instituto Cérebro e Mente and UNESC.

## Reference list

- Bateup, H.-S., Svenningsson, P., Kuroiwa, M., Gong, S., Nishi, A., Heintz, N., Greengard, P., 2008. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nature Neuroscience* 11, 932-939.
- 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., 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402, 669-671.
- Bijak, M., Zahorodna, A., Tokarski, K., 2001. Opposite effects of antidepressants and corticosterone on the sensitivity of hippocampal CA1 neurons to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptor activation. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363, 491-498.
- Conti, B., Maier, R., Barr, A.-M., Morale, M.-C., Lu, X., Sanna, P.-P., Bilbe, G., Hoyer, D., Bartfai, T., 2007. Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electro convulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine. *Molecular Psychiatry* 12, 167-189.
- Dremencov, E., Gur, E., Lerer, B., Newman, M.-E., 2002. Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hypothalamus. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 26, 1029-1034.
- Feldcamp, L.-A., Souza, R.-P., Romano-Silva, M., Kennedy, J.-L., Wong, A.H., 2008. Reduced prefrontal cortex DARPP-32 mRNA in completed suicide victims with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 103, 192-200.
- Greengard, P., Allen, P.-B., Nairn, A.-C., 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435-447.
- Guitart, X., Nestler, E.-J., 1992. Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in rat frontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 59, 1164-1167.
- Hsieh, T.-F., Simler, S., Vergnes, M., Gass, P., Marescaux, C., Wiegand, S.-J., Zimmermann, M., Herdegen, T., 1998. BDNF restores the expression of Jun and Fos inducible transcription factors in the rat brain following repetitive electroconvulsive seizures. *Experimental Neurology* 149, 161-174.
- Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.-S., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *Journal of Neuroscience* 15, 7539-7547.
- Nomikos, G.-G., Zis, A.-P., Damsma, G., Fibiger, H.-C., 1991. Effects of chronic electroconvulsive shock on interstitial concentrations of dopamine in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berlin)* 105, 230-238.
- Rosa, D.V., Souza, R.P., Souza, B.R., Motta, B.S., Caetano, F., Jornada, L.K., Feier, G., Gomez, M.V., Quevedo, J., Romano-Silva, M.A., 2007a. DARPP-32 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. *Brain Res* 1179, 35-41.
- Rosa, D.-V., Souza, R.-P., Souza, B.-R., Motta, B.-S., Caetano, F., Jornada, L.-K., Feier, G., Jeromin, A., Gomez, M.-V., Quevedo, J., Romano-Silva, M.-A., 2007b. NCS-1 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. *Neurochemical Research* 32, 81-85.

- Smith, S.-E., Sharp, T., 1997. Evidence that the enhancement of dopamine function by repeated electroconvulsive shock requires concomitant activation of D1-like and D2-like dopamine receptors. *Psychopharmacology (Berlin)* 133, 77-84.
- Souza, R.-P., Soares, E.-C., Rosa, D.-V., Souza, B.-R., Gomes, K.-M., Valvassori, S.-S., Reus, G.-Z., Inacio, C.-G., Martins, M.-R., Gomez, M.-V., Quevedo, J., Romano-Silva, M.-A., 2009. Cerebral DARPP-32 expression after methylphenidate administration in young and adult rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 27, 1-7.
- Strome, E.-M., Clark, C.-M., Zis, A.-P., Doudet, D.-J., 2005. Electroconvulsive shock decreases binding to 5-HT<sub>2</sub> receptors in nonhuman primates: an in vivo positron emission tomography study with [<sup>18</sup>F]setoperone. *Biological Psychiatry* 57, 1004-1010.
- Svenningsson, P., Chergui, K., Rachleff, I., Flajolet, M., Zhang, X., El, Y.-M., Vaugeois, J.-M., Nomikos, G.-G., Greengard, P., 2006. Alterations in 5-HT<sub>1B</sub> receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311, 77-80.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.-A., Nairn, A.-C., Greengard, P., 2004. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 44, 269-296.
- Svenningsson, P., Tzavara, E.-T., Liu, F., Fienberg, A.-A., Nomikos, G.-G., Greengard, P., 2002. DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 3188-3193.
- Tess, A.-V., Smetana, G.-W., 2009. Medical evaluation of patients undergoing electroconvulsive therapy. *New England Journal of Medicine* 360, 1437-1444.
- Yoshida, K., Higuchi, H., Kamata, M., Yoshimoto, M., Shimizu, T., Hishikawa, Y., 1997. Dopamine releasing response in rat striatum to single and repeated electroconvulsive shock treatment. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 21, 707-715.
- Yoshida, K., Higuchi, H., Kamata, M., Yoshimoto, M., Shimizu, T., Hishikawa, Y., 1998. Single and repeated electroconvulsive shocks activate dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic neurotransmission in the frontal cortex of rats. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 22, 435-444.
- Zetterstrom, T.-S., Pei, Q., Grahame-Smith, D.-G., 1998. Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration. *Brain Research Molecular Brain Research* 57, 106-110.

## Legend

Figure 1: DARPP-32 (filled circle) and phospho-Thr<sup>34</sup> (empty circle) expression after acute ECS in prefrontal cortex (left) and striatum (right). Single ECS did not change expression of DARPP-32 or phospho-Thr<sup>34</sup> in both regions. Data represent mean  $\pm$  SD.

Figure 2: DARPP-32 (filled circle) and phospho-Thr<sup>34</sup> (empty circle) expression after chronic ECS in prefrontal cortex (left) and striatum (right). We observed enhanced prefrontal cortical DARPP-32 level after half and three hours; increased prefrontal cortical phospho-Thr<sup>34</sup> and striatal DARPP-32 optical density after zero, half, three, 12 and 24 hours as well increased striatal phospho-Thr<sup>34</sup> after half, three, 12 and 24 hours after the last session of the chronic protocol. Data represent mean  $\pm$  SD. \* means p value lower than corrected significance level.



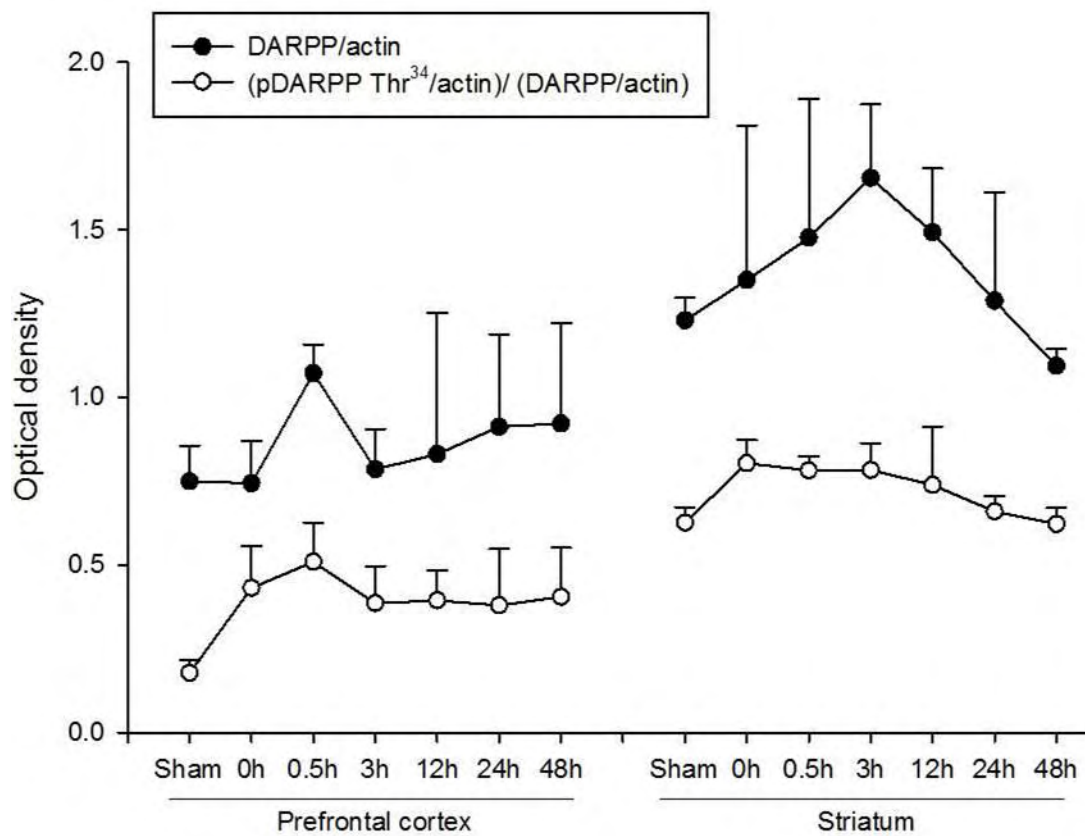


Figure 1

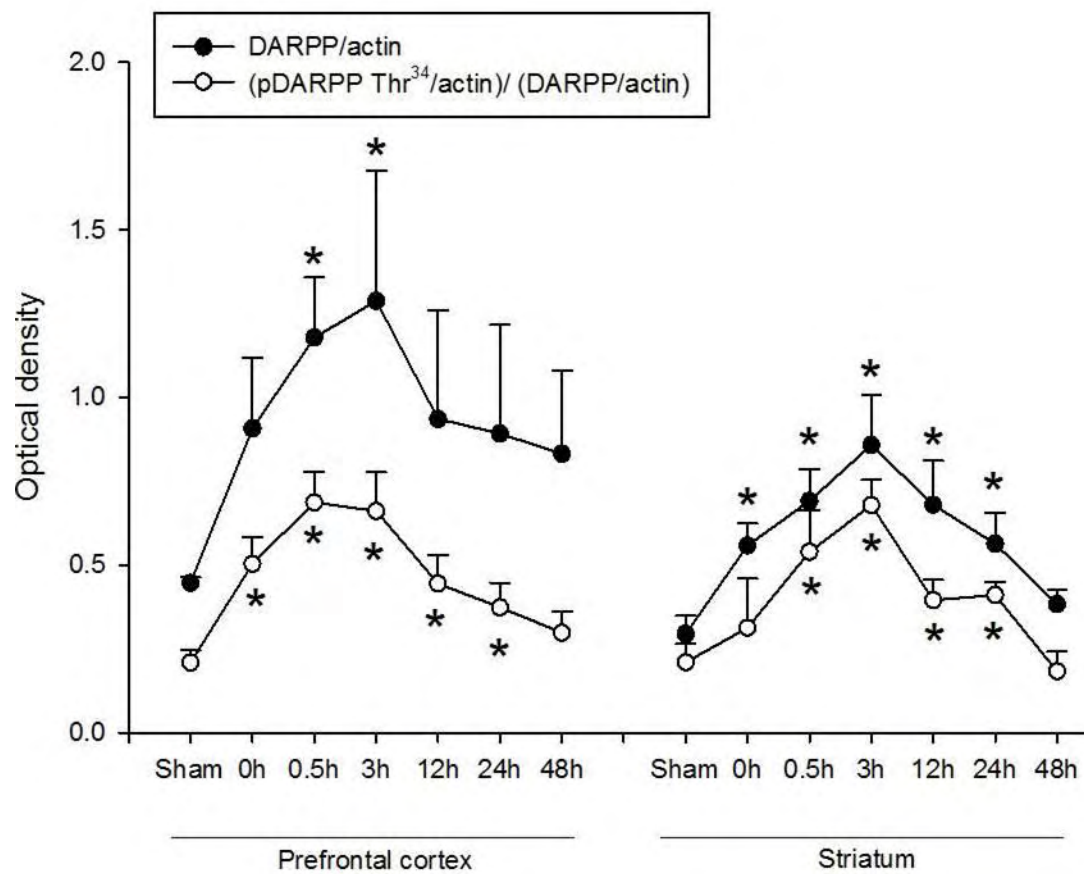


Figure 2

# 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](#)