UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE MENTAL

Luiz Alexandre Viana Magno

FÁRMACOS ESTABILIZADORES DO HUMOR REGULAM A EXPRESSÃO DO SENSOR NEURONAL DE CÁLCIO 1 (NCS-1)

BELO HORIZONTE
2012

Luiz Alexandre Viana Magno

FÁRMACOS ESTABILIZADORES DO HUMOR REGULAM A EXPRESSÃO DO SENSOR NEURONAL DE CÁLCIO 1 (NCS-1)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Medicina Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marco A. Romano-Silva
Coorientadora: Dr.ª Daniela Valadão F. Rosa

BELO HORIZONTE
2012

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

UFMG

ATA DA DEFESA DE DOUTORADO DE **LUIZ ALEXANDRE VIANA MAGNO,** n.ºde registro 2009660077. No dia **vinte e seis de setembro de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"Fármacos estabilizadores do humor regulam a expressão do sensor neuronal de cálcio 1 (NCS-1)";** requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Marco Aurélio Romano-Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marco Aurélio Romano-Silva / orientador	Instituição: UFMG	Indicação: A
Prof. Fabrício Rios Santos	Instituição UFMT	Indicação: A
Prof. Rogério Arena Panizzutti	Instituição: UFRJ	Indicação: A
Prof. Rodrigo Nicolato	Instituição: UFMG	Indicação: A
Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros	Instituição: UFMG	Indicação: A

Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de setembro de 2012.

Prof. Marco Aurélio Romano-Silva / orientador _____

Prof. Fabrício Rios Santos _____

Prof. Rogério Arena Panizzutti _____

Prof. Rodrigo Nicolato _____

Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros _____

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina/UFMG

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640

UFMG

DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Marco Aurélio Romano-Silva, Fabrício Rios Santos, Rogério Arena Panizzutti, Rodrigo Nicolato e Alexandre Guimarães de Almeida Barros, aprovou a defesa da Tese de Doutorado de **LUIZ ALEXANDRE VIANA MAGNO**, intitulada: **"Fármacos estabilizadores do humor regulam a expressão do sensor neuronal de cálcio 1 (NCS-1)",** estando o mesmo apta à obtenção do título de Doutor em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 26 de setembro de 2012.

Prof. Marco Aurélio Romano-Silva
Orientador

Prof. Fabrício Rios Santos

Prof. Rogério Arena Panizzutti

Prof. Rodrigo Nicolato

Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros

A Joana, Luiz e Lívio, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco A. Romano-Silva, pelo acolhimento do "retirante nordestino" e pela oportunidade de realizar essa tese. Como um cientista competentíssimo, seus exemplos foram um grande estímulo para mim. Sinto-me privilegiado por ter recebido sua orientação e sou muito grato pelas oportunidades que proporcionaram a minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Jean-Martin Beaulieu (Canadá), pelas importantes contribuições científicas através da oportunidade de estágio em seu laboratório no *Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec* (*Université Laval*) que culminou na realização de parte do trabalho experimental. Sou muito grato pela confiança e ensinamentos recebidos. Estendo minha gratidão a todo o seu grupo de pesquisa pelo apoio em minhas experiências e por tornar a minha estadia em *Quebec City* fácil e muito agradável. Em especial, ao Thomas Del'Guidice, Camile Latapy, Dr. Claude Lamarre, Nathalie Bouchard e à Dr.ª Annie Barbeau.

A minha coorientadora, Dr.ª Daniela Valadão, pela amizade e por ter contribuído neste trabalho com o coração tão aberto.

Aos meus estimados colegas do Laboratório de Neurociência da Faculdade de Medicina da UFMG. Em especial à Cinthia Santana, Sofia Borges e Andréia Dantés pela contribuição nas experiências científicas. Outros, mesmo não participando diretamente deste trabalho, colaboraram de maneira fundamental. Em especial ao Vitor Bortolo, Patrícia Pereira, Simone Becho, Gabriel Aguiar, Priscila Gubert, Dr.ª Karen Torres, Dr.ª Luciene Bruno, Geisilaine Reis, Sr. Cornélio, Danuza Montijo, Dr. Célio Jr. e Dr. Alexandre Barros. Agradeço pelas palavras de incentivo, argumentações e convivência. Foi um prazer dividir esses momentos com todos.

Ao Prof. Dr. João Quevedo e sua equipe do Laboratório de Neurociência da UNESC, especialmente à Dr.ª Clarissa Comim, pela colaboração científica.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomez, um ícone da ciência brasileira. Sua simplicidade e paixão pela ciência deixaram profundas marcas em mim.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG por todo apoio e incentivo. Em especial ao Prof. Dr. Luiz Armando De Marco e a Prof.ª Dr.ª Débora Miranda.

A equipe do LAFEM/UESC, onde tomei gosto pela ciência. Em especial ao meu amigo, irmão e conselheiro Prof. Dr. Fabrício Rios-Santos pelo carinho e cuidado incansáveis que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza, pelas nossas reflexões calorosas e engraçadas, e pelo apoio fraternal que contribuíram muito na minha jornada acadêmica, desde a iniciação cientifica ao meu doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e no Canadá. Estendo minha gratidão a todas as instituições que fomentaram este estudo, em especial o INCT de Medicina Molecular (FAPEMIG: CBB-APQ-00075-09 / CNPq 573646/2008-2)

Finalmente, não poderia deixar de lembrar o estímulo, a compreensão e o incansável apoio de minha família. Especialmente de meus pais, Joana e Luiz, os quais sempre acreditaram em meus estudos e me deram todo o apoio necessário e meu irmão, Lívio, pela cumplicidade. À memória de Carmosina de Jesus, André Viana, Luiz A. Magno, Silvéria Magno e Tio Pelé, o meu agradecimento eterno por tudo que representaram em nossa família.

A Deus pela beleza e complexidade da vida e pelas bênçãos que abriram portas durante toda a minha vida.

Conhece-te, aceita-te, supera-te.
Santo Agostinho

RESUMO

MAGNO, L.A.V. **Fármacos estabilizadores do humor regulam a expressão do sensor neuronal de cálcio 1 (Ncs-1)**. 2012. 275 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

Os fármacos estabilizadores do humor (FEHs) são uma classe de medicamentos empregados na terapia do transtorno afetivo bipolar (TAB) cujo mecanismo de ação responsável pelas suas ações terapêuticas ainda não é bem esclarecido. Neste estudo, nós investigamos pela primeira vez o efeito dos FEHs lítio (Li), valproato (VPA), lamotrigina (LTG) e carbamazepina (CBZ) sobre a regulação da expressão do sensor neuronal de cálcio tipo 1 (Ncs-1), uma proteína multifuncional desregulada em transtornos psiquiátricos e associada com a sobrevivência e a sinalização dopaminérgica. Além disso, o impacto biológico e farmacológico da deleção genética *in vivo* do Ncs-1 também foi investigado em camundongos e *Caenorhabditis elegans*. Através de diferentes modelos experimentais e regimes de tratamento farmacológico *in vitro* e *in vivo*, os resultados do estudo mostraram que a expressão do Ncs-1 é induzida por Li e VPA em células PC12 e córtex frontal de camundongos após tratamento crônico. Interessantemente, este efeito foi abolido em animais nocautes de βArr2 (beta arrestina 2) e D2R (receptor de dopamina tipo 2). A inibição das vias de sinalização de Gsk3 e Erk, as quais são alvos em comum de Li e VPA, mas não a inibição de histonas deacetilases, induziu a expressão o gene *NCS-1 in vitro* e *in vivo*, enquanto que a superexpressão de Gsk3β reduziu drasticamente os níveis de RNAm deste gene. O efeito mediado pela inibição de Gsk3 ou Erk sobre o gene *NCS-1* mostrou-se fundamental para a elevação dos níveis intracelulares de Ncs-1 pois a inibição da tradução impediu tal aumento observado. Com a finalidade de compreender como a expressão do gene *NCS-1* é regulada, sequências candidatas a promotor foram clonadas em um sistema de gene repórter, porém, nenhuma atividade significante dessas sequências foi detectada em células transfectadas. Além disso, os diferentes modelos experimentais empregados pelo estudo mostraram que

animais nocautes de Ncs-1 são caracterizados por alterações no estresse oxidativo e metabolismo energético cerebral, memória e perda de resposta hiperlocomotora induzida por anfetamina. Um modelo experimental de mania aguda induzida por anfetamina que foi caracterizado por níveis reduzidos de Ncs-1 especificamente no córtex frontal, foi tratado com VPA e obteve normalização dos níveis de Ncs-1. Até o momento, poucos alvos moleculares em comum relacionados com a ação farmacológica dos FEHs foram identificados. Desta forma, as evidências apresentadas por este estudo apontam a proteína multifuncional Ncs-1 como o mais novo alvo celular em comum regulado por Li, VPA, Gsk3 e Erk. Estes resultados inéditos, além de prover novos conhecimentos neurobiológicos, abrem uma janela de oportunidades para novas explorações que investiguem o papel celular do Ncs-1 através da inibição de Gsk3 e Erk na mediação dos efeitos terapêuticos e/ou adversos do tratamento com fármacos estabilizadores do humor.

Palavras-chave: fármacos estabilizadores do humor. lítio. valproato. transtorno afetivo bipolar. mania. sensor neuronal de cálcio 1. Gsk3. Erk. βArr2. D2R. AMPH. expressão gênica. animais geneticamente modificados.

ABSTRACT

MAGNO, L.A.V. **Mood-stabilizing drugs regulate the neuronal calcium sensor 1 (Ncs-1) expression**. 2012. 275 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

Mood stabilizers (MSDs) represent a class of drugs commonly prescribed for bipolar disorder (BD) treatment though the molecular mechanisms underlying their actions remain to be identified. The aim of this study was to evaluate the effect of the MSDs lithium (Li), valproate (VPA), lamotrigine (LTG) and carbamazepine (CBZ) on the levels of neuronal calcium sensor 1 (Ncs-1), a multifunctional protein has been involved in many neuronal functions such as survival and dopamine signaling. Furthermore, the biological impact of the Ncs-1 genetic disruption was investigated in mice and *Caenorhabditis elegans* as well. Treatment with a therapeutically relevant dose of Li and VPA for 4 weeks caused an increase in the level of Ncs-1 in mouse frontal cortex. Interestingly, this effect was abolished in βArr2 (beta-arrestin 2) and D2R (dopamine receptor type 2) knockout (KO) mice. Two inhibitors of Gsk3 or Mek1/2 (TDZD and U0126, respectively), recently identified targets of Li and VPA, but not histone deacetylase specific inhibitors, also increased the levels of Ncs-1 protein and gene expression both *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, Gsk3β overexpression strongly reduced Ncs-1 mRNA levels. Cycloheximide, an inhibitor of protein biosynthesis in eukaryotic organisms, was found to impair the TDZD or U0126-induced Ncs-1 expression. Then, we developed a luciferase reporter system to investigate how the Gsk3 and Erk1/2 inhibition regulate the Ncs-1 gene expression. However, no significant luciferase activity was found in transfected cells with the constructs of the Ncs-1 promoter. Furthermore, we also found significant changes in cerebral oxidative stress and energy metabolism, memory impairment and lack of the d-amphetamine-induced hyperlocomotion in Ncs-1 KO mice. We have found decreased levels of Ncs-1 in the frontal cortex of a d-amphetamine-based behavioral model of acute mania, however, one week VPA treatment restored both the behavior and the Ncs-1 levels. To our knowledge, this is the first report that has investigated

the pharmacologic action of MSDs on Ncs-1 expression. Our data suggest that these drugs might exert their actions on Ncs-1 via Gsk3 and Erk inhibition. The finding that two widely prescribed mood stabilizers have a common action, the increased Ncs-1 protein expression in *vitro* and *in vitro*, raises the question of what the link is between the mechanisms of action of the mood stabilizers and Ncs-1 induction. It is also unclear whether Ncs-1 induction is involved in the mood-stabilizing effects of these drugs. Further studies will be needed to address these issues and the involvement of Ncs-1 in the pathogenesis of BD. In conclusion, the data obtained from this study identified Ncs-1, a protein that may play a role in psychiatric disorders, as a protein that is commonly induced by the two mood stabilizers, Li e VPA.

Keywords: mood-stabilizing drugs. lithium. valproate. bipolar disorder. mania. neuronal calcium sensor 1. Gsk3. Erk. βArr2. D2R. AMPH. gene expression. genetically modified animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Petalita (LiAl (Si2O5)2) extraída no estado de Minas Gerais, Brasil..... 34

Figura 2. *Valeriana officinalis* e reação de síntese do valproato.....39

Figura 3. Suposto papel de vias de sinalização na fisiopatologia psiquiátrica..... 47

Figura 4. Receptores e acoplamento de vias de sinalização..... 49

Figura 5. Acetilação de histonas.....51

Figura 6. Níveis elevados de histona H3 acetilada (acH3K14) no núcleo accumbens (NAc) em *chronic social defeat stress* em camundongos e pacientes com depressão..... 53

Figura 7. Inibidores de histona deacetilases mais comuns..... 56

Figura 8. Insulina inibe Gsk3 e estimula a síntese de glicogênio: a primeira função atribuída a Gsk3..... 58

Figura 9. Complexo βarr2/PP2A/Akt media os efeitos terapêuticos e moleculares do lítio e dopamina sobre Gsk3..... 64

Figura 10. Regulação da sinalização Akt/Gsk3 por fármacos que afetam a sinalização dopaminérgica e serotoninérgica (5-HT)..... 66

Figura 11. Ilustração esquemática das vias de sinalização que regulam Gsk3 e funções de Gsk3 relacionadas com a regulação do humor.....67

Figura 12.Múltiplos alvos de Gsk3 estão relacionados com diversas doenças..... 68

Figura 13. Via das MAPKs.....71

Figura 14. Representação esquemática da estrutura geral dos NCSs..... 75

Figura 15. Comparação da afinidade ao Ca^{2+} entre NCSs e calmodulina..... 76

Figura 16. Um mapa de interação proteína-proteína mostrando algumas interações conhecidas de Ncs-1.....79

Figura 17. Ncs-1 inibe GRK2 e regula a exposição de D2R na membrana..... 80

Figura 18. Habituação ao Campo Aberto..... 102

Figura 19. Memória de reconhecimento de objeto..... 101

Figura 20. Sequência de -2.100 pb (GRCh37:9:132932757-132934978) 5' *upstream* ao TSS do *NCS-1*..... 120

Figura 21. Predição de ilhas de CpG em -2.000 pb na extremidade 5' *upstream* do gene *NCS-1*..... 121

Figura 22. Esquema representando a estrutura genômica do gene *NCS-1* (superior) e dos clones utilizados como candidatos a promotor no estudo (inferior).....121

Figura 23. Plasmídeo pGL4.10[luc2]..... 124

Figura 24.Múltiplos sítios de clonagem do plasmídeo pGL4.10[luc2]..... 125

Figura 25. Anelamento de primers na sequência de GRCh37:9:132932757-132936303:1.....126

Figura 26. Anelamento de primers na sequência GRCh37:16:13328837:13334322:1.....128

Figura 27. Tratamento com lítio eleva os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12...151

Figura 28. Tratamento com valproato eleva os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12..... 152

Figura 29. Tratamento com lamotrigina eleva os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12..... 153

Figura 30. Tratamento com carbamazepina não altera os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12..... 153

Figura 31. Efeito do tratamento com fármacos estabilizadores do humor na viabilidade de células PC12 155

Figura 32. Efeito do tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na viabilidade de células PC12 156

Figura 33. Pré-tratamento com Li, VPA e CBZ causa resistência ao dano celular induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células PC12 158

Figura 34. Tratamento crônico com estabilizadores do humor modulam a expressão de Ncs-**1** no c**é**rebro de camundongos 160

Figura 35. Efeito do tratamento agudo com estabilizadores do humor na expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos 162

Figura 36. Efeito do tratamento com fármacos estabilizadores do humor nos níveis de RNAm de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo* 164

Figura 37. Efeito do tratamento com inibidores de histona deacetilase na expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo* 167

Figura 38. Li e VPA aumentam os níveis de pGsk3β Ser9 *in vitro* e *in vivo* 169

Figura 39. Camundongos nocautes de βarr2 e D2R não possuem níveis alterados de Ncs-1 no córtex frontal 172

Figura 40. Tratamento crônico com Li e VPA não modulam a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos nocautes para βarr2 e D2R 173

Figura 41. Tratamento com TDZD-8, um inibidor seletivo de Gsk3, aumenta a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos 176

Figura 42. Camundongos Gsk3$\alpha^{-/-}$ ou Gsk3$\beta^{+/-}$ não possuem níveis alterados de Ncs-1 no córtex frontal 178

Figura 43. Animais Gsk3$\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ possuem depleção de Gsk3β especificamente no prosencéfalo 179

Figura 44. A expressão de Ncs-1 não está alterada no córtex frontal de animais $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ 180

Figura 45. TDZD-8 induz os níveis de RNAm de Ncs-1 em PC12 e HEK 293..... 181

Figura 46. Inibição de Gsk3 pelo TDZD-8 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12..... 181

Figura 47. Efeito da superexpressão de Gsk3β sobre os níveis de proteína e RNAm de Ncs-1 em HEK 293..... 183

Figura 48. Inibição de Mek 1/2 induz a expressão de Ncs-1 em PC12 e no córtex frontal de camundongos..... 188

Figura 49. U0126 induz os níveis de RNAm de Ncs-1 em PC12 mas não em HEK 293..... 190

Figura 50. Inibição de Mek 1/2 pelo U0126 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12..... 190

Figura 51. Efeito do tratamento combinado de fármacos sobre os níveis intracelulares de Ncs-1 em células PC12..... 194

Figura 52. Estudo da transcrição do gene *NCS-1* através de gene repórter da luciferase..... 197

Figura 53. Reversão da hiperlocomoção induzida por AMPH após tratamento com VPA..... 201

Figura 54. Redução da expressão de Ncs-1 no modelo experimental de hiperlocomoção induzida por AMPH é revertida após tratamento com VPA..... 202

Figura 55. Ausência de Ncs-1 em animais $Ncs\text{-}1^{-/-}$ abole a hiperlocomoção induzida pela anfetamina..... 204

Figura 56. Impacto da ausência de Ncs-1 sobre parâmetros antioxidantes cerebrais..... 208

Figura 57. Impacto da ausência de Ncs-1 sobre a atividade de complexos mitocondriais no cérebro de camundongos.....209

Figura 58. Impacto da ausência de Ncs-1 sobre a atividade de SDH e CK no cérebro de camundongos.....212

Figura 59. Efeito do tratamento com valproato sobre a peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas cerebrais em animais deficientes de Ncs-1.....215

Figura 60. Efeito do tratamento crônico com valproato sobre a memória de reconhecimento de objetos de longa de duração em animais Ncs-1 WT, HT e KO.....217

Figura 61. Impacto do paraquat na longevidade das cepas de *C. elegans N2* e *XA406*.....219

Figura 62. Impacto do paraquat sobre o desenvolvimento larval das cepas de *C. elegans N2* e *XA406*.....221

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura e alvos farmacológicos de fármacos estabilizadores do humor (FEHs).....34

Tabela 2. Fases do tratamento do TAB e opções terapêuticas de 1° linha.....47

Tabela 3. Fármacos utilizados pelo estudo.....89

Tabela 4. Primers utilizados para genotipagem dos camundongos.....95

Tabela 5. Experimento reversão da mania induzida por AMPH após tratamento com VPA.....100

Tabela 6. Anticorpos utilizados pelo estudo.....112

Tabela 7. *Primers* utilizados no qPCR.....115

Tabela 8. Posição da região intergênica entre *NCS-1* e *GPR10*.....118

Tabela 9. *Primers* com sítios de restrição inseridos (destacados em negrito) para clonagem.....129

Tabela 10. *Primers* utilizados para isolar os insertos para clonagem.....129

Tabela 11. Sítios de clonagem utilizados para clonagem no pGL4.10.....132

Tabela 12. Condições de reação para as enzimas de restrição utilizadas no estudo.....132

LISTA DE ABREVIATURAS

ed.	editor
et al.	e outros
p.	página
v.	volume
Inc.	*incorporation*
Co.	companhia
St.	*Saint*

LISTA DE SIGLAS

5-HT	serotonina
5Y5Y	neuroblastoma humano
A	adenina
Abs	absorbância
acetil-CoA	acetil-coenzima A
ADP	adenina bifosfato
AEBSF	*4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*
Akt	*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*
ALS	esclerose lateral amiotrófica
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AMPH	D-anfetamina
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora 1
APA	Associação Americana de Psiquiatria
ATP	adenina trifosfato
BACT	beta-actina (gene)
Bad	proteína promotora de morte associada ao Bcl-2
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BHT	hidróxi-tolueno butilado
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BSA	albumina bovina sérica
C	citosina
C-	controle negativo sem amostra
CaMKII	proteína quinase II dependente de Ca^{2+} e calmodulina
CamKII-Cre	Cre recombinase sob controle do promotor da *CaMKII*
CAT	catalase
CBZ	carbamazepina
CER	cerebelo
CFU	unidade formadora de colônias
CGC	*Caenorhabditis Genetics Center*
CHX	ciclohexamida
CID-10	Classificação Internacional de Doenças - 10
CIP	fosfatase alcalina extraída de intestino bovino
CK	caseína quinase
CKAMP44	*cystine-knot AMPAR modulating protein*
CO_2	gás carbônico
CoQ	coenzima Q
CP	carbonilação de proteínas
CPF	córtex pré-frontal
CREB	elemento de ligação em resposta ao AMPc
CTP	citosina-trifosfato

Ctrl	controle
CTX	córtex
D.O.	densidade óptica
DAG	diacilglicerol
DARPP-32	fosfoproteína neuronal regulada por dopamina e AMPc
DAT	proteína transportadora de dopamina
dATP	desóxi-adenina-trifosfato
DCIP	2,6-dicloroindofenol
dCTP	desóxi-citosina-trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desóxi-guanina-trifosfato
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPH	4-dinitrofenilhidrazina
DRIP	proteínas que interagem com receptores de dopamina
D2R	receptor de dopamina tipo 2
DSM-IV	*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th Ed
DTT	ditiotreitol
dTTP	desóxi-timina-trifosfato
dUTP	desóxi-uridina-trifosfato
EDTA	ácido etileno amino tetra acético
EGTA	ácido etileno glicol tetracético
Erk	quinase regulada por sinal extracelular
EST	estriado
FDA	*Food and Drug Administration*
FEH	fármaco estabilizador do humor
Flox	*flanked by loxP*
FT	fator de transcrição
loxP	*locus of crossover in P1*
FMN	flavina mononucleotídeo
Freq	frequenina
g	grama
G	guanina
GABA	ácido gama-aminobutírico
GCAPs	proteínas ativadoras de guanilil ciclase
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GRK2	quinase-2 de receptores acoplados a proteína G
GSK-3	glicogênio sintase quinase 3 (gene)
Gsk3	glicogênio sintase quinase 3 (proteína)
GST	glutationa S-transferase
GTP	guanina-trifosfato
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HAT	histona acetilase
HCl	ácido clorídrico
HDAC	histona deacetilase
HEK 293	*human embryonic kidney cell line 293*
HIP	hipocampo
HT	heterozigoto
IC_{50}	concentração inibitória média

IHDAC	inibidor de histona deacetilase
IL-1β	interleucina 1 beta
IMPase	inositol monofosfatase
IP_3	inositol 1,4,5-trifosfato
IP3R	receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
IPPase	inositol polifosfatase
ISRS	inibidores seletivos da recaptação de serotonina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
kb	quilo bases
KChIPs	proteínas que interagem com canais de K^+
kDa	1.000 Dalton
KO	nocaute
L	litro
L1	estágio larval 1
L2	estágio larval 2
L3	estágio larval 3
L4	estágio larval 4
LB	Luria-Bertani
Li	lítio
LiAl	petalita
LTG	lamotrigina
Luc	luciferase
M	molar
MAO	monoamina oxidase
MAK	proteína quinase ativada por mitógenos
MD	malondialdeído
Mek	quinase ativada por mitógenos
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MS275	entinostat
MSC	múltiplos sítios de clonagem
MTT	*dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt*
Myc-Gsk3β	plasmídeo de expressão da Gsk3β beta humana
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCS	sensor neuronal de cálcio
NCS-1	sensor neuronal de cálcio (gene)
Ncs-1	sensor neuronal de cálcio (proteína)
NF-kB	fator nuclear kB
ng	nanograma
NGF	fator de crescimento do neurônio
NGM	meio de crescimento de nematódeos
NO	óxido nítrico
NTC	controle sem amostra de RNA
O2•-	radical superóxido
OH•	radical hidroxila
PA	padrão analítico
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	par de bases

pβGal-CMV	plasmídeo de expressão de beta galactosidase
PBS	tampão fosfato-salino
PC12	linhagem celular de feocromocitoma de rato
pcDNA3	plasmídeo pcDNA3 vazio
PCR	reação em cadeia da polimerase
pGL4.10[luc2]	plasmídeo de expressão de luciferase sem promotor
pH	potencial hidrogeniônico
pHMB	ácido p-hidroximercuribenzóico
PI(4,5)P2	inositol (4,5) bifosfato
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PI4K IIIβ	fosfatidilinositol 4-quinase IIIβ
PIP2	fosfatidil inositol bifosfato
PIP3	fosfatidil inositol trifosfato
PKA	proteína quinase A
PKB	proteína quinase B
PKC	proteína quinase C
PL	peroxidação de lipídios
PLC	fosfolipase C
PMS	metilsulfato de fenazina
PMSF	fluoreto de fenil-metil-sulfonil
PP2A	proteína fosfatase 2A
qPCR	reação da polimerase em cadeia quantitativa
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
RNAt	RNA transportador
ROX	*carboxy-X-rhodamine*
RT-	reação desprovida de transcriptase reversa
RT-PCR	transcriptase reversa por reação de polimerase em cadeia
SAHA	*suberoylanilide hydroxamic acid*
Sal	salina
SAPK	proteína quinase ativada pelo estresse
SDH	succinato desidrogenase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
SFE	soro fetal equino
SOD	superóxido dismutase
SOE	transtorno bipolar do humor sem outra especificação
T	timina
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS	tampão tris-borato-salino
TBST	tampão tris-borato-salino-tween20
TCA	ácido tricarboxílico
Tcf/LEF	*T-cell factor/lymphoid enhancer-binding fator*
TDZD-8	*4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione*
TE	Tris-EDTA
TEP	1,1,3,3 – tetra-etóxi-propano

TAB	transtorno afetivo bipolar
Tm	temperatura de desnaturação do DNA
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TSS	sítio de início da transcrição
TTP	timina trifosfato
Tub	tubulina
U	uracila (DNA)
U	unidade (proteína)
UTR	*untranslated region*
U.V.	luz ultravioleta
VILIP	visinina
VPA	valproato
WT	*wild type*
βArr2	β-arrestina 2
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

-	negativo
:	dividido por
&	e
%	porcentagem ou proporção
©	*corpright*
®	registrado
+	positivo
<	menor que
=	igual a
>	maior que
™	*trademark* (marca registrada)
X	vezes (concentração)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 30

1.1 Fármacos Estabilizadores do Humor (FEHs) 31

1.1.1 Lítio (Li) 35
1.1.2 Valproato (VPA) 38
1.1.3 Lamotrigina (LTG) 41
1.1.4 Carbamazepina (CBZ) 42
1.1.5 Uso clínico dos FEHs no transtorno afetivo bipolar (TAB) 45

1.2 Mecanismos fisiopatológicos do TAB são alvos dos FEHs 48

1.2.1 Vias intracelulares de transdução de sinais e doenças psiquiátricas 49
1.2.2 Histonas deacetilases 51
1.2.3 Gsk3 59
1.2.4 MAPKs 72

1.3 Ncs-1 76

1.3.1 Ncs-1 é um membro da família dos sensores neuronais de cálcio 76
1.3.2 Descoberta e primeiras funções associadas ao Ncs-1 78
1.3.3 Ncs-1, dopamina e doenças psiquiátricas 82

2 OBJETIVOS 85

2.1 Objetivo Geral 86

2.2 Objetivos Específicos 86

3 MATERIAIS E MÉTODOS 87

3.1 Vetores plasmidiais 88

3.2 Linhagens celulares 88

3.3 Fármacos 88

3.4 Animais 89

3.4.1 Camundongos C57 B/L WT 89
3.4.2 Camundongos nocautes de β Arr2, D2R, DAT, Gsk3 α e Gsk3 β 90
3.4.3 Camundongos CamKII-Cre, Gsk3 $\beta^{Flox/Flox}$ e Gsk3 $\beta^{Flox/Flox, CamKII\text{-}Cre+}$ 90
3.4.4 Camundongos nocautes de Ncs-1 91
3.4.5 Ratos Wistar WT 91
3.4.6 Caenorhabditis elegans: cepa WT N2 Bristol 92
3.4.7 Caenorhabditis elegans: cepa XA406 92

3.5 Genotipagem de animais modificados geneticamente 92

3.5.1 Extração de DNA 92
3.5.2 Quantificação do DNA extraído 93
3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 94
3.5.4 Eletroforese em gel de agarose 94
3.5.5 Identificação dos genótipos 96
3.6 Manutenção e tratamento farmacológico em roedores 97
3.6.1 Tratamento Agudo 98
3.6.2 Tratamento Crônico 98
3.6.3 Tratamento crônico com VPA para avaliação da memória 99
3.6.4 Modelo animal de mania induzida por AMPH e tratamento com VPA para reversão dos sintomas 99
3.6.5 Obtenção dos tecidos cerebrais 100
3.7 Testes comportamentais 101
3.7.1 Habituação 101
3.7.2 Habituação ao Campo Aberto (*Open-Field Task*) 101
3.7.3 Memória de Reconhecimento de Objetos 103
3.8 Cultura de Células 104
3.8.1 Cultivo 104
3.8.2 Subcultivo 104
3.8.3 Congelamento 105
3.8.4 Descongelamento 105
3.8.5 Obtenção para experimentação 106
3.8.6 Tratamento farmacológico 106
3.8.7 Transfecção 107
3.9 Avaliação da Viabilidade Celular 107
3.9.1 Teste do MTT 108
3.9.2 Marcação com Hoechst 33342 108
3.10 Western Blot 109
3.10.1 Extração de proteínas totais de células e tecidos 109
3.10.2 Quantificação de proteínas 110
3.10.3 SDS PAGE 111
3.10.4 Imunodetecção 111
3.11 Análise da Expressão Genética 112
3.11.1 Extração de RNA 113
3.11.2 Quantificação de RNA total 114
3.11.3 Eletroforese do RNA 114
3.11.4 Reação da transcriptase reversa (síntese de cDNA) 114
3.11.5 qPCR 115
3.12 Estudo da regulação transcricional do gene *NCS-1* 116
3.12.1 Seleção da região candidata a promotor do gene *NCS-1*. 117
3.12.2 Vetor pGL4.10[luc2] 124
3.12.3 Desenho dos primers para clonagem em plasmídeo repórter 125
3.12.4 Ensaios de atividade de luciferase e β-galactosidase 130
3.13 Clonagem 131

3.13.1 Reação de PCR para amplificação dos insertos originados a partir do gene *NCS-1* e do éxon 5 do gene *CKAMP44*....131
3.13.2 Digestão dos insertos e vetores....131
3.13.3 Desfosforilação dos vetores....133
3.13.4 Purificação dos insertos e vetores....133
3.13.5 Inserção dos fragmentos de DNA no vetor pGL4.10....134
3.13.6 Preparo de *Escherichia coli* (cepas DH5- α) quimicamente competentes....134
3.13.7 Transformação de bactérias competentes....135
3.13.8 Análise das colônias recombinantes....135
3.13.9 Minipreparação de DNA plasmidial....136
3.13.10 Preparação em grande escala de DNA plasmidial....136
3.13.11 Quantificação de DNA plasmidial....137
3.14 Avaliação do estresse oxidativo....137
3.14.1 Catalase (CAT)....138
3.14.2 Superóxido dismutase (SOD)....138
3.14.3 Peroxidação de lipídios....139
3.14.4 Carbonilação de proteínas....140
3.14.5 Complexos Mitocondriais....141
3.14.6 Succinato desidrogenase....142
3.14.7 Creatina quinase (CK)....143
3.15 *Caenorhabditis elegans*....143
3.15.1 Cultivo....144
3.15.2 Tratamento com Paraquat....145
3.15.3 Análise da longevidade....145
3.15.4 Efeito do paraquat sobre a viabilidade e desenvolvimento larval....146
3.15.5 Análise estatística....146
4 RESULTADOS....148
4.1 Parte I....149
4.1.1 Fármacos estabilizadores do humor modulam os níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro.*....150
4.1.2 Concentrações de fármacos estabilizadores do humor que aumentam os níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro* também aumentam a resistência celular ao dano causado pelo H_2O_2.....154
4.1.3 Fármacos estabilizadores do humor modulam os níveis protéicos de Ncs-1 *in vivo.*....159
4.1.4 Efeito do tratamento com fármacos estabilizadores do humor nos níveis de RNAm de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*....163
4.1.5 Efeito da modificação de histonas sobre os níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*....165
4.1.6 Fármacos estabilizadores do humor inibem Gsk3 β 168
4.1.7 Efeito do Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1 *in vivo* é dependente de β arr2 e D2R.....170
4.1.8 TDZD-8, um inibidor específico de Gsk3, aumenta a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*....174

4.1.9 Diminuição específica da expressão de Gsk3 α ou Gsk3 β não altera os níveis cerebrais de Ncs-1 177
4.1.10 TDZD-8 induz a expressão genética de Ncs-1. 181
4.1.11 Inibição de Gsk3 pelo TDZD-8 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. 182
4.1.12 Superexpressão de Gsk3 β diminui a expressão do RNAm de Ncs-1 sem alterar os níveis protéicos de Ncs-1. 184
4.1.13 Inibição de Mek/Erk induz a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*. 186
4.1.14 Inibição de Mek/Erk induz a expressão genética de Ncs-1. 189
4.1.15 Inibição de Mek/Erk pelo U0126 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. 191
4.1.16 Efeito do tratamento combinado de fármacos sobre os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. 193
4.1.17 Estudo da transcrição do gene *NCS-1* através de gene repórter da luciferase 195

4.2 Resultados Parte II 198

4.2.1 Modelo animal de mania induzida por AMPH, tratamento com VPA e expressão cerebral de Ncs-1 199
4.2.2 Abolição da hiperlocomoção induzida pela AMPH em animais Ncs-1 KO 203
4.2.3 Impacto da ausência de Ncs-1 sobre os parâmetros antioxidantes e metabolismo energético cerebral 205
4.2.4 Efeito do tratamento com VPA sobre parâmetros antioxidantes em animais deficiente de Ncs-1 212
4.2.5 Efeito do tratamento com VPA sobre a memória de reconhecimento de objetos em animais Ncs-1 HT e KO 216
4.2.6 Longevidade e resistência ao estresse oxidativo induzido pelo paraquat em cepas de *C. elegans* nocaute de Ncs-1. 218

5 DISCUSSÃO 222

5.1 Estabilizadores do humor induzem alterações na expressão de Ncs-1 223

5.2 Mecanismos de ação relacionados com a indução da expressão de Ncs-1 231

5.2.1 Inibição da acetilação de histonas 231
5.2.2 Inibição de Gsk3 234
5.2.3 Inibição de Erk 238

5.3 Regulação da expressão genética do gene *NCS-1* pelos inibidores TDZD e U0126 240

5.4 Impacto da deleção de Ncs-1 *in vivo* 242

6 CONCLUSÃO 248

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 251

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fármacos Estabilizadores do Humor (FEHs)

> *"De forma geral, não existe uma definição aceita para o termo "estabilizador de humor" (...) O uso do termo, na verdade, tem sido às vezes indiscriminado assemelhando-se ao mau uso de outras palavras em psiquiatria, para o qual o princípio de Humpty Dumpty aplica-se: "isso significa exatamente o que eu quero que ela signifique - nem mais nem menos" (Lewis Carroll, 1998)." Extraído de* ***What is a mood stabilizer?*** (GOODWIN, GUY M; MALHI, 2007)

Exatidão terminológica nunca foi um ponto forte da farmacologia. Se um fármaco em questão for especificado em nível de uma interação química fundamental, todos os medicamentos com ação semelhante irão formar uma classe. Atualmente isso é possível já que, desde a síntese de um novo composto, é possível prever a sua classe e provável indicação clínica baseado em suas ações moleculares específicas (EETHAM; EAL, 2000). No entanto, na história da psicofarmacologia, os efeitos de medicamentos foram observados clinicamente antes de sua ação molecular ser entendida. Os termos neuroléptico, antidepressivo e ansiolítico são bons exemplos. Ao passo em que a ciência avançou, os estudos mostraram o que tais termos significavam em nível molecular, proporcionando o nascimento de uma nova geração de compostos "farmacologicamente racionais", como, por exemplo, antagonistas dos receptores de dopamina e inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS). Em contrapartida, para os sais de lítio (Li), ainda não existe tal desenvolvimento racional para uma nova "entidade química" com comparáveis ações moleculares e benefícios clínicos. Em vez disso, existem apenas analogias incompletas como motor da inovação ligando a ação do medicamento a fisiopatologia. Segundo Goodwin e Malhi, o efeito estabilizador de humor, se

existir, ainda não pode ser definido em nível molecular ou mesmo fisiológico (GOODWIN, GUY M; MALHI, 2007). Os compostos ainda devem ser medidos a partir de uma definição pragmática de eficácia clínica, como os medicamentos originais psicotrópicos. O termo estabilizador do humor, por exemplo, sequer é formalmente reconhecido por autoridades regulatórias como a *Food and Drug Administration* (FDA).

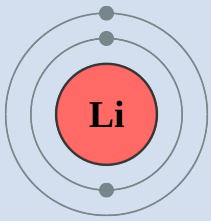
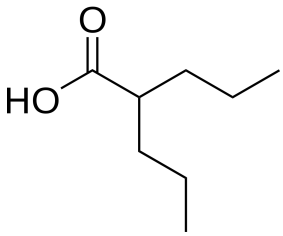
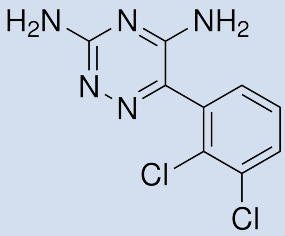
Geralmente, os fármacos estabilizadores do humor (FEHs) representam uma classe de medicamentos que têm se valorizado cada vez mais no tratamento do transtorno afetivo bipolar (TAB) (RAPOPORT *et al.*, 2009; SCHLOESSER *et al.*, 2012; TAMMINGA *et al.*, 2002). Os FEHs mais estudados e empregados clinicamente são os sais de lítio (Li) e os anticonvulsivantes valproato (VPA), lamotrigina (LTG) e carbamazepina (CBZ). Todos os FEHs mostram alguma eficácia para tratar a mania (exceto LTG) e depressão bipolar (FOUNTOULAKIS; VIETA, 2008; MALHI; ADAMS, D.; BERK, 2009; MALHI; ADAMS, D.; CAHILL; *et al.*, 2009). Importantemente, os FEHs diminuem os episódios de recorrência (fase de profilaxia) e o Li diminui o risco de suicídio (MÜLLER-OERLINGHAUSEN; LEWITZKA, 2010). Vários medicamentos desenvolvidos para outras indicações foram posteriormente inseridos no "coquetel estabilizador do humor". Por exemplo, os antipsicóticos atípicos quetiapina, risperidona, olanzapina, ziprasidona e aripiprazol (ALTAMURA *et al.*, 2011). Contudo, desde a introdução do Li há mais de 60 anos, nenhum novo composto foi introduzido especificamente para o tratamento do transtorno bipolar.

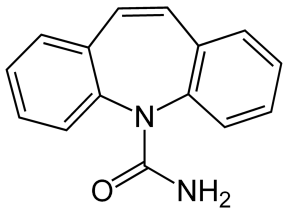
Estruturalmente, os FEHs são muito diferentes. Por exemplo, o Li é um íon monovalente, o VPA é um ácido graxo de cadeia curta com oito carbonos, a LTG um derivado da feniltriazina e CBZ está estruturalmente relacionada com os antidepressivos tricíclicos (Tabela 1). Inicialmente, esta observação sugeriu que estes compostos estruturalmente não-relacionados dificilmente compartilhariam um mecanismo de ação ou alvo em comum. No entanto, devido aos benefícios clínicos similares no tratamento do

transtorno bipolar do humor (às vezes com semelhantes magnitudes entre eles), é provável que os alvos celulares modulados pelos FEHs possam mostrar convergência (HARWOOD, A. J.; AGAM, 2003; WILLIAMS, R. S. B. *et al.*, 2002).

Originalmente, a investigação sobre a ação desses fármacos ficou concentrada nos efeitos mediados por possíveis receptores. Porém, tornou-se claro que eles provavelmente não exercem suas ações interagindo especificamente com os receptores de superfície celular (RAPOPORT *et al.*, 2009). Logo, esta premissa tem estimulado os cientistas a concentrar esforços em possíveis alvos intracelulares. Este foco levou a numerosas descobertas, incluindo alguns alvos diretos e o conceito de que os FEHs modulam múltiplos alvos e efeitos celulares (GOULD, TODD D *et al.*, 2004; RAPOPORT *et al.*, 2009; STOLL; SEVERUS, W. E., 1996). Apesar do avanço, ainda não está claro qual é o principal alvo intracelular que desencadeia as modificações celulares terapeuticamente relevantes desses medicamentos. Deste modo, as investigações recentes também têm focado na identificação de alvos celulares que estão sujeitos a sofrer ação comum pelos FEHs (HARWOOD, A. J.; AGAM, 2003; WILLIAMS, R. S. B. *et al.*, 2002; YU, Z. *et al.*, 2011).

Tabela 1. Estrutura e alvos farmacológicos de fármacos estabilizadores do humor (FEHs).

FEHs / estrutura	Alvos moleculares conhecidos [a]
Lítio (Li) 	Depleção de inositóis, por exemplo, através da inibição de inositol monofosfatase (IMPase) e polifosfato de inositol 1-fosfatase (IPPase). Inibição de glicogênio sintase quinase-3 (Gsk3) e acúmulo de β-catenina. Inibição de fosfoesterases dependentes de magnésio, incluindo frutose 1,6-bifosfatase (FBPase) e 3'-5'-fosfato fosfoadenosina (PAP) fosfatase. Inibidor direto da fosfoglicomutase (PGM), uma enzima que catalisa a conversão reversível de glicose-1-fosfato a glucose-6-fosfato. Inibição da proteína quinase C (PKC) e redução dos níveis fosforilados de seu principal substrato, MARKS. Redução da taxa de rotatividade dos fosfolipídios cerebrais tal como ácido araquidônico (AA). Aumento ou redução dos níveis de pErk. Aumento dos níveis basais de AMPc. Inibe recaptação pré-sináptica de glutamato.
Valproato (VPA) 	Aumento da atividade GABAérgica através da inibição da GABA aminotransferase (enzima que degrada GABA) e indução da glutamato descarboxilase (enzima da síntese de GABA). Bloqueio de correntes de Ca^{2+} do tipo T. Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem. Reduz expressão de subunidades de receptores NDMA. Redução da taxa de rotatividade dos fosfolipídios cerebrais, por exemplo, através da inibição da conversão do AA em AA-CoA. Inibição da síntese *de novo* de inositóis. Inibição de glicogênio sintase quinase-3 (Gsk3) e acúmulo de β-catenina. Aumento ou redução dos níveis de pErk. Redução de atividade de NF-κB e COX-2. Inibidor da classe I de histonas deacetilases (HDAC I). Diminui a atividade da proteína quinase C (PKC).
Lamotrigina (LTG) 	Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem. Inibe liberação de glutamato através do bloqueio das correntes de Ca^{2+} tipo N e T. Diminui as respostas de adenilato ciclase mediada pelo receptor 5HT1A em neurônios corticais. Em altas concentrações, diminui a recaptação pré-sináptica de 5-HT, DA e NA. Ligante fraco de GABA A e GABA B. Inibição de glicogênio sintase quinase-3 (Gsk3) e acúmulo de β-catenina

Carbamazepina (CBZ) 	Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem e NMDA. Bloqueio correntes de Ca^{2+} tipo L. Reduz liberação de glutamato. Fraco antagonista de receptores de adenosina A1 e A2. Inibidor de histonas deacetilases (HDAC). Inibidor direto de adenilato ciclase causando, por exemplo, redução n concentração basal de AMPc. Estimula a ligação do fator de transcrição AP-1.

[a] Baseado nas revisões de (AMBRÓSIO *et al.*, 2002; CHEN, GUANG; MANJI, HUSSEINI K, 2006; GOULD, TODD D *et al.*, 2002; GURVICH; KLEIN, PETER S, 2002; KETTER *et al.*, 2003; LI, XIAOHUA; JOPE, 2010a; SCHMIDT; ELGER, 2004). As imagens contidas na tabela estão disponíveis em: <www.wikipedia.com> Acesso em 05/08/2012.

1.1.1 Lítio (Li)

O Li (do grego *λιθος*; *lithos*; pedra) é um elemento químico (Li) contendo na sua estrutura três prótons e três elétrons. Na tabela periódica dos elementos químicos, o Li pertence ao grupo (ou família) 1 (anteriormente chamado 1A), entre os metais alcalinos. É encontrado na natureza na forma de dois isótopos estáveis Li-6 e Li-7, sendo este último constituindo 92,5% do Li natural (BERKELEY NATIONAL LABORATORY, 2012). Foi descoberto pelo químico sueco Johan August Arfwedson em 1817 (SHORTER, 2009), a partir da análise dos minerais espodúmena e lepidolita provenientes de uma mina de petalita, $LiAl(Si_2O_5)_2$, minério descoberto em 1800 pelo naturalista e estadista brasileiro José Bonifácio de Andrada e Silva na ilha de Utö na Suécia (WEEKS, 2003) (Figura 1).



Figura 1. Petalita (LiAl (Si2O5)2) extraída no estado de Minas Gerais, Brasil. [imagem online] Disponível em: <www.wikipedia.com> [Acessado em 10/08/2012]

Embora já tivesse sido introduzido na prática médica pelo cirurgião escocês Alexander Ure desde a segunda metade do século XIX, acredita-se que o médico dinamarquês Carl Georg Lange tenha sido o primeiro profissional a usar sais de Li no manejo de sintomas afetivos (SHORTER, 2009). Porém, os mais convincentes relatos da eficácia de Li no tratamento de estados afetivos patológicos surgiram a partir de resultados publicados em 1949 pelo psiquiatra australiano John F. J. Cade.

Numa tentativa de isolar um composto metabólico que poderia estar associado com os sintomas esquizofrênicos, Cade injetou frações de urina provenientes de pacientes esquizofrénicos em roedores. Dado que o ácido úrico já era conhecido ser psicoativo em pacientes com gota (atualmente sabe-se que via estimulação de receptores de adenosina), foi necessária a aplicação de urato solúvel no grupo controle (CADE, 1947). Cade usou urato de Li, um sal já conhecido por ser uma boa fonte de urato solúvel, e observou um efeito tranquilizante nos roedores. Surpreendido, Cade caracterizou o efeito do Li isolado e, posteriormente, conseguiu controlar o estado maníaco em pacientes cronicamente hospitalizados com sais de Li (CADE, 1949). As investigações de Cade foram uma das primeiras aplicações farmacológicas bem sucedidas de um composto para tratar uma doença

psiquiátrica e, desde então, extensa bibliografia vem sendo produzida sobre o uso do Li no manejo do TAB (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; MALHI, 2009; MARMOL, 2008).

Apesar de seu efeito estabilizador do humor ter sido bem estabelecido na década de 1960, o Li só foi aprovado pela FDA dos EUA em 1970 para o tratamento de mania e, quatro anos mais tarde, para a profilaxia do TAB (SHORTER, 2009). A utilização tardia do Li no mercado americano é atribuída aos relatos de grave intoxicação e morte que tinham levado a sua retirada do mercado americano no início da década de 50 (SHORTER, 2009).

Por ser uma medicação utilizada na psiquiatria há mais de 50 anos, os efeitos terapêuticos e colaterais do tratamento com Li são bem conhecidos. O Li é bem absorvido, minimamente ligado às proteínas séricas e não metabolizado pelo fígado, sendo excretado pelos rins em aproximadamente 24 h (DUNNER; NEUMAIER, 2000). Compete com sódio para a reabsorção nos túbulos proximais e, por essa razão, uma dieta pobre em sódio, perda de sódio ou desidratação pode levar a um aumento na reabsorção de Li. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas dentro de 1-2 horas com preparação de liberação rápida ou dentro de 4-5 h com formulações de liberação prolongada (JERMAIN, 1991). A meia-vida média do Li é de aproximadamente 28 h no cérebro e 16 h no soro (PLENGE *et al.*, 1994). É essencial monitorar periodicamente os níveis de Li no sangue pois o Li tem uma janela terapêutica estreita, o que implica em risco de toxicidade (MARCUS *et al.*, 1999). Embora a titulação dos sais de Li varie gradualmente de acordo com a resposta do paciente e tolerabilidade, os níveis séricos de 0,4-0,8 mmol/L são os mais indicados para a terapia de manutenção (PANDYA, 2010). No entanto, concentrações mais altas como 0,8-1,2 mmol/L podem ser necessárias para a terapia aguda (PANDYA, 2010). O risco de efeito tóxico agudo de Li é aumentado quando os níveis séricos ultrapassam 2,3 mmol/L (OAKLEY, P. W. *et al.*, 2001), particularmente em indivíduos com comprometimento da função renal, alterações cardíacas ou disfunções tireoidianas.

Na forma de sais carbonatos (Li_2CO_3), citratos ($Li_3C_6H_5O_7$) e menos comumente sulfatos (Li_2SO_4) e orotato $LiC_5H_3N_2O_4 \cdot H_2O$, o Li é o medicamento de primeira escolha para o tratamento dos episódios maníacos e também para a subsequente terapêutica de manutenção no TAB (MALHI, 2009). Apesar de existirem outras opções terapêuticas eficazes, ainda não foram produzidas evidências da superioridade destes fármacos em relação ao Li. O Li geralmente apresenta um efeito benéfico em aproximadamente 60% dos pacientes, com poucos registros de desenvolvimento de tolerância ou perda de sensibilidade mesmo após vários anos de tratamento (MARMOL, 2008).

1.1.2 Valproato (VPA)

O ácido valpróico ($(CH_3CH_2CH_2)_2CHCOOH$; ácido 2-propilvalérico, ácido 2-propilpentanóico ou ácido n-dipropilacético) é um ácido graxo ou carboxílico de cadeia curta sintetizado em 1882 por B.S. Burton (BURTON, 1882), como um análogo do ácido valérico, uma substância presente naturalmente na *Valeriana officinalis* (Figura 2). Tradicionalmente, esta erva tem sido usada como planta medicinal pelo menos desde o tempo dos antigos gregos e romanos, devido aos supostos efeitos ansiolíticos e tranquilizantes (HADLEY, S.; PETRY, 2003). Apesar de o VPA ter sido utilizado como um solvente orgânicos metabolicamente inerte por oito décadas, a primeira evidência de suas propriedades clínicas surgiu, por acaso, apenas em 1962. Pierre Eymard e colegas da Universidade de Lyon, na França, investigaram compostos com baixa solubilidade em água e potencialmente anticonvulsivantes usando o VPA como solvente. Os autores relataram uma forte atividade anticonvulsante de todas as soluções preparadas com VPA, após administração de pentilenotetrazol em ratos. Esta

observação levou os autores a estudar o VPA como um agente potencialmente útil para tratar a epilepsia (MEUNIER *et al.*, 1963). O VPA foi aprovado como um medicamento antiepiléptico em 1967 na França, tornando-se o fármaco antiepilético mais prescrito na época (KOSTROUCHOVÁ; KOSTROUCH, 2007).

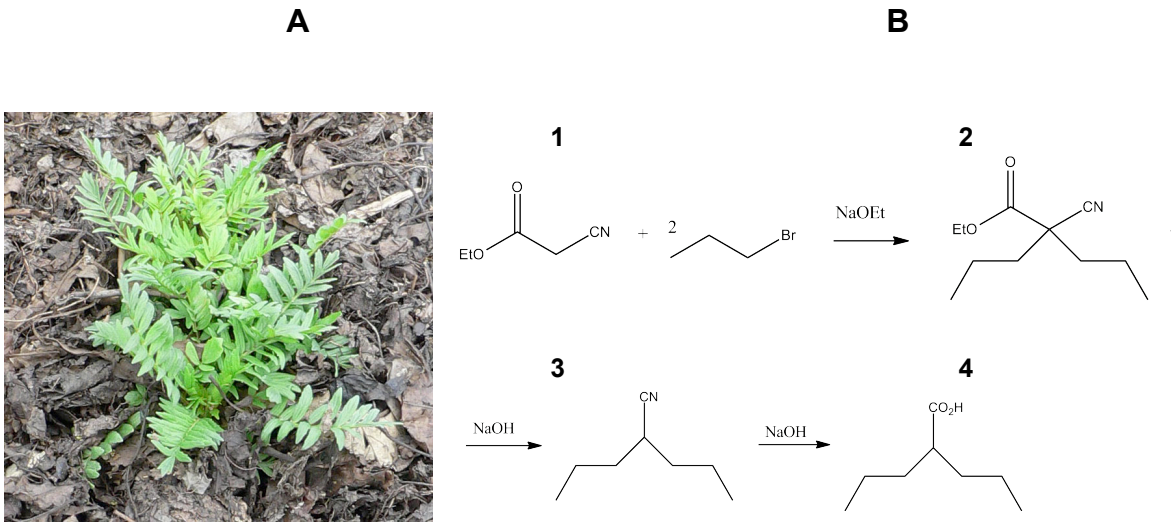


Figura 2. ***Valeriana officinalis*** **e reação de síntese do valproato.** (A) *Valeriana officinalis* [imagem online]. Disponível em: <www.wikipedia.com> [Acessado em 06/08/2012]. (B) Síntese do ácido valpróico. O ácido valpróico é sintetizado por alquilação do éster cianoacético com 2 mol de brometo de propila (1), para originar o éster dipropilcianoacético (2). A hidrólise e descarboxilação do grupo carboetoxila rigina dipropilacetonitrila (3), o qual é hidrolisado em ácido valpróico (4). Imagem adaptada de (KOSTROUCHOVÁ; KOSTROUCH, 2007)

Embora inicialmente o VPA tenha mostrado ser um fármaco relativamente seguro, os efeitos adversos foram logo reconhecidos. Estão incluídos dispepsia, ganho de peso, disforia, fadiga, tontura, sonolência, perda de cabelo, dor de cabeça, náusea, sedação e tremor. O fármaco também pode prejudicar a função hepática, causar trombocitopenia e alongar o tempo de coagulação sanguínea. Quando usado no início da gravidez, o VPA causou um risco três vezes maior de anomalias congênitas, como defeitos do tubo neural, principalmente a

espinha bífida (LAMMER *et al.*, 1987). Com base nisso, o ácido valpróico é relativamente contra-indicado na gravidez e em pacientes com danos hepáticos ou alterações hematológicas pré-existentes.

Atualmente o VPA (Depakote® ou Depakene®) é vendido como fórmulas contendo VPA semisódico ou ácido valpróico. VPA semisódico é uma combinação 1:1 molar de VPA de sódio e ácido valpróico. As diferenças terapêuticas entre o VPA de sódio e VPA semisódico, se existirem, ainda não foram descritas. Em ambas composições, o VPA é liberado após a administração e, posteriormente absorvido. O VPA é rapidamente metabolizado no fígado e os metabólitos resultantes são citados serem farmacologicamente ativos (TENNISON *et al.*, 1988). A elevada biodisponibilidade do VPA é atribuída à sua alta permeabilidade a membrana celular. Embora os efeitos antimaníacos do VPA possam ser observados dentro de três dias, o benefício completo de tratamento não parece ser aparente antes de três semanas (VASUDEV *et al.*, 2000). Diferente do Li, não é comum a mensuração dos níveis plasmáticos do medicamento na rotina clínica.

O VPA é empregado para o tratamento de mania no TAB (KOSTROUCHOVÁ; KOSTROUCH, 2007). O medicamento é geralmente considerado um agente de primeira escolha para a maioria das formas idiopáticas e sintomáticas de epilepsia generalizada. Como muito dessas síndromes estão associadas a vários tipos de convulsões, incluindo crises tônico-clônicas, de ausência e mioclônicas, a prescrição de fármacos antiepilépticos de amplo espectro, como o VPA, apresenta vantagens inegáveis. Recentemente, foi demonstrado que o VPA possui características semelhantes às de outros agentes anticancerígenos, atuando sobre a diferenciação, crescimento e apoptose celular (XIMENES, 2012). O medicamento também tem sido utilizado na profilaxia da enxaqueca (SØRENSEN, 1988).

1.1.3 Lamotrigina (LTG)

Como a maioria dos outros fármacos antiepilépticos, a descoberta da lamotrigina (LTG; Lamictal®), um derivado da feniltriazina, foi acidental. A LTG foi originalmente sintetizada por cientistas do *Wellcome Laboratories* em resposta a uma necessidade não atendida de novos fármacos antiepilépticos com superior perfil de segurança e maior índice terapêutico (WEISLER *et al.*, 2008).

A descoberta da LTG foi baseada na sugestão de que o efeito antiepiléptico da fenitoína e fenobarbital fosse devido às perturbações do metabolismo do ácido fólico causadas por esses compostos (REYNOLDS *et al.*, 1966). Esta evidência conduziu a uma investigação de diversos antagonistas de folato em modelos animais, incluindo feniltriazinas. Entre a série de compostos desenvolvidos, os cientistas observaram que a LTG teve uma atividade anticonvulsiva considerável em modelos animais, embora, em última análise, mostrou-se um fraco inibidor da diidrofolato redutase. Atualmente sabe-se que a ação anticonvulsiva mais aceita da LTG é através da diminuição da liberação de glutamato pré-sináptico via bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem (KETTER *et al.*, 2003).

No momento em que a LTG foi sintetizada pela primeira vez no início dos anos 80, já tinham se passado aproximadamente 30 anos que um novo fármaco tinha sido introduzido com sucesso para o tratamento da epilepsia. A LTG entrou em estudos humanos logo em seguida, e uma série de ensaios clínicos culminou na sua aprovação para uso no tratamento da epilepsia em 1990 na Irlanda, seguida por aprovações em todo o mundo (WEISLER *et al.*, 2008). Os ensaios clínicos acabaram fornecendo um indício de que a LTG também poderia ter utilidade clínica no tratamento das alterações do humor e da comunicabilidade dos pacientes (SMITH, D. *et al.*, 1993). Esta foi uma reminiscência de observações anteriores com outros anticonvulsivantes, especialmente VPA e CBZ, as quais tinham, originalmente, levado à

sugestão de que fármacos antiepilépticos poderiam ser úteis no tratamento do TAB (LAMBERT *et al.*, 1966; OKUMA *et al.*, 1973).

Geralmente o tratamento é bem tolerado, no entanto, este pode causar erupções cutâneas, incluindo a síndrome de Stevens-Johnson (necrólise epidérmica tóxica) (CALABRESE *et al.*, 2003). A LTG pode ser rapidamente absorvida com concentração plasmática máxima atingida após 1-3 h. O medicamento tem elevada biodisponibilidade após administração oral, farmacocinética linear, os metabólitos são inativos e tem uma meia-vida de aproximadamente um dia (GOLDSMITH *et al.*, 2003). Além de ter um amplo espectro de atividade anticonvulsivante, a LTG é eficaz no tratamento da depressão bipolar e formas resistentes dos transtornos de humor. Ao que parece, o fármaco não é eficaz no controle da fase aguda da mania (GOLDSMITH *et al.*, 2003). Dessa forma, alguns autores sugerem que a LTG pode "estabilizar o espectro depressivo do humor" na medida em que impacta maximamente nos sintomas depressivos do TAB. Em contraste, os estabilizadores de humor mais antigos (Li, CBZ e VPA) parecem "estabilizar o espectro maníaco do humor" na medida em que impacta maximamente nos sintomas maníacos ou hipomaníacos do TAB (KETTER; CALABRESE, 2002).

1.1.4 Carbamazepina (CBZ)

A CBZ (Tegretol®) foi descoberta pelo químico Walter Schindler na JR Geigy AG (agora parte da Novartis) na Basiléia, Suíça (ARZIMANOGLOU; BEN-MENACHEM, 2010). Quando sintetizou o fármaco 1960, Schindler ainda não sabia da propriedade antiepiléptica da CBZ. A CBZ foi comercializada pela primeira vez em 1962, como um

medicamento para tratamento da neuralgia do trigêmeo. Apenas em 1965, a CBZ passou a ser usada como um anticonvulsivante e antiepiléptico no Reino Unido (VASUDEV *et al.*, 2000). Em 1971, em virtude do Li ainda não estar disponível no Japão, a CBZ foi empregada pela primeira vez pelos médicos japoneses Takezaki e Hanaoka para controle da mania em pacientes refratários a antipsicóticos em um pequeno ensaio aberto (TAKEZAKI; HANAOKA, 1971). Como eram também epileptologistas, eles já tinham alguma familiaridade com os efeitos "anti-agressivos" deste medicamento. Ao longo dos anos 70, os benefícios clínicos da CBZ passaram a ser investigados em pacientes bipolares, sendo que o primeiro relatório internacional mostrou que este medicamento possuía eficácia no controle de estados maníacos, o que atraiu a atenção da comunidade científica (BALLENGER; POST, R M, 1980). Após a sua utilização generalizada, uma forma de ação prolongada de CBZ foi aprovada em 2005 pelo FDA para o tratamento de mania aguda e mista.

A posologia deve ser baseada na resposta terapêutica e a biodisponibilidade varia de acordo com as diferentes preparações. Para profilaxia em pacientes bipolares não responsivos ao Li, o regime inicial deve ser de 400 mg/dia em doses divididas. As doses podem ser aumentadas até que os sintomas sejam controlados (dose máxima diária é de 1,6 g) (PANDYA, 2010). A CBZ é extensivamente metabolizada e a atividade de seus metabólitos também pode contribuir significativamente para a ação terapêutica da molécula. Aproximadamente 75% da CBZ está ligada às proteínas plasmáticas e sua meia-vida é de aproximadamente 24 h, a qual é reduzida para cerca de 12 horas com a administração crônica (VUCIĆEVIĆ *et al.*, 2007). Classicamente, a ação farmacológica da CBZ é similar a da LTG pelo bloqueio dos canais de sódios dependentes de voltagem e, desta forma, diminui a amplitude e frequência dos potenciais de ação de neurônios devido a redução no influxo de sódio (HIRSCHFELD; KASPER, 2004). Também existe evidência de que a CBZ é capaz de reduzir a liberação de glutamato e, indiretamente, facilitar a atividade GABAérgica

(HIRSCHFELD; KASPER, 2004). A CBZ é usada principalmente como um anticonvulsivante no tratamento de crises tônico-clônicas generalizadas e crises parciais complexas. Continua sendo utilizada no tratamento da neuralgia trigeminal (HIRSCHFELD; KASPER, 2004). No transtorno afetivo bipolar, a CBZ não é utilizada como opção de primeira linha e, em muitos casos, é empregada para a profilaxia em pacientes bipolares que não respondem ao Li (HIRSCHFELD; KASPER, 2004). A CBZ, quando combinada a antidepressivos ou estabilizadores de humor, pode ser útil para aumentar as chances de sucesso no tratamento da depressão unipolar refratária, apesar do seu efeito no metabolismo hepático poder complicar o tratamento (TAYLOR *et al.*, 2009).

1.1.5 Uso clínico dos FEHs no transtorno afetivo bipolar (TAB)

O Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) está entre as condições psiquiátricas mais graves, complexas e comuns, afetando seriamente a qualidade de vida tanto dos doentes quanto das suas famílias (BELMAKER, 2004). Como categorizado pelo DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed., elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria), e pelo CID-10 (Classificação Internacional de Doenças, proposto pela Organização Mundial de Saúde), o TAB consiste numa alteração cíclica do estado de ânimo, caracterizada pela variação extrema do humor entre uma fase maníaca ou hipomaníaca (hiperatividade física e mental), e fases depressivas (BELMAKER, 2004). Na ausência dos sintomas de mania, é difícil a diferenciação entre doença bipolar ou depressão unipolar (RAPOPORT *et al.*, 2009). Associa-se ao quadro clínico alta incidência de tentativa de suicídio, comportamentos de alto risco, como promiscuidade sexual e abuso de substâncias, dificuldades nas relações interpessoais e múltiplas hospitalizações (FOUNTOULAKIS *et al.*, 2009; POMPILI *et al.*, 2008). Várias comorbidades clínicas, como transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, hipo e hipertireoidismo, hipertensão e diabetes também se associam ao TAB (KAWA *et al.*, 2005; NAKAGAWA *et al.*, 2008).

O TAB é classificado em transtorno bipolar tipo I (caracterizado por um ou mais episódios maníacos ou episódios mistos), tipo II (ocorrem um ou mais episódios depressivos maiores acompanhados por, pelo menos, um episódio hipomaníaco), ciclotímico (caracterizado por perturbação crônica e flutuante do humor envolvendo numerosos períodos de sintomas ligeiros de hipomania e depressão, mas que não preenchem os critérios de depressão maior), e aquele sem outra especificação (SOE) apresentando no entanto desfecho similar (BELMAKER, 2004). TAB tipo I atinge aproximadamente 0,8% da população adulta, sendo homens e mulheres igualmente afetados. O TAB tipo II afeta cerca de 0,5% da

população, sendo mais comum em mulheres. Com distribuição cosmopolita, a prevalência do TAB não varia significativamente entre as etnias (KAWA *et al.*, 2005).

Os medicamentos aprovados para uso em monoterapia não produzem resposta em longo prazo na maioria dos pacientes bipolares. Por exemplo, numa análise agrupada de 2.300 pacientes com mania aguda que receberam um placebo ou qualquer um dos oito fármacos reconhecidos como “eficazes”, em monoterapia, apenas 45% a 60% dos pacientes tratados mostraram melhora em comparação com 30% de resposta positiva ao placebo (BOWDEN *et al.*, 2005). Além disso, a aderência do paciente ao tratamento dificilmente é alcançada (GOODWIN, G. M., 2003). Por exemplo, 50% dos pacientes bipolares interrompem o tratamento pelo menos uma vez, enquanto 30% deles o fazem ao menos duas vezes (LINGAM; SCOTT, 2002).

De fato, o tratamento farmacológico do TAB é um processo bastante complexo, na medida em que deve ser considerado, separadamente, para os episódios de mania e para os episódios de depressão. Neste contexto, diferentes fármacos e diferentes modalidades de tratamento podem ser considerados, dependendo da fase específica do ciclo do transtorno. Em vista disso, os pacientes portadores do TAB frequentemente são tratados com mais de um medicamento, em várias doses e durante diferentes períodos. São empregadas combinações de estabilizadores de humor, antipsicóticos, antidepressivos e benzodiazepínicos (SEVERUS, E. *et al.*, 2012). Esta abordagem conhecida como "polifarmácia racional" (GERNER, 1991), muitas vezes se reduz a adição de um fármaco para um sintoma específico que aparece. De acordo com Altamura e colaboradores, o tratamento pode ser organizado em três fases distintas como indicado na tabela 2 (ALTAMURA *et al.*, 2011).

Tabela 2. Fases do tratamento do TAB e opções terapêuticas de 1° linha.

Fase	Estratégia	Medicamentos 1° linha
Mania aguda	Visa a contenção sintomática e, muitas vezes, inclui a salvaguarda da segurança do paciente. Estão incluídos o controle rápido da agitação, agressividade, impulsividade, e o retorno a um funcionamento psicossocial normal. A hospitalização torna-se frequentemente necessária até à melhoria sintomatológica.	VPA, Li e antipsicóticos atípicos (olanzapina, risperidona, quetiapina, aripiprazol e ziprasidona) como monoterapia ou terapias combinadas com Li/VPA e risperidona, quetiapina ou olanzapina
Depressão bipolar	Visa a remissão completa, melhor funcionamento psicossocial e redução do risco de suicídio.	LTG, Li e quetiapina em monoterapia ou terapia combinada com olanzapina + ISRS/Li ou Li + VPA ou VPA + ISRS/bupropiona plus.
Tratamento de longo prazo	Visa manter a remissão e tem a duração mínima de um ano após a resolução dos sintomas. A manutenção do tratamento, a longo prazo ou mesmo vitalícia, é recomendada nos casos em que já tenham ocorrido três ou mais episódios maníacos.	LTG, Li e quetiapina em monoterapia ou terapia combinada com olanzapina + ISRS/Li ou Li + VPA ou VPA + ISRS/bupropiona plus.

VPA: valproato; Li: lítio; ISRS: inibidor seletivo da recaptação de serotonina

1.2 Mecanismos fisiopatológicos do TAB são alvos dos FEHs

Apesar de nos últimos 50 anos, estudos utilizando modelos neuroquímicos, neuroanatômicos e genéticos terem apresentado novos referenciais sobre a etiopatogenia do TAB, deve-se considerar que ainda existem poucos dados representativos que demonstrem evidências consistentes da associação entre os achados neurobiológicos do TAB e as alterações comportamentais e neurovegetativas observadas na doença (CRADDOCK *et al.*, 2001).

Ainda que o TAB seja de difícil avaliação quanto à relação de "causa e efeito" entre o surgimento dos sintomas e os achados neurobiológicos, a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares descritos é fundamental para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras aos pacientes. Possivelmente, esta limitação contribui para que os mecanismos farmacológicos e terapêutico dos FEHs ainda estejam distantes de serem elucidados. No entanto, parece que as investigações em andamento são promissoras. Recentemente, diversos grupos de pesquisa têm investigado e, isoladamente, têm encontrado alterações em vias de comunicação neuronal que mimetizaram padrões neurobiológicos característicos do paciente bipolar (ACKENHEIL, 2001; EINAT; MANJI, HUSSEINI K, 2006; MANJI, HUSSEINI K; QUIROZ, JORGE A; *et al.*, 2003; ZANDI *et al.*, 2008).

Apesar de incompleta, a teoria atualmente empregada postula que alterações específicas em vias celulares de transdução de sinais culminam diretamente na patogênese do TAB (Figura 3). Mais importante, estudos têm demonstrado que muitas das alterações patogênicas do TAB são moduladas farmacologicamente pelos FEHs (LENG, YAN *et al.*, 2008; MARMOL, 2008; ROSENBERG, 2007). Estes resultados suportam, como incialmente proposto, que a ação dos FEHs é direcionada para alvos dentro dos neurônios, abordagem que será discutida nos tópicos seguintes.

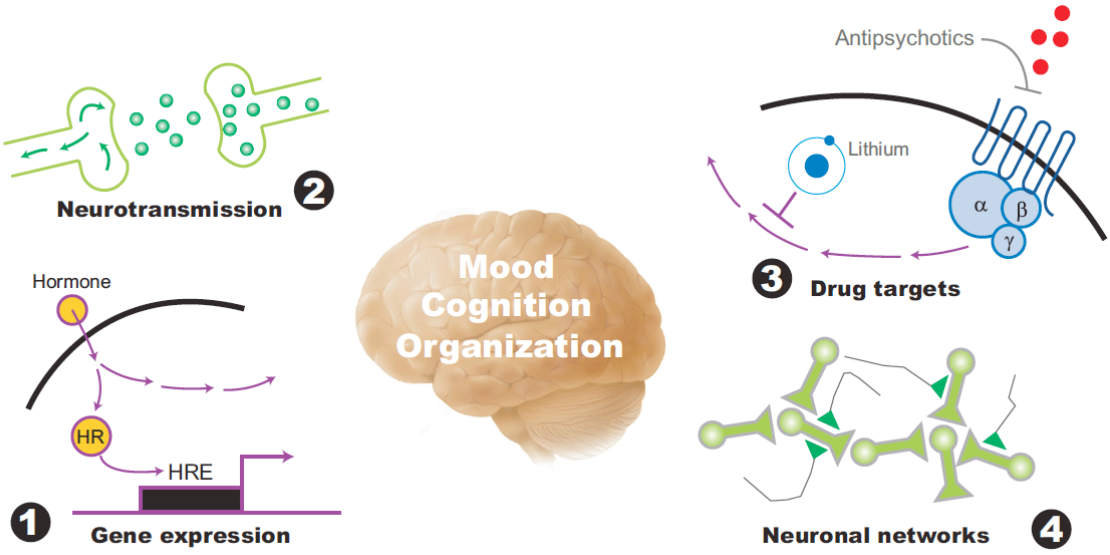


Figura 3. Suposto papel das vias de sinalização na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos. Disfunções em vias celulares de transdução de sinais podem estar envolvidas na patogênese e fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos. Esta teoria baseia-se em uma série de observações, incluindo a constatação de que muitas vias de sinalização são moduladas, direta ou indiretamente por (1) neuro-hormônios (por meio de receptores hormonais (HR) e elementos de resposta hormonal (hRes)), os quais afetam a expressão genética, (2) neurotransmissores e (3) psicofármacos. Estas modificações influenciam o equilíbrio funcional da comunicação neuronal e consequentemente na função cerebral. Desta forma, (4) funções cerebrais superiores, humor e comportamentos complexos estão sob constante modulação de vias de transdução de sinais. Figura adaptado de (MANJI, HUSSEINI K; GOTTESMAN; *et al.*, 2003).

1.2.1 Vias intracelulares de transdução de sinais e doenças psiquiátricas

As vias celulares de transdução de sinal ocupam posição significativa no sistema nervoso central pois são capazes de afetar o equilíbrio funcional entre diversos sistemas de neurotransmissão (DEWIRE *et al.*, 2007). O alto grau de complexidade gerado por estas redes de sinalização permite que as células neuronais adquiram a flexibilidade fenotípica necessária para gerar a vasta gama de respostas observadas no sistema nervoso. Como essas vias estão

implicadas na regulação de diversas funções cerebrais, elas são, portanto, importantes candidatas para as anormalidades que, provavelmente, contribuem para a patofisiologia do TAB.

Simplificadamente, uma via intracelular de transdução de sinais pode ser definida como uma cascata de eventos moleculares e sequenciais com a finalidade de coordenar a função celular de acordo com o sinal emitido por estímulos externos. Exceções a parte, em neurônios, a recepção do sinal externo (através de neurotransmissores, por exemplo) é realizada por receptores presentes na membrana celular. Os sinais transmitidos por estes receptores são integrados por multicomponentes em vários níveis, formando assim complexas redes que permitem as células receber, processar, e responder à informação. Essas redes facilitam a integração de sinais através de múltiplas escalas de tempo e distintas forças de entrada, saída e duração, regulando desta forma os intrincados laços de *feedforward* e *feedback* (BEAULIEU *et al.*, 2007). Por exemplo, a ação de um neurotransmissor sobre seu receptor específico pode aumentar ou diminuir a função de diversas proteínas e genes, pelos quais o neurônio pode, substancialmente, mudar sua fisiologia para proliferar, morrer, diferenciar-se, produzir hormônios ou mais neurotransmissores, e etc.

As propriedades das redes de sinalização sugerem papéis cruciais na "memória" celular. Assim, as células com diferentes "histórias" e, portanto, que expressam um repertório diferente de moléculas de sinalização interagindo em diferentes níveis, podem responder de forma bastante diferente para o mesmo sinal ao longo do tempo. Comumente, o tipo de receptor determina a estrutura e tipo de sinalização envolvido (Figura 4).

Vários mecanismos de sinalização intracelular têm sido implicados na fisiopatologia do TAB e nos mecanismos de ação dos FEHs. Enquanto muitos dados estão emergindo em relação ao Li e VPA, os efeitos da LTG e CBZ em vias de transdução de sinal ainda

necessitam de investigação. A seguir, serão descritas as vias de transdução que serão exploradas pelo estudo apresentado.

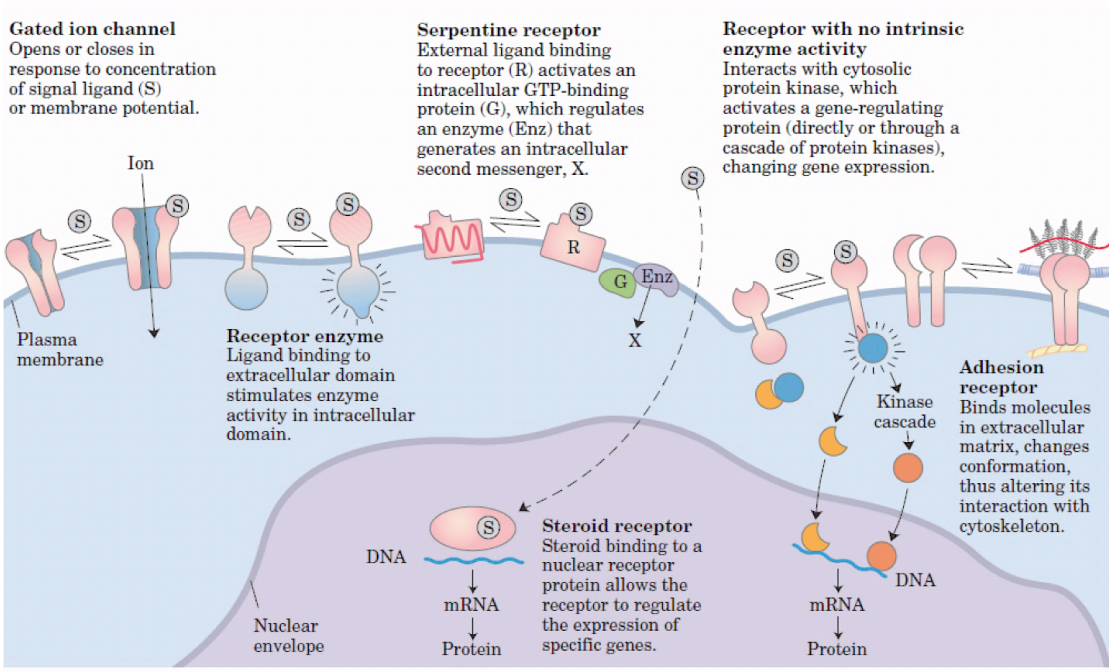


Figura 4. Receptores e acoplamento de vias de sinalização. Figura adaptada de (NELSON; COX, 2008).

1.2.2 Histonas deacetilases

Modificações epigenéticas são rearranjos reversíveis de cromatina que controlam a expressão gênica sem modificar a seqüência de DNA (GIBNEY; NOLAN, 2010). A metilação do DNA e modificações de histonas são os mecanismos epigenéticos mais estudados. Histonas são pequenas proteínas organizadas em complexos com DNA, que em conjunto formam o nucleossoma.

Os aminoácidos lisina presentes nas “caudas” N-terminais das histona são as estruturas que interagem com as cargas negativas da molécula de DNA.

As histonas estão envolvidas na regulação dinâmica da estrutura da cromatina e transcrição de genes associados. As histonas podem ser acetiladas (OCH_2CH_3) ou deacetiladas em resíduos de lisina, processos que são regulados pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs; *histone acetyltransferases*) e histonas deacetilases (HDACs; *histone deacetyltransferases*), respectivamente (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2011). A ligação dos grupos acetil (carga negativa), catalisada pelas HATs, atua neutralizando a carga positiva sobre as histonas e, desta forma, diminuindo a interação das N-terminações das histonas com os grupos fosfato negativamente carregados do DNA. Como consequência, a cromatina condensada é transformada em uma estrutura mais relaxada a qual é associada com maiores níveis de transcrição de genes, atribuído à maior acoplagem de fatores de transcrição em sítios específicos do DNA (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2011). Este relaxamento pode ser revertido pela atividade de HDACs, a qual induz a compactação da cromatina e silenciamento da expressão gênica (Figura 5).

O delicado equilíbrio entre as ações de HAT e HDAC é fundamental para a manutenção da homeostase celular. A sua desregulação pode levar a diversas disfunções celulares, incluindo o crescimento celular descontrolado, diferenciação anormal, e/ou apoptose. Por exemplo, as histonas deacetiladas estão abundantes em condições patológicas, particularmente aquelas associadas a hipermetilação do DNA, condensação da cromatina e silenciamento gênico (GRAYSON *et al.*, 2010). Por outro lado, a acetilação excessiva do DNA também pode levar à superprodução de certas proteínas pró-apoptóticas, por exemplo, induzindo efeitos deletérios.

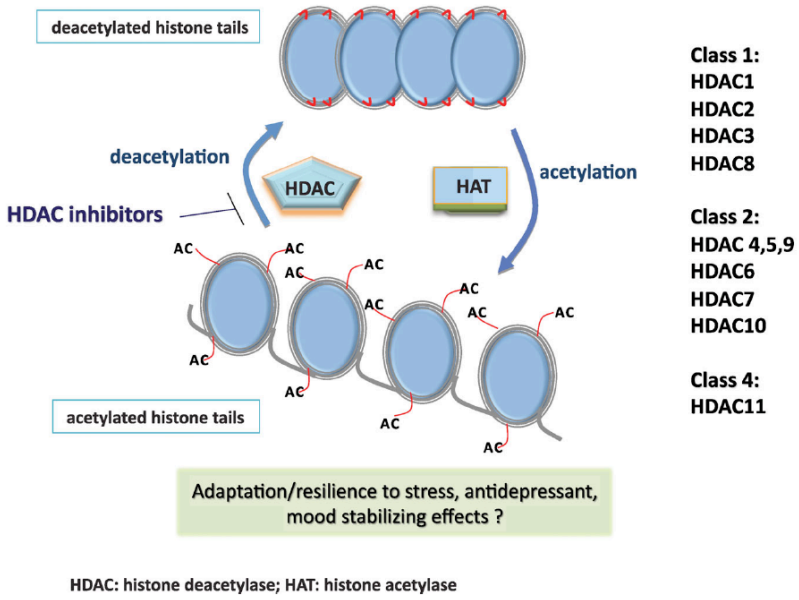


Figura 5. Acetilação de histonas. Histonas deacetilases (HDACs) removem grupos acetil a partir de resíduos de lisina em N-terminais de histonas, causando a compactação da cromatina e diminuição da transcrição genética. Na direção oposta, o aumento da acetilação de histonas, diretamente pelas HATs ou indiretamente através de inibidores de HDAC (IHDAC), causa uma mudança para uma conformação mais relaxada e aumento da expressão genética. Figura adaptada de (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2011).

Embora, tradicionalmente, os mecanismos epigenéticos não têm sido considerados na neuropatologia dos transtornos do humor, já existe um crescente reconhecimento de que diferentes perfis epigenéticos em eventos iniciais do neurodesenvolvimento podem estar associados com essas doenças (MEHLER, 2008). De fato, a epigenética é considerada a modificação biológica mais consistente para o estudo do impacto de diversos aspectos ambientais na fisiopatologia dos principais transtornos psiquiátricos (TSANKOVA *et al.*, 2007). Dentro da temática "psiquiatria translacional", essas alterações envolvem a expressão diferencial de genes reguladores de aspectos críticos de circuitos cerebrais, os quais estão intrinsecamente relacionados com as diferenças fenotípicas e funcionais que afetam a cognição e comportamento. Por exemplo, através de exposição de cobaias a um modelo de

estressor social, um estudo encontrou uma diminuição transitória, seguido por um aumento persistente, dos níveis da forma acetilada de histona H3 no núcleo accumbens, uma importante região límbica (COVINGTON *et al.*, 2009). Os autores postularam que o aumento persistente na acetilação H3 foi associado com diminuição dos níveis de histona deacetilase 2 (HDAC2). Interessantemente, através de um estudo *post-mortem*, o trabalho ainda observou alterações semelhantes no núcleo accumbens de pacientes com histórico de depressão (COVINGTON *et al.*, 2009) quando comparado com pacientes sem histórico de doenças psiquiátricas (Figura 6).

Outros estudos pré-clínicos de modelos de interação gene-ambiente sugerem que o comportamento materno produz alterações estáveis de metilação do DNA e estrutura da cromatina, oferecendo uma mecanismo que explica, por exemplo, o efeito a longo prazo do cuidado materno sobre a diminuição dos níveis de RNAm de receptor glicocorticóide da prole (MCGOWAN *et al.*, 2009; WEAVER *et al.*, 2004).

Dentro deste paradigma, alguns estudos tem sugerido que "fatores estressores" no início da vida podem aumentar a vulnerabilidade ao primeiro episódio clínico no TAB (TSANKOVA *et al.*, 2007). Numa avaliação de 11 HDACs em leucócitos periféricos de indivíduos com depressão e TAB, foi encontrado um aumento da expressão de RNAm de HDAC2 e HDAC5 durante episódios depressivos em comparação com pacientes em remissão e controles saudáveis, sugerindo que a alteração é dependente do curso clínico da doença (HOBARA *et al.*, 2010). HDACs também interagem diretamente e deacetilam proteínas não-histônicas como o elemento de ligação em resposta ao AMPc (CREB) (LU, Q. *et al.*, 2003), o qual já foi diretamente e indiretamente implicado na fisiopatologia do TAB (GRIMES, C. A; JOPE, 2001).

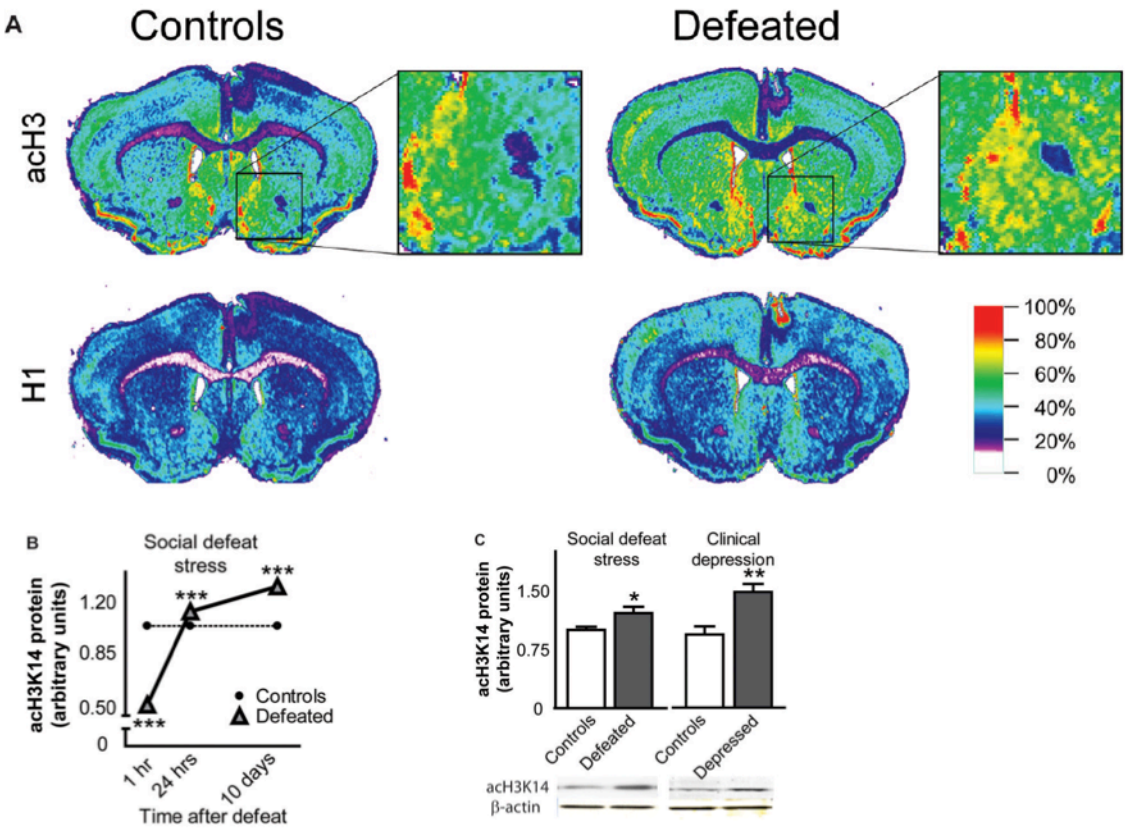


Figura 6. Níveis elevados de histona H3 acetilada (acH3K14) no núcleo accumbens (NAc) em *chronic social defeat stress* em camundongos e pacientes com depressão. (a) As fatias cerebrais foram coletados de camundongos C57BL/6J em 1 hora, 24 horas, ou 10 dias após exposição crônica (10 dias) às condições do teste *social defeat stress* ou controle. Em seguida, acH3K14 e os níveis totais de histona H1 (como um controle) foram quantificadas por análise imunohistoquímica no NAc (indicado pelo quadrado). Aqui é mostrada uma seção coletadas 10 dias após o *social defeat stress* ou condição de controle. (b) H3 acetilada é dinamicamente regulada. (c) Aumento de acH3K14 também é evidente por western blot (à esquerda). Do mesmo modo, a depressão clínica é acompanhada por um aumento nos níveis de acH3K14 no NAc em comparação com controles pareados (direita). Figura adaptada de (COVINGTON *et al.*, 2009).

Como os estudos recentes sugerem que o desequilíbrio funcional da remodelação da cromatina influencia na comunicação neuronal e susceptibilidade dos transtornos de humor, é possível que estas doenças possam ser tratadas através do recuperação das conexões sinápticas. De fato, acredita-se que a administração dos inibidores de HDAC recompensa os déficits neuroplásticos associados com o TAB. No entanto, é importante notar que não há nenhuma isoforma específica de HDAC capaz de explicar os potenciais efeitos terapêuticos de inibidores HDAC em neuropsiquiatria.

Especula-se que a inibição direta ou indireta de HDACs afeta cerca 2-5% de todos os genes (LINT, VAN *et al.*, 1996). Nos seres humanos, as HDACs podem ser dividida em quatro (I, II, III e IV) classes principais (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2011). A classe I inclui as HDAC 1, 2, 3 e 8. A classe II, HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10. Esta classe, por sua vez, ainda pode ser dividida em duas subclasses, IIa (HDAC 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDAC 6 e 10) de acordo com as suas semelhanças estruturais. As classes I e II são as HDACs mais extensivamente investigadas no sistema nervoso central (SNC). Muitos compostos inibidores de HDAC (IHDACs) aumentam os níveis de acetilação da histonas no cérebro através da inibição seletiva da classe I ou II de HDACs. Além disso, estudos têm observado eficácia antidepressiva e ansiolítica destas substâncias, o que têm estimulado cada vez a síntese de novos inibidores com diferentes especificidades (Figura 7). Por exemplo, o IHDAC MS-275 foi eficaz em reverter os efeitos negativos do *social defeat stress* em padrões semelhantes ao da fluoxetina, um antidepressivo bem conhecido (COVINGTON *et al.*, 2009).

O VPA foi identificado recentemente como um fármaco IHDAC (IC_{50} = 0,4 mM) (PHIEL *et al.*, 2001) e tem influenciado a possibilidade terapêutica da inibição de HDACs nos transtornos do humor. Ainda não está claro se este mecanismo está envolvido nas propriedades estabilizadora do humor do medicamento. Interessantemente, a CBZ também já foi demonstrada ser um IHDAC (IC_{50} = 2 μM) em concentrações inferiores às terapêuticas

(BEUTLER *et al.*, 2005). VPA inibe a atividade de HDAC através da ligação ao centro catalítico dessas proteínas (GÖTTLICHER *et al.*, 2001). Em níveis terapêuticos, o VPA induz a hiperacetilação de histonas e atenua a repressão transcricional mediada por HDACs *in vitro* e *in vivo* (GÖTTLICHER *et al.*, 2001). Em geral, é sugerido que a ação epigenética do VPA pode desempenhar um papel relevante em seus efeitos neuroprotetores, neurotróficos e em muitos dos seus efeitos sobre vias de sinalização celular (ROSENBERG, 2007). Estes resultados sugerem um potencial mecanismo pelo qual a ação inibitória de HDACs específicas pode beneficiar o tratamento psiquiátrico. Por exemplo, o tratamento com inibidores de HDAC melhoraram o fenótipo de ALS (esclerose amiotrófica lateral) de modelos animais (PETRI *et al.*, 2006). É importante notar que estudos pré-clínicos mostram que a capacidade inibitória do VPA sobre HDAC também pode mediar vários efeitos secundários graves, tais como teratogenicidade e síndrome de ovário policístico (GURVICH *et al.*, 2005).

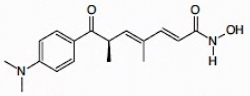
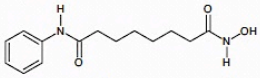
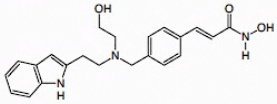
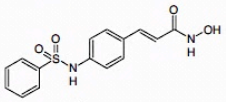
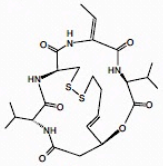
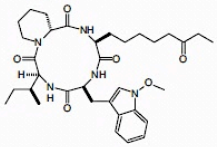
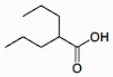
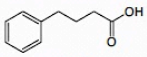
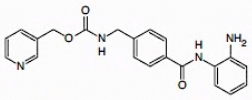
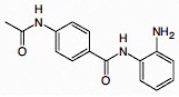
Class & Compound		HDAC Target	In Vitro Potency
Hydroxamate TSA		Classes I and II	Nanomolar
SAHA (vorinostat)		Classes I and II	Micromolar
LAQ824		Classes I and II	Nanomolar
PXD-101 (belinostat)		Classes I and II	Micromolar
Cyclic peptides Depsipeptide (FK-228; romidepsin)		Class I	Nanomolar
Apicidine		Classes I and II	Nanomolar to micromolar
Short-chain fatty acids Valproic acid		Class I	Millimolar
Phenyl butyrate		Classes I and II	Millimolar
Butyrate		Classes I and II	Millimolar
Benzamides MS-275		HDAC1, HDAC3	Micromolar
CI-994		HDAC1, HDAC3	Micromolar

Figura 7. Inibidores de histona deacetilases mais comuns. Adaptado de (GRAYSON *et al.*, 2010).

1.2.3 Gsk3

Identificada há mais de 30 anos (COHEN, PHILIP, 1979; EMBI *et al.*, 1980), a glicogênio sintase quinase-3 (Gsk3) foi ignorada como um alvo terapêutico até meados da década de 1990, quando o seu papel na transdução intracelular do sinal da insulina foi esclarecido. A Gsk3 foi descoberta e nomeada com base na sua capacidade para fosforilar e, desta forma, inativar a enzima glicogênio sintase, uma ação que conduz a uma diminuição na síntese de glicogênio (Figura 8). No final dos anos 90, vários inibidores potentes da Gsk3 foram identificados e ensaios *in vitro* indicaram que tais compostos poderiam ter um potencial terapêutico para o tratamento de diabetes (COGHLAN *et al.*, 2000). De fato, existem diversas razões pelas quais os inibidores da Gsk3 podem ser úteis no tratamento de diabetes. Primeiro, a insulina promove a desfosforilação e ativação de glicogênio sintase por supressão da atividade de Gsk3 (COHEN, PHILIP, 1999). Em segundo lugar, tem sido relatada que a expressão muscular da Gsk3 é elevada em diabéticos (NIKOULINA *et al.*, 2000). Embora tenha sido primeiramente identificada inibir a síntese de glicogênio (COHEN, PHILIP, 1979; EMBI *et al.*, 1980), desde então, a Gsk3 tem sido reportada fosforilar e regular mais de 50 substratos (BEUREL; JOPE, 2006). A fosforilação destes substratos permite a Gsk3 modular muitos processos celulares fundamentais, incluindo a estrutura, metabolismo, expressão genética, proliferação, sobrevivência e, de uma forma aparentemente paradoxal, a apoptose (BEUREL; JOPE, 2006; COHEN, PHILIP; FRAME, S, 2001). Apesar de ser predominantemente encontrada no citosol, a Gsk3 também é encontrada no núcleo e em mitocôndrias (KAYTOR, 2002). A Gsk3 nuclear é importante devido à sua capacidade de regular vários fatores de transcrição, permitindo deste modo a regulação de muitas vias de sinalização e, em última instância, a expressão de vários genes.

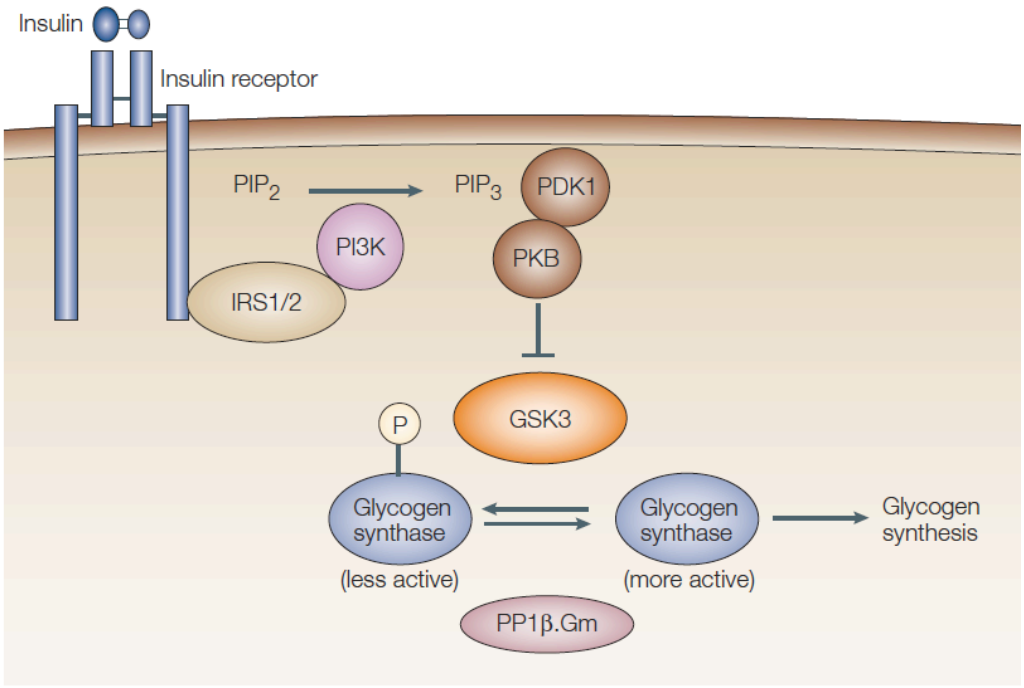


Figura 8. Insulina inibe Gsk3 e estimula a síntese de glicogênio: a primeira função atribuída a Gsk3. A ligação da insulina estimula a autofosforilação de seu receptor (IR). Um resíduo tirosina fosforilado no IR interage com o domínio de ligação de IRS1 ou IRS2 (proteínas substrato do receptor de insulina 1/2), recrutando-as para a membrana plasmática onde são fosforiladas pelo IR. Isto, por sua vez, permite que IRS1/2 interaja com PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), a qual converte PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) para PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). PIP3 então se liga aos domínios homólogos à plecstrina da PDK1 (proteína quinase-1 dependente de 3-fosfatidilinositol) e PKB (proteína quinase B, também conhecida como Akt), co-localiza-os na membrana e permite PDK1 fosforilar PKB. PKB fosforila e assim inibe Gsk3 (glicogênio sintase quinase-3), levando a desfosforilação da glicogênio sintase pela PP1β.GM (proteína fosfatase 1 associada ao glicogênio), e a estimulação da síntese de glicogênio. Atualmente sabe-se que Gsk3 também pode ser inibida por outras proteínas quinases (não mostrado), como PKA, PKC e quinase S6 (S6K), o que pode mediar a inibição em resposta a outros sinais e não apenas a insulina. Figura adaptada de COHEN; GOEDERT, 2004).

A Gsk3 é uma serina/tirosina-quinase altamente conservada. A sua caracterização molecular revelou a existência de duas isoformas, encontradas quase idênticas, em mamíferos: Gsk3α e Gsk3β (isoforma predominante no cérebro) (GRIMES, C. A.; JOPE, 2001b). As proteínas compartilham aproximadamente 97% de similaridade em seus domínios catalíticos, porém diferem significativamente fora destes. Embora camundongos nocautes para Gsk3α ($Gsk3\alpha^{-/-}$) ou heterozigotos para Gsk3β ($Gsk3\beta^{-/+}$) sejam saudáveis e férteis (tanto os machos quanto as fêmeas), a progênie $Gsk3\beta^{-/-}$ não é viável (BEAULIEU *et al.*, 2007). Ainda não está claro quais são os mecanismos deletérios decorrentes da ausência de Gsk3β em embriões ou por que a ausência da isoforma β, mas não da α, causa o defeito embriogênico letal.

Ambas as isoformas de Gsk3 estão constitutivamente ativas (na forma desfosforilada) em células em repouso, mas suas ações são rigidamente controladas por diversos mecanismos. O principal mecanismo fisiológico que regula a atividade de Gsk3 é a fosforilação de uma serina N-terminal, Ser21 na Gsk3α ou Ser9 na Gsk3β. A fosforilação destes resíduos de serina pode ser catalisada por diversas quinases como Akt (PKB), o que inibe a atividade da Gsk3 (Figura 8). Sendo assim, além da insulina, outros fatores de crescimento e neurotransmissores, que se ligam aos receptores acoplados à ativação da PI3K (fosfoinositidil 3-quinase) e Akt, podem inibir a atividade de Gsk3 através do aumento da fosforilação nas serinas (CHIN *et al.*, 2005). Outras vias de sinalização intracelular, incluindo aquelas que ativam a PKA (proteína quinase A) ou PKC (proteína quinase C), também convergem para inibir Gsk3 através de fosforilação da serina N-terminal. A fosforilação da tirosina de Gsk3, Tyr279 para Gsk3α ou Tyr216 para Gsk3β, também contribui para a regulação da sua atividade, mas diferentemente, aumentando-a. No entanto, ainda não está claro o impacto funcional deste sítio de fosforilação na regulação da atividade de Gsk3 e a sua importância ainda continua a ser debatida (COLE *et al.*, 2004).

Devido aos numerosos e variados substratos, mecanismos adicionais, além da fosforilação, são necessários para regular a atividade de Gsk3. Estes incluem o controle de sua localização intracelular e de sua associação com complexos protéicos, mecanismos que servem para, seletivamente, direcionar suas ações no sentido de substratos específicos. Por exemplo, os níveis nucleares de Gsk3 são dinamicamente regulados, afetando sua capacidade de fosforilar substratos nucleares, tais como certos fatores de transcrição (BIJUR; JOPE, 2001; DIEHL *et al.*, 1998). Recentemente, várias proteínas que se ligam a Gsk3 tem sido identificadas e, especula-se, que estas interações podem regular as ações específicas de Gsk3. Na via de sinalização Wnt, por exemplo, a axina e outras proteínas ligam-se a Gsk3 para direcionar a sua atividade quinase ao substrato específico β-catenina (RUBINFELD *et al.*, 1996). Além disso, a ação de Gsk3 é indiretamente controlada pelo estado de fosforilação do seu substrato. Isto explica porque a maioria dos substratos de Gsk3 deve ser "preparada", por exemplo, através da pré-fosforilação de um resíduo C-terminal distante a quatro aminoácidos do sítio de fosforilação da Gsk3 (BEUREL; JOPE, 2006). Desta forma, para que ocorra ação de Gsk3, é necessária uma coordenação temporal entre duas atividades quinase.

Resumidamente, a Gsk3 necessita estar desfosforilada, no sítio intracelular certo, associada com uma proteína adequada e co-localizada com o substrato que foi preparado por outra via de sinalização. Estes complexos mecanismos que controlam as ações de Gsk3 (fosforilação, distribuição, interação, e preparação do substrato) combinam-se para fornecer uma regulação fina de sua atividade para efeitos específicos. Este controle é especialmente importante para uma enzima capaz de regular diversas funções, como Gsk3.

A atividade de Gsk3 também pode ser regulada farmacologicamente. Desde que Gsk3 é um componente chave de muitos processos neuronais fundamentais, foi muito intrigante quando P. Klein e D. Melton descobriram que o Li é um inibidor direto da Gsk3 (KLEIN, P S; MELTON, 1996). Logo em seguida, a Gsk3 também foi mostrada ser inibida pelo Li tanto

em células intactas (STAMBOLIC *et al.*, 1996) quanto no cérebro de mamíferos (MUÑOZ-MONTAÑO *et al.*, 1997). Subsequentes investigações mostraram que o efeito inibitório de Li foi relativamente seletivo para Gsk3, em comparação a outras quinases (DAVIES, S. P. *et al.*, 2000). Este resultado levantou a hipótese de que a inibição da Gsk3 poderia ser importante para as ações terapêuticas do Li. Considerando que a Gsk3 é uma proteína reguladora de funções celulares fundamentais, a sua desregulação pode contribuir na patogênse do TAB.

No entanto, dado que a concentração terapeuticamente eficaz do Li no soro de pacientes (0,5 - 1,2 mM) é menor do que o IC_{50} (2 mM) de Li para a inibir Gsk3, pareceu que a inibição da Gsk3 pelo Li em níveis terapêuticos poderia ser demasiadamente pequena para contribuir significativamente para o efeito estabilizador do humor. Uma solução para esta limitação teórica foi fornecida pela descoberta de um mecanismo de amplificação *in vivo* da inibição da Gsk3 pelo Li. Uma investigação conduzida por Jope mostrou que o tratamento crônico por 4 semanas, com um regime terapeuticamente relevante de Li, aumentou a fosforilação da Ser9 de Gsk3β em várias regiões cerebrais de rato (SARNO, DE *et al.*, 2002). Este aumento de Gsk3β p-Ser9 indicou que o modesto efeito inibitório do Li sobre Gsk3β é amplificado por este mecanismo de fosforilação, proporcionando uma inibição substancial de Gsk3β por uma concentração terapeuticamente relevante.

Com a finalidade de entender como a desregulação de Gsk3 pode contribuir para o desenvolvimento de várias condições psiquiátricas, abordagens combinando resultados bioquímicos, farmacológicos e de comportamento de animais geneticamente modificados têm apresentado evidências convergindo para o envolvimento da Gsk3 na regulação da neurotransmissão dopaminérgica (DA) e serotoninérgica (5-HT). Por exemplo, o aumento direto da estimulação dopaminérgica, induzido pela administração de anfetamina ou um agonista do receptor de dopamina tipo 2 (D2R), ou, indiretamente, em camundongos nocautes (KO) do transportador de dopamina ($DAT^{-/-}$), causou diminuição da fosforilação de

Gsk3α e Gsk3β no estriado (BEAULIEU *et al.*, 2004). Os autores do estudo sugeriram que, devido a diminuição da fosforilação de Gsk3 (p-Ser-21 ou p-Ser9), a diminuição da atividade de Akt também poderia estar envolvida. Em seguida, foi demonstrado que a hiperatividade de Gsk3 neste modelo experimental contribui para o fenótipo comportamental observado nos camundongos. Os autores chegaram a esta conclusão pois a administração de inibidores da Gsk3, incluindo Li, bloqueou a hiperlocomoção e estereotipia originada pelo aumento da resposta dopaminérgica em animais $DAT^{-/-}$. Interessantemente, o efeito psicoestimulante foi menor em camundongos $Gsk3\beta^{-/+}$. Juntos, estes resultados sugeriram o envolvimento de Gsk3β na expressão de comportamento associados a dopamina (BEAULIEU *et al.*, 2004).

Com a finalidade de investigar este ponto, camundongos geneticamente modificados, que expressam uma forma mutante de Gsk3β sem o sítio para a fosforilação inibitória, o que resulta em Gsk3β constitutivamente ativada, apresentaram um fenótipo de hiperatividade locomotora similar àquela observada em camundongos $DAT^{-/-}$ (PRICKAERTS *et al.*, 2006).

Tal como o Li, diversos antipsicóticos induzem a fosforilação de Gsk3. Desta forma, foi sugerido que a ação sobre esta proteína também pode ser um mecanismo que explica a ação terapêutica destes medicamentos. No entanto, o Li penetra nas células e inibe Gsk3 diretamente (KLEIN, P S; MELTON, 1996). Pelo contrário, a ação majoritária dos antipsicóticos (ou dopamina) é externa, sobre receptores acoplados a proteína G (GPCRs; *G protein coupled receptors*). Em vista disso, por algum tempo não ficou esclarecido como tais receptores poderiam mediar os sinais reguladores sobre Gsk3.

Beaulieu e colaboradores em 2005 forneceram as evidências de como a Gsk3 é integrada a sinalização dopaminérgica. Os autores descobriram que após estimulação dopaminérgica, durante a internalização do receptor D2R, ocorre o recrutamento e formação de um complexo protéico formado por βArr2 (β-arrestina 2), PP2A (proteína fosfatase 2) e Akt, responsável por co-localizar e facilitar a desfosforilação de Akt pela PP2A. A redução da

fosforilação de Akt diminui sua ação inibitória sobre Gsk3. Estes resultados sugeriram o mecanismo pelo qual o efeito psicoestimulatório da anfetamina estaria associado com o aumento de atividade de Gsk3. Além disso, a diminuição da internalização de D2R através da administração de antipsicóticos poderia diminuir as chances de formação do complexo βArr2:PP2A:Akt, causando acúmulo das formas fosforiladas de Akt e Gsk3. Os autores sugeriram um papel primordial da ação sobre este complexo protéico para mediar os efeitos terapêuticos já que seu rompimento, por técnicas genéticas (em animais $\beta Arr2^{-/-}$ ou $D2R^{-/-}$), acarretou a perda do efeito psicoestimulante da anfetamina (BEAULIEU *et al.*, 2005).

Em 2008, Beaulieu e colaboradores observaram que quando administrado agudamente ou cronicamente em camundongos $\beta Arr2^{-/-}$, o Li perde sua ação inibitória sobre Gsk3 e seus efeitos comportamentais característicos. Com a finalidade de explicar este achado do ponto de vista molecular, os autores demonstraram que a não responsividade dos animais $\beta Arr2^{-/-}$ ao Li está correlacionada com a ausência da ação sua farmacológica sobre o complexo sinalizatório βArr2:PP2A:Akt. Uma série de co-imunoprecipitações indicaram que concentrações de Li terapeuticamente relevantes (0,5 - 1 mM) são suficientes para desestabilizar o complexo βArr2:PP2A:Akt tanto *in vitro* quanto no cérebro de ratos. Assim, este mecanismo poderia potencialmente explicar a falta de efeito do Li em animais $\beta Arr2^{-/-}$, uma vez que este complexo não se forma nestes mutantes (BEAULIEU; MARION; *et al.*, 2008a) (Figura 9). Embora o mecanismo exato pelo qual Li interfere na formação do complexo sinalizatório βArr2:PP2A:Akt seja desconhecido, as observações preliminares sugerem que como este complexo é dependente de magnésio para estabilizar-se, uma competição entre Li e magnésio, para se ligar a pelo menos um dos componentes do complexo, pode contribuir para a ação desestabilizadora (RYVES; HARWOOD, A J., 2001).

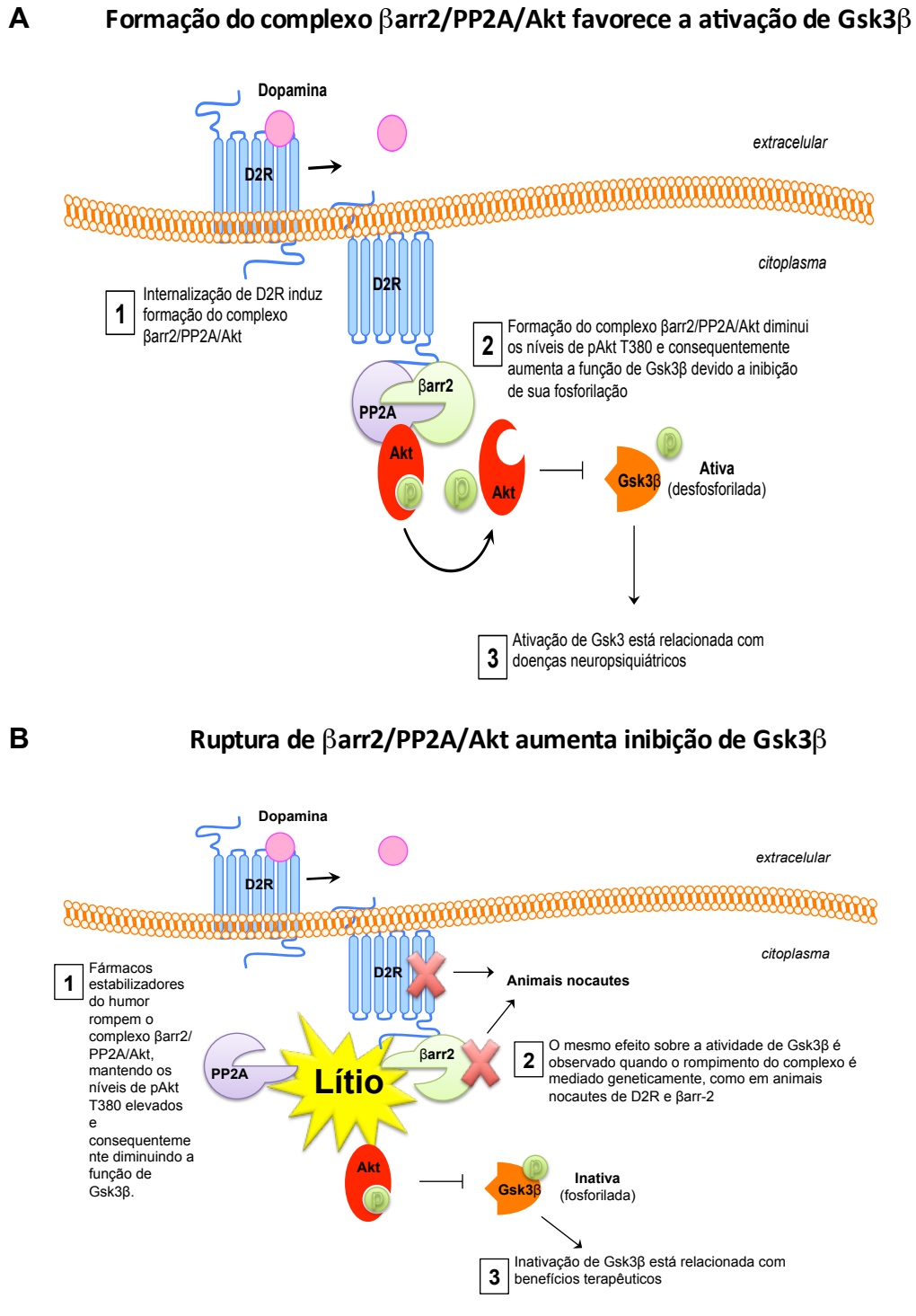


Figura 9. Complexo βarr2/PP2A/Akt media os efeitos terapêuticos e moleculares de estabilizadores do humor e dopamina sobre Gsk3. (BEAULIEU *et al.*, 2005, 2008).

Subsequentemente, interações *in vivo* entre o sistema 5-HT e Gsk3 também foram relatadas. Fármacos que atuam sobre a neurotransmissão de 5-HT tais como inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs), da monoamina oxidase (MAO), e antidepressivos tricíclicos têm sido demonstrados aumentar a fosforilação inibitória de Gsk3β em diversas regiões cerebrais (BEAULIEU; ZHANG, X. *et al.*, 2008; LI, XIAOHUA *et al.*, 2004, 2007). Por outro lado, a deficiência de 5-HT em camundongos mutantes para TPH2 (triptofano hidroxilase 2), uma enzima limitadora da síntese de 5-HT neuronal, resultou em um aumento de duas vezes da atividade de Gsk3 no córtex frontal (BEAULIEU; ZHANG, X. *et al.*, 2008).

Interessantemente, assim como o Li, outros FEHs também têm sido associados com a inibição da atividade de Gsk3. Em 1999, Chen e colaboradores descobriram que o tratamento com VPA inibe a atividade de Gsk3 em células de neuroblastoma humano (CHEN, G *et al.*, 1999). Os autores também conseguiram replicar o achado *in vivo*, resultando num aumento dos níveis citosólicos e nucleares de β-catenina (CHEN, G *et al.*, 1999). Posteriormente, vários outros estudos também relataram um efeito inibitório de VPA em Gsk3 através de distintos modelos experimentais, incluindo no córtex pré-frontal de camundongos (GRIMES, C. A.; JOPE, 2001a; HALL, A. C. *et al.*, 2002; KIM, A. J. *et al.*, 2005a; KOZLOVSKY *et al.*, 2006; SARNO, DE *et al.*, 2002; TATEBAYASHI *et al.*, 2004).

Poucos estudos têm investigado se Gsk3 é inibida por LTG e CBZ. Embora um estudo em células em cultura não tenha observado efeito da LTG nos níveis de pGsk3β Ser9 (AUBRY *et al.*, 2009), o tratamento crônico (28 dias) de ratos com LTG aumentou os níveis de pGsk3β Ser9 no hipocampo e córtex cerebral (LI, XIAOHUA; JOPE, 2010b). Até o momento não existe evidência de inibição de Gsk3 através do tratamento com CBZ (AUBRY *et al.*, 2009; JONATHAN RYVES *et al.*, 2005; MAI *et al.*, 2002).

É intrigante o fato da Gsk3 ser regulada por diferentes fármacos ou sistema de neurotransmissores (Figura 10 e Figura 11). Em roedores, sua inibição farmacológica (estabilizadores do humor, antipsicóticos e antidepressivos) ou genética recapitula muitos efeitos comportamentais terapêuticos, ao passo que a superexpressão de Gsk3β ativada reproduz correlatos comportamentais de hiperatividade (PRICKAERTS *et al.*, 2006). Estas evidências estão de acordo com estudos relatando que a Gsk3 está anormalmente ativada em doenças psiquiátricas. De fato, ao longo dos últimos anos uma série de estudos tem adicionado mais resultados suportando que as vias de transdução de sinais mediadas por Gsk3 são os mais promissores caminhos para a investigação da fisiopatologia de diversas doenças, particularmente em neuropsiquiatria (BEAULIEU *et al.*, 2009; COHEN, PHILIP; FRAME, S, 2001; COHEN, PHILIP; GOEDERT, 2004; JOPE; ROH, 2006).

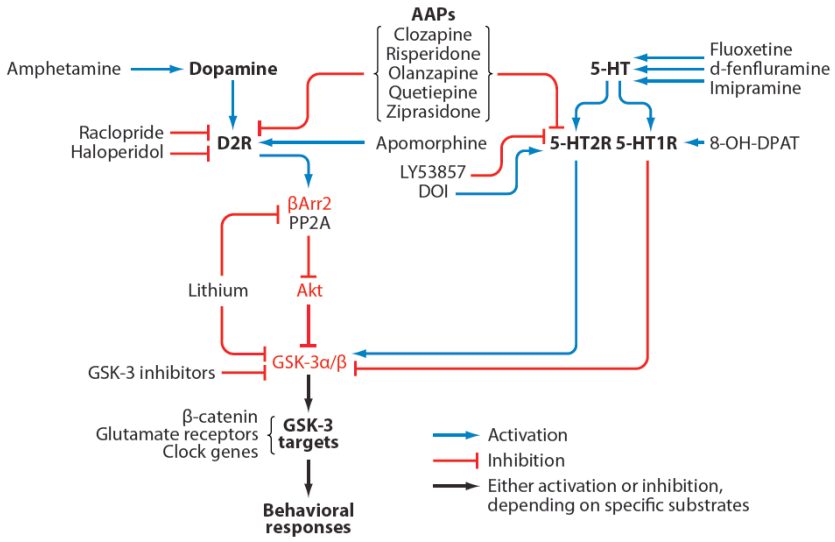


Figura 10. Regulação da sinalização Akt/Gsk3 por fármacos que afetam a sinalização dopaminérgica e serotoninérgica (5-HT). Imagem adaptada de (BEAULIEU *et al.*, 2009).

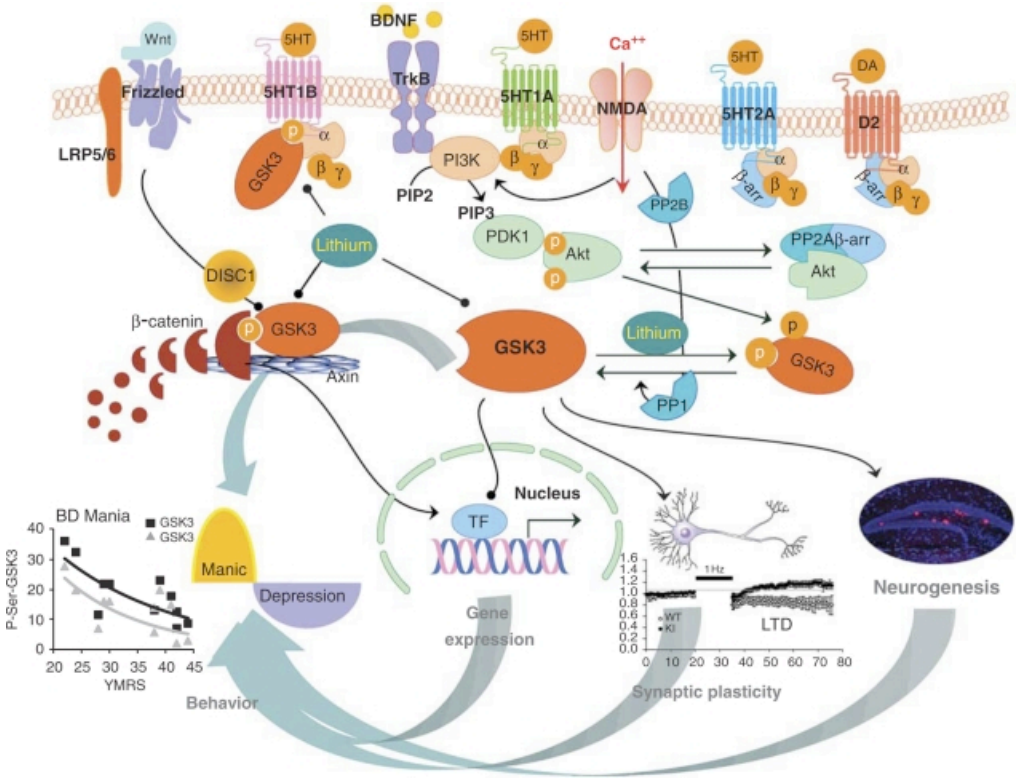


Figura 11. Ilustração esquemática das vias de sinalização que regulam GSK3 e funções de Gsk3 relacionadas com a regulação do humor. Gsk3 é regulada por BDNF, serotonina e dopamina através da via de sinalização de Akt, pelo receptor de NMDA por meio de fosfatases, e pela via de sinalização Wnt no complexo Axina-β-catenina. Uma vez ativada, Gsk3 fosforila diversos substrato que afetam a expressão genética, plasticidade sináptica e neurogênese, os quais são acreditados regular o humor e comportamentos relacionados. Abreviaturas: α, β, γ, subunidades da proteína G; β-arr, β-arrestina; BD, TAB; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; DA, dopamina; D2, receptor de dopamina tipo 2; DISC1, *disrupted in schizophrenia 1*; Gsk3, glicogênio sintase quinase-3; 5HT, serotonina; 5HT1A, 1B, 2A, subtipos de receptores de serotonina; LTD, depressão a longo prazo; NMDA, N-metil D-aspartato; P, fosforilada; PDK1, quinase dependente de fosfatidilinositol-1; PI3K, quinase fosfatidilinositol-3; PP1, PP2A, PP2B, proteína fosfatase 1, 2A, e 2B; TF, fatores de transcrição; trkB, receptor tropomiosina quinase tipo B; YMRS, escala de avaliação de Mania de Young. Figura adaptada de (LI, XIAOHUA; JOPE, 2010a).

A desregulação de Gsk3 tem sido associada a distúrbios de humor, esquizofrenia, doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, câncer, inflamação, doença cardiovascular e diabetes (COHEN, PHILIP; FRAME, S, 2001; COHEN, PHILIP; GOEDERT, 2004; EMAMIAN *et al.*, 2004; JOPE; ROH, 2006; KAYTOR, 2002; MAO *et al.*, 2009) (Figura 12). Sendo assim, muito esforço tem sido direcionado na descoberta de inibidores de Gsk3 e seus benefícios clínicos (COHEN, PHILIP; GOEDERT, 2004; FRELAND; BEAULIEU, 2012).

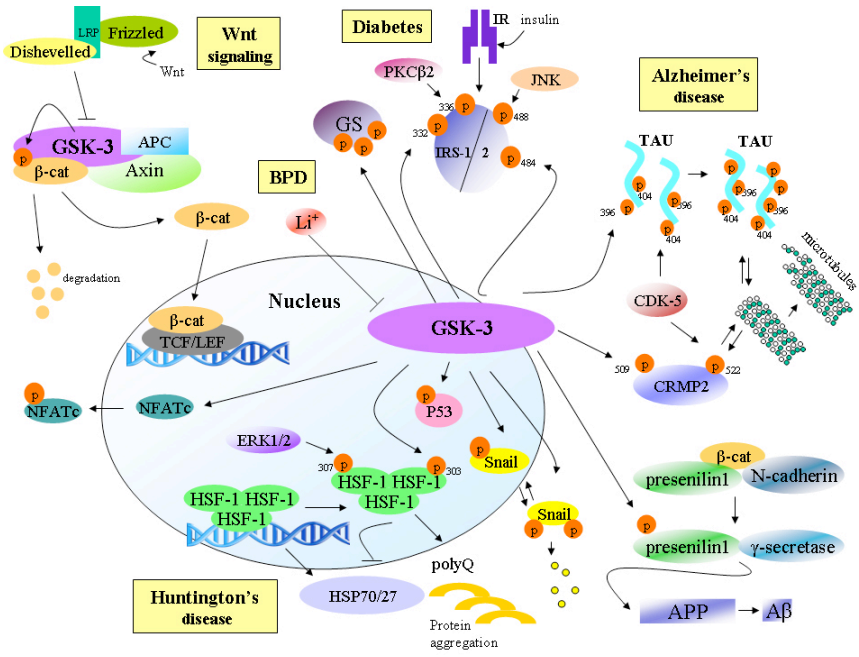


Figura 12. Múltiplos alvos de Gsk3 estão relacionados com diversas doenças [imagem online]. Disponível em: <http://www.tau.ac.il/~heldar/GSK3.html> [Acessado em 12/08/2012].

Uma questão que está em aberto, sendo o foco dos estudos atuais, é como a desregulação de Gsk3 está associada com os processos fisiopatológicos de doenças psiquiátricas. Uma das teorias é que a Gsk3 possa exercer suas ações em mecanismos celulares fundamentais através da regulação da expressão genética. Isso tem levado a identificação de vários fatores de transcrição alvos de Gsk3, como a β-catenina. Esta proteína multifuncional é degradada quando é fosforilada pela Gsk3. Ao regular Gsk3 negativamente, a via WNT promove um enriquecimento de β-catenina no citosol e núcleo, onde ela se liga aos fatores de transcrição *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor* (Tcf/LEF) para aumentar a expressão de genes alvos (NOVAK; DEDHAR, 1999). Vários alvos transcricionais de β-catenina já foram identificados, sendo que alguns podem desempenhar um papel na plasticidade sináptica (ISHIZUKA *et al.*, 2011; PEDROSA *et al.*, 2010). Assim, é possível que a inibição da Gsk3 por monoaminas e psicotrópicos pode originar alterações nos níveis de β-catenina que podem afetar a fisiologia sináptica.

Neste contexto, várias evidências têm surgido. Por exemplo, o tratamento crônico com Li aumenta os níveis de β-catenina ou a expressão de um repórter para a expressão gênica dependente da β-catenina em diferentes regiões do cérebro do rato (BEAULIEU; MARION; *et al.*, 2008a; GOULD, TODD D *et al.*, 2007; O'BRIEN *et al.*, 2004). A superexpressão de β-catenina em camundongos causou a manifestação de fenótipos similares ao observado com o tratamento com Li em modelos de hiperatividade locomotora induzida pela estimulação dopaminérgica (GOULD, TODD D *et al.*, 2007). No entanto, a deleção de β-catenina especificamente no prosencéfalo de rato adulto teve pouco efeito comportamental (GOULD, TODD D *et al.*, 2008), sugerindo que a β-catenina pode ser importante para a ação de compostos psicotrópicos, porém com um papel relativamente menor na regulação do comportamento normal influenciado por neurotransmissores monoaminérgicos.

1.2.4 MAPKs

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK; *mitogen activated protein kinases*) são uma importante família de proteínas quinases de serina e treonina altamente conservada e mediadora da transdução de sinais intracelulares que desempenham um papel significativo na regulação de vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação (KYOSSEVA, 2004). Três grupos principais de vias de sinalização das MAPKs foram identificadas em células de mamíferos: JNK (quinase N-terminal c-jun, também conhecida como proteína quinase ativada pelo estresse, SAPK), p38 e Erk (quinase regulada por sinal extracelular). Cada uma destas enzimas existe em várias isoformas: JNK1-3; p38 α, β, γ e δ e Erk1-8. As MAPKs respondem a estímulos extracelulares em neurônios. As vias JNK e p38 são ativadas por citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e interleucina-1β (IL-1β) ou em resposta ao estresse celular, tais como o stress genotóxico, osmótico, hipóxico ou oxidativo (JOHNSON; LAPADAT, 2002; KIM, E. K.; CHOI, E.-J., 2010). Está bem documentado que a Erk é tipicamente estimulada por sinais relacionados ao crescimento celular, incluindo as neurotrofinas fator de crescimento do neurônio (NGF), e fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) (NUMAKAWA *et al.*, 2010).

As MAPKs são umas das vias de transdução de sinal mais intensamente estudadas. Cada eixo de sinalização MAPK compreende pelo menos três componentes: uma quinase de quinase de MAPK (MAPKKK ou MAP3K), uma quinase de MAPK (MAPKK ou MAP2K), e uma MAPK. As MAPKKKs fosforilam e ativam MAPKKs, que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs (Figura 13). Na via de sinalização de Erk, por exemplo, uma das isoformas de Raf (MAPKKK), tais como A-Raf, B-Raf ou Raf-1 (também conhecida como C-Raf) fosforila e ativa Mek1/2 (MAPKK), que por sua vez, fosforila e ativa Erk1 ou Erk2 (Erk1/2)

(MAPK). Se ativada, Erk1/2 fosforila vários substratos, incluindo fatores de transcrição (MOR; PHILIPS, 2006)

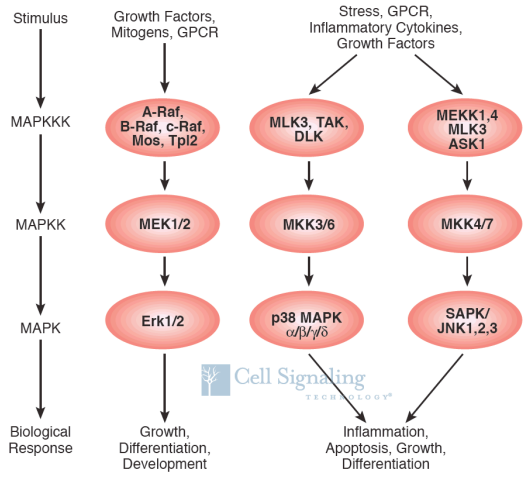


Figura 13.Via das MAPKs. As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) geralmente são divididas em três classes: Erk; p38 e JNK (SAPK). As cascatas de sinalização das MAPKs são organizados hierarquicamente em três módulos. MAPKs são fosforiladas e ativadas por MAPK quinases (MAPKKs), que por sua vez são fosforiladas e ativadas por MAPKK quinases (MAPKKKs). Os MAPKKKs são por sua vez ativadas através da interação com a família de GTPases e/ou outras proteínas quinases, as quais ligam a via das MAPKs com os receptores de superfície celular ou estímulos externos tal como neurotrofinas e neurotransmissores. [imagem online] Disponível em: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_Cascades.html>. [Acessado em 20/08/2012].

Em particular, a via de Erk constitui a via das MAPKs mais estudada em neurociência devido a transdução de sinais das neurotrofinas (CHAO, 2003). Duas quinases semelhantes com identidade de sequência de 85% foram originalmente chamadas Erk1 e Erk2 (Erk1/2) (KYOSSEVA, 2004), as quais foram encontrados durante uma busca de proteínas que são rapidamente fosforilados após a ativação de receptores de tirosina quinase pelo fator de

crescimento epidérmico (BOULTON *et al.*, 1990). Apesar de atualmente 8 isoformas de Erk serem conhecidas, Erk1(Erk44) e Erk2 (Erk42) são os membros mais amplamente estudados da via das MAPKs.

Estudos indicam que as Erks são expressas em abundância no sistema nervoso central (SNC) e, se ativadas, podem ser translocadas para o núcleo e aumentar a expressão de genes através da regulação da transcrição (SU, B.; KARIN, 1996). Um dos alvos nucleares mais amplamente estudados das MAPKs em mamíferos é o fator de transcrição/proteína ativadora 1 (AP-1) (WHITMARSH; DAVIS, R. J., 1996), o qual foi documentado estar presente nas regiões promotoras de determinados genes que codificam proteínas neuronais como neuropeptídios, receptores de neurotransmissores e tirosina hidroxilase (MULLENBROCK *et al.*, 2011).

É cada vez mais reconhecido que os fatores de transcrição desempenham um papel crítico no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso normal, bem como na adaptação do sistema nervoso a vários estímulos, tais como lesões, fatores de crescimento, tratamento farmacológico e diversos eventos fisiológicos e patológicos.

A modulação da via de Erk1/2, portanto, pode produzir uma cascata de respostas que podem levar a alterações funcionais e morfológicas em neurônios. Por exemplo, a ativação de Erk é necessária para a diferenciação neuronal de PC12 induzida por NGF (KLESSE *et al.*, 1999). Além disso, outro conjunto de evidências associa a desregulação de Erk1/2 com sobrevivência e proteção neuronal (BALLIF; BLENIS, 2001; WADA; PENNINGER, 2004). Os mecanismos moleculares conhecidos desta ação incluem a regulação positiva da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, e fosforilação direta e inativação de proteínas pró-apoptóticas tais como Bad e caspases. Desta forma, as MAPKs foram implicadas na patogênese de muitas doenças humanas, incluindo as psiquiátricas. Por exemplo, a expressão

reduzida de Erk1/2 já foi encontrada em amostras de tecido cerebral *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos (KYOSSEVA *et al.*, 1999; YUAN *et al.*, 2010).

O efeito dos FEHs sobre a via de Erk varia consideravelmente com o tipo de fármaco, regime de tratamento e modelo experimental. O VPA é FEH mais extensamente investigado. Em células de neuroblastoma humano (5Y5Y), verificou-se que o VPA, em distintas concentrações clinicamente relevantes, ativou a via de Erk dependente de tempo e concentração (DANIEL, DI *et al.*, 2005a; HAO *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em neurônios corticais e células progenitoras no hipocampo de rato em cultura (HAO *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2008). Einat e colaboradores detectaram um leve aumento dos níveis fosforilados de Erk1, mas não de Erk2, no hipocampo e córtex pré-frontal de animais tratados cronicamente com VPA por 4 semanas (EINAT *et al.*, 2003). Em contrapartida, o tratamento com VPA tanto *in vitro* como *in vivo* também pode reduzir a expressão de pErk1/2 (CASU *et al.*, 2007; ZHOU, Q. *et al.*, 2011). Embora poucos estudos tenham investigado, outro conjunto de evidências também mostram distintos efeitos de Li, LTG e CBZ na via de Erk (DANIEL, DI *et al.*, 2005b; EINAT *et al.*, 2003; KOPNISKY *et al.*, 2003; MAI *et al.*, 2002; PARDO *et al.*, 2003).

1.3 Ncs-1

1.3.1 Ncs-1 é um membro da família dos sensores neuronais de cálcio

O cálcio intracelular (Ca^{2+}) regula uma variedade de processos de transdução de sinais neuronais. Nestas células, a alteração na concentração citosólica de Ca^{2+} pode regular diversos eventos ao longo do tempo; de menos de milissegundos a horas, dias ou mesmo semanas (BERRIDGE *et al.*, 2000). Estes sinais, tão variados, em resposta aos níveis de Ca^{2+} são traduzidos em alterações na função neuronal através de uma classe emergente de proteínas denominadas sensores neuronais de cálcio (NCS), a qual é capaz de responder seletivamente aos sinais definidos de Ca^{2+} (BURGOYNE, 2007).

Os NCSs são caracterizados por possuírem quatro domínios *EF-hand*, os quais são sítios que permitem a ligação do cálcio na proteína (AMES; LIM, 2012). Apenas três ou dois (nas recoverinas) *EF-hands* podem se ligar ao Ca^{2+} já que o domínio situado mais próximo do N-terminal não é funcional nos membros da família. Os NCSs se ligam com alta afinidade ao Ca^{2+} e sofrem alterações conformacionais que, assim como a calmodulina, os permitem interagir e regular diversas proteínas alvo.

Acredita-se que a interação entre os NCSs e proteínas alvos, em resposta as variações dos níveis de Ca^{2+}, envolva um grupo miristoil situado no N-terminal dos NCSs (O'CALLAGHAN *et al.*, 2003) (Figura 14). A sinaptotagmina I, por exemplo, é capaz de responder rapidamente às elevadas concentrações de Ca^{2+} por ser um sensor de baixa afinidade, contribuindo desta forma para a rápida liberação dos neurotransmissores no local de fusão das vesículas, onde está localizada (SÜDHOF; RIZO, 1996). Esta ação da sinaptotagmina I ilustra três importantes características que permitem a seletividade na

transdução dos sinais mediados pelos NCSs: cinética, afinidade ao Ca^{2+} e localização. As distintas mudanças na função neuronal mediada pelos NCSs são atribuídas a estas características que diferem significativamente entre os membros da família (Figura 15).

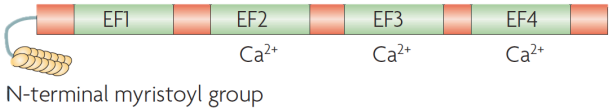


Figura 14. Representação esquemática da estrutura geral dos NCSs. Os NCSs (sensores neuronais de cálcio) contêm quatro domínios *EF-hands* (EF1-4) que se ligam ao Ca^{2+}, sendo que o primeiro (extremidade N-terminal) não é funcional. Muitos membros da família possuem um grupo N-miristoil na extremidade N-terminal. Figura adaptada de (BURGOYNE, 2007).

Em humanos, a família dos NCSs é codificada por 14 genes e a diversidade pode ser aumentada em virtude das variantes originadas por *splicing* alternativo. Embora muitos NCSs são expressos especificamente em tecidos neuronais, algumas classes também foram detectadas em tecido não-neuronais (HILFIKER, 2003).

Burgoyne e Weiss (BURGOYNE; WEISS, J L, 2001) classificam os NCSs em cinco classes (A-E): A, Ncs-1 ou frequenina; B, proteínas semelhantes a visinina (VILIPs); C, recoverinas; D, proteínas ativadoras de guanilil ciclase (GCAPs) e E, proteínas que interagem com canais de K^+ (KChIPs).

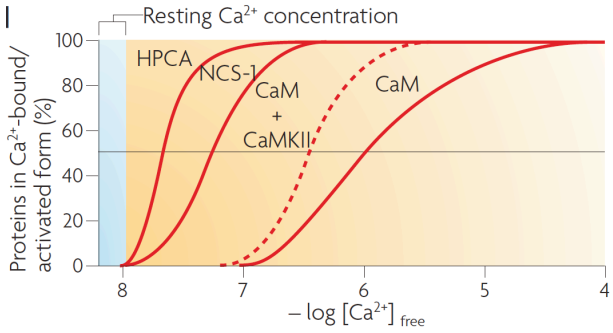


Figura 15.Comparação da afinidade ao Ca^{2+} entre NCSs e calmodulina. HPCA: hipocalcina; NCS-1: sensor neuronal de cálcio 1; CaM: calmodulina; CaMKII: proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina II. Figura adaptada de BURGOYNE, 2007).

1.3.2 Descoberta e primeiras funções associadas ao Ncs-1

O sensor neuronal de cálcio 1 (Ncs-1 ou frequenina, Freq) foi descoberto através de um experimento com uma *Drosophila sp.* mutante (mutante V7) na qual esta proteína foi superexpressa a partir de uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) (PONGS *et al.*, 1993). As moscas mutantes apresentaram um aumento de atividade e facilitação da liberação de neurotransmissores. Este resultado implicou no reconhecimento desta proteína como uma reguladora positiva da liberação de neurotransmissores, daí surgindo o termo "frequenina". Subsequente estudos também demonstraram efeitos "facilitadores" do Ncs-1 em canais de Ca^{+2} tipo P/Q (TSUJIMOTO *et al.*, 2002) e correntes de potássio do tipo Kv4 (NAKAMURA, T Y *et al.*, 2001).

O gene Ncs-1 humano (*NCS-1*; *NCS1*; *FREQ*) é localizado no cromossomo 9 (9q34) e codifica três transcritos. O transcrito 1 (ENST00000372398) é processado a partir dos oito éxons do gene e origina a isoforma 1, a mais abundante e maior, com 190 aminoácidos (~21 KDa). O transcrito 2 (ENST00000458469) origina a isoforma 2, uma variante de 172

aminoácidos, com menor N-terminal devido ao processamento apenas dos éxons 2-7. O transcrito 3 (ENST00000493042) não codifica nenhum produto.

Ncs-1 é extensamente estudado em diversos organismos uma vez que é altamente conservado desde leveduras a humanos. O estudo entre as mais variadas espécies identificou que a proteína está implicada em vários processos neuronais como a regulação de canais de iônicos, tráfego de vesículas, exocitose, aprendizagem e memória, crescimento neuronal e sobrevivência (BURGOYNE, 2007).

A superexpressão de Ncs-1 potencializou a exocitose em vários tipos de células, incluindo PC12 (GUIMARÃES, M. *et al.*, 2009; MCFERRAN *et al.*, 1998). Uma função de Ncs-1 bem caracterizada é sobre o tráfego de vesículas, exercida através da regulação de uma enzima chave no metabolismo do fosfatidilinositol, a PI4K IIIβ (fosfatidilinositol-4-quinase (PI4K) IIIβ). Esta enzima é fundamental para a síntese de fosfatidilinositol 4-fosfato, que pode então ser convertido em PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5 bifosfato). O PIP_2 é requerido para muitos eventos celulares, incluindo o tráfego de vesículas e sua conversão para os importantes segundos mensageiros DAG (diacilglicerol) e IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) pela PLC (fosfolipase C). A estimulação desta enzima por Ncs-1 foi sugerida pela primeira vez em levedura (HENDRICKS *et al.*, 1999) e, subsequentemente, a Ncs-1 de mamífero foi demonstrada estimular PI4K IIIβ (HAYNES *et al.*, 2005; ZHAO, X *et al.*, 2001). Posteriormente, este processo foi associado com o desenvolvimento do ouvido interno em *zebrafish* (BLASIOLE *et al.*, 2005). A micro-injeção de Ncs-1 em blastômeros de *Xenopus* revelou que sua superexpressão causou um aumento da transmissão sináptica da junção neuromuscular (OLAFSSON *et al.*, 1995).

Outra evidência da importância de Ncs-1 na neurotransmissão surgiu através da manipulação da sua expressão no verme *Caenorhabditis elegans*, em que a aprendizagem e a memória foram prejudicadas em mutantes nocautes, e reforçada quando Ncs-1 foi

superexpresso nestes animais (GOMEZ, M. *et al.*, 2001). Ncs-1 também contribui na plasticidade de curto prazo no hipocampo em cultura (SIPPY *et al.*, 2003). Nakamura *et al*., em 2002 publicaram interessantes resultados relacionando o Ncs-1 com a proteção celular. Os autores mostraram que a lesão em nervos aumenta a expressão de Ncs-1, e este mecanismo de indução pode ser uma resposta fisiológica benéfica para manutenção da viabilidade neuronal (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006).

Como pode o Ncs-1 estar envolvido em diferentes funções? A teoria mais aceita é que a diversidade de funções mediadas pelo Ncs-1 ocorre a partir de sua capacidade de se ligar a outras proteínas, exercendo a regulação de suas funções (HAYNES *et al.*, 2006). De fato, a interação entre Ncs-1 e proteínas alvo envolve distintos sítios de Ncs-1 (BAHI *et al.*, 2003; KABBANI *et al.*, 2002), e como citado anteriormente, dependente ou independente da ligação ao Ca^{2+} (HAYNES *et al.*, 2006; KABBANI *et al.*, 2002). Muitas proteínas interagem com Ncs-1, no entanto, o significado funcional da maioria destas interações ainda é desconhecido (Figura 16).

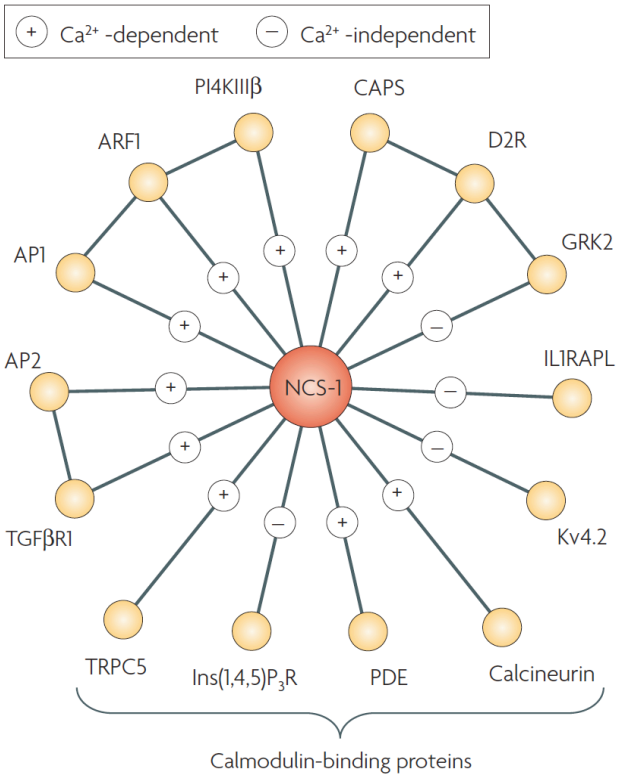


Figura 16. Um mapa de interação proteína-proteína mostrando algumas interações conhecidas de Ncs-1. AP1: proteína clatrina adaptadora 1; AP1: proteína clatrina adaptadora 2; ARF1: fator de ribosilação de ADP 1; CAPS: proteína ativadora de secreção dependente de Ca^{2+}; D2R: receptor de dopamina tipo 2; GRK2: quinase de receptores acoplados a proteína G tipo 2; IL1RAPL: proteína associada ao receptor de interleucina-1; Ins(1,4,5)P_3R: receptor de inositol-1,4,5-trifosfato; Kv4.2: subunidade de canais de potássio dependente de voltagem; PDE: fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico; PI4KIIIβ: fosfatidilinositol 4-quinase tipo IIIβ; TGFβR1: receptor de fator de crescimento transformante β tipo I; TRPC5: canal receptor de potencial transiente. Figura adaptada de BURGOYNE, 2007.

1.3.3 Ncs-1, dopamina e doenças psiquiátricas

Em 2003, um grupo de pesquisa sediado em Baltimore (Maryland, EUA) descobriu que amostras do córtex cerebral dorsolateral de pacientes esquizofrênicos e bipolares do *Stanley Foundation Neuropathology Consortium* apresentavam um aumento de aproximadamente 50% da expressão de Ncs-1 (KOH *et al.*, 2003). Esta evidência colocou o Ncs-1 no centro das atenções já que no ano anterior o estudo de Kabbani e colaboradores tinha identificado o Ncs-1 como sendo uma proteína que interage e regula a dessensibilização de receptores dopaminérgicos do tipo D2R (KABBANI *et al.*, 2002). O estudo mostrou que o Ncs-1 depende do cálcio para inibir GRK2, uma proteína que fosforila e dá início aos mecanismos de internalização de D2R (Figura 17). A desregulação da atividade de D2R é estreitamente associada com a patologia de doenças psiquiátricas.

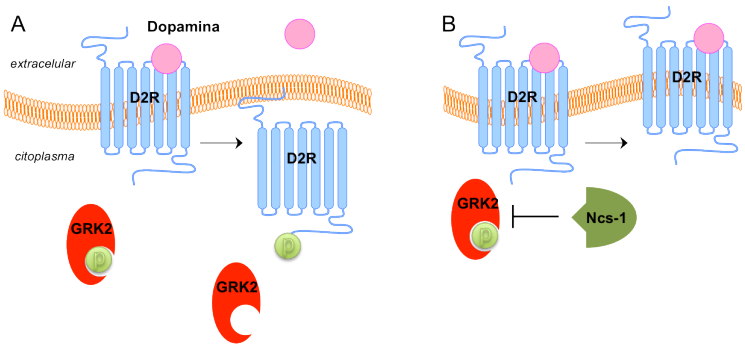


Figura 17.Ncs-1 inibe Grk2 e regula a exposição de D2R na membrana. (A) Grk2 fosforila D2R, um passo crucial para a sua internalização. (B) Ncs-1 inibe Grk2 e desta forma aumenta a exposição de D2R na membrana, o que pode causar um aumento na sinalização mediada por este receptor.

Estas evidências contribuíram para o Ncs-1 ser classificado como uma proteína que interage com os receptores de dopamina (DRIP; *dopamine receptor- interacting proteins*) e, desta forma, a sua desregulação passou a ser investigada na fisiopatologia e tratamento de doenças psiquiátricas (BERGSON *et al.*, 2003). A função de Ncs-1 como uma DRIP é de especial relevância já que a proteína pode ser um dos conectores entre os níveis de cálcio e a sinalização dopaminérgica mediada por D2R. No entanto nota-se que outras funções de Ncs-1 independente de cálcio também já foram descritas, como a indução da liberação de glutamato em células PC12 que superexpressam Ncs-1 (GUIMARÃES, M. *et al.*, 2009).

Apesar de não ser bem compreendida, a associação entre Ncs-1 e doenças psiquiátricas ganhou novos capítulos através dos estudos de simulação terapêutica conduzidos pelo grupo do Prof. Romano-Silva na Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte. O primeiro estudo publicado pelo grupo mostrou que a estimulação eletroconvulsiva aumentou a expressão de Ncs-1 no cerebelo de ratos (ROSA *et al.*, 2007). Posteriormente foi mostrado que antipsicóticos típicos e atípicos não alteram da expressão de Ncs-1 no cérebro de ratos ou PC12, embora um aumento significativo tenha sido observado em diversas áreas cerebrais quando ratos foram tratados com metilfenidato (SOUZA, BRUNO R *et al.*, 2008, 2010; SOUZA, R. P. *et al.*, 2008).

B. R. Souza e colaboradores mostraram que a superexpressão de Ncs-1 em células PC12 diminui os níveis totais e fosforilados (p-Tre34) de DARPP-32 (fosfoproteína neuronal regulada por dopamina e AMPc), AMPc e Creb p-Ser133 (SOUZA, BRUNO R *et al.*, 2011). Este dado sugere que Ncs-1 pode influenciar a sinalização dopaminérgica em múltiplos níveis. Este mesmo grupo, também, encontrou uma redução da expressão de Ncs-1 em células mononucleares sanguíneas em pacientes com TAB (TORRES, K C L *et al.*, 2009).

Estudos mais recentes com animais geneticamente modificados têm fornecido fortes evidências que sustentam a influência do Ncs-1 sobre o comportamento. Camundongos

superexpressando uma forma de Ncs-1, especificamente no giro denteado hipocampal, que interage com D2R, tiveram uma melhora na memória espacial e aumento no comportamento exploratório medido através de um paradigma de curiosidade. Através de estudos neurofisiológicos, os autores atribuíram o achado a uma facilitação na potencialização de longo prazo dos neurônios dependente de Ncs-1. Ainda, os autores conseguiram bloquear todos os efeitos observados através da administração de um peptídeo que inibe a interação entre Ncs-1 e D2R (SAAB *et al.*, 2009). Dados em submissão do grupo do Prof. Romano-Silva mostram que camundongos Ncs-$1^{-/-}$ são caracterizados por fenótipos que assemelham-se a depressão, ansiedade e déficits de memória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ação farmacológica *in vitro* e *in vivo* de FEHs sobre a expressão gênica e protéica de Ncs-1.

Avaliar o impacto farmacológico da deleção gênica de Ncs-1.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de Li, VPA, LTG e CBZ sobre a expressão de Ncs-1 (proteína e RNAm) em células PC12 e no cérebro de camundongos.

Investigar os níveis cerebrais de Ncs-1 em um modelo experimental de mania tratado com VPA.

Investigar o efeito dos FEHs em animais nocautes para βArr2 e D2R.

Investigar o envolvimento entre a inibição de HDACs, Gsk3 e Erk e a expressão gênica e protéica de Ncs-1.

Desenvolver e avaliar um sistema de gene repórter para o *NCS-1*.

Investigar a hiperlocomoção induzida pela AMPH em animais nocautes para o Ncs-1.

Avaliar o estresse oxidativo e metabolismo energético cerebral de camundongos nocautes para o Ncs-1 e o efeito do tratamento com VPA sobre estes parâmetros.

Avaliar o impacto da deleção o gene Ncs-1 na longevidade e resistência ao paraquat de *C. elegans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Vetores plasmidiais

pGL4.10[luc2]: Vetor repórter desprovido de promotor contendo a sequência codificante da luciferase. Foi utilizado para inserção das sequências candidatas a promotor do Ncs-1. Obtido diretamente da Promega (Fitchburg, EUA).

pBGal-CMV: Vetor repórter que contém o cDNA da proteína beta galactosidase acoplada ao promotor CMV humano.

Myc-Gsk3β.pcDNA3: Vetor pcDNA3 de expressão da Gsk3β humana.

pcDNA3: Vetor pcDNA3 vazio.

3.2 Linhagens celulares

PC12: Linhagem celular derivada de um feocromocitoma da medula suprarrenal de rato.

HEK 293: Linhagem de rim embrionário humano.

3.3 Fármacos

Todos os fármacos utilizados pelo estudo foram obtidos pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis – EUA) e estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Fármacos utilizados pelo estudo.

Fármaco	Catálogo	Descrição
Ácido valpróico	#P4543	Estabilizador do humor/anticonvulsivante
Carbamazepina	#C4024	Estabilizador do humor/anticonvulsivante
Ciclohexamida	#C4859	Inibidor da síntese protéica
Cloreto de Li	#L4408	Estabilizador do humor
D-Anfetamina	#A5880	Estimulante dopaminérgico
DMSO	#D8418	Solvente aprótico
H_2O_2	#H0904	Indutor do estresse oxidativo
Lamotrigina	#L3791	Estabilizador do humor/anticonvulsivante
Lítio	#L0505	Estabilizador do humor
MS275	#M5568	Inibidor de HDAC[a] classes I
Paraquat	#856177	Herbicida indutor do estresse oxidativo
SAHA	#SML0061	Inibidor de HDAC [a] classes I e II
SL327	#S4069	Inibidor específico de Mek 1/2
TDZD-8	#T8325	Inibidor específico de Gsk3β
U0126	#U120	Inibidor específico de Mek 1/2

[a] HDAC: histona deacetilase

3.4 Animais

3.4.1 Camundongos C57 B/L WT

Estes animais foram utilizados para os tratamentos farmacológicos, testes comportamentais e para manutenção das linhagens modificadas geneticamente. Eles possuem um *background* genético do tipo selvagem. Foram mantidos e adquiridos das colônias do *Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec* (IUSMQ) em Quebec City, QC, no Canadá e do Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em Criciúma, SC, Brasil.

3.4.2 Camundongos nocautes de βArr2, D2R, DAT, Gsk3α e Gsk3β

Estes animais (da linhagem C57 B/L) são deficientes nas proteínas codificadas pelos genes correspondentes e classificados como nocautes. A única exceção é o animal Gsk3β, o qual é mantido em heterozigose visto que a homozigose para o alelo mutado é letal. Os animais foram gentilmente doados para o estudo pelo Prof. Dr. Jean-Martin Beaulieu do *Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec* (IUSMQ). βArr2: beta arrestina 2; D2R: receptor de dopamina tipo 2; Gsk3α: glicogênio sintase isoforma alfa; Gsk3β: glicogênio sintase isoforma beta.

Para controle experimental e estratégias de reprodução, todos os animais (denominados adiante como camundongos "*nome_do_gene*$^{-/-}$"), foram genotipados e identificados em três grupos quanto ao *locus* do gene: selvagem (*nome_do_gene* $^{+/+}$); heterozigotos (*nome_do_gene* $^{-/+}$) e nocautes (*nome_do_gene* $^{-/-}$). Animais *nome_do_gene* $^{+/+}$ possuem as duas cópias funcionais do gene, *nome_do_gene* $^{-/+}$ apenas uma e *nome_do_gene* $^{-/-}$ são desprovidos de expressão da proteína correspondente.

3.4.3 Camundongos CamKII-Cre, Gsk3β $^{Flox/Flox}$ e Gsk3β $^{Flox/Flox, CamKII-Cre+}$

Estes animais são da linhagem C57 B/L. Camundongos CamKII-Cre expressam a enzima Cre recombinase sob o controle específico do promotor do gene *CaMKII* (proteína quinase II dependente de Ca^{2+} e calmodulina) o qual permite a expressão da enzima apenas no prosencéfalo. Animais Gsk3β Flox/Flox possuem o gene *GSK3β* flanqueado por dois sítios Flox (loxP), os quais constituem uma seqüência específica de 34 pares de bases artificialmente inserida no genoma. O sítio Flox é reconhecida pela Cre recombinase, a qual pode retirar ou inverter o gene dependendo da orientação dos sítios Flox, inibindo sua expressão. O animal Gsk3β$^{Flox/Flox, CamKII-Cre+}$ é o resultado do acasalamento das duas linhagens

citadas anteriormente, tendo portanto depleção condicional de Gsk3β especificamente no prosencéfalo. Os animais foram gentilmente doados para o estudo pelo Prof. Dr. Jean-Martin Beaulieu do *Institut Universitaire en Santé Mentale de Québec* (IUSMQ).

3.4.4 Camundongos nocautes de Ncs-1

Estes animais (linhagem C57 B/L) são deficientes da proteína codificada pelo gene *NCS-1* e desta forma classificados como nocautes. Estes camundongos foram adquiridos do Laboratório Charles River e fornecidos pelo Dr. Andreas Jeromin ao INCT de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG. São mantidos pelo grupo do Prof. Dr. João Quevedo no Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em Criciúma, SC. Para controle experimental e estratégias de reprodução, todos os animais nocautes do gene *NCS-1* (denominados adiante como camundongs *Ncs-1*$^{-/-}$*),* foram genotipados e identificados em três grupos quanto ao *locus* do gene: selvagem (*Ncs-1*$^{+/+}$); heterozigotos (*Ncs-1*$^{-/+}$) e nocautes (*Ncs-1*$^{-/-}$). Animais *Ncs-1*$^{+/+}$ possuem as duas cópias funcionais do gene *NCS-1*, *Ncs-1*$^{-/+}$ apenas uma e *Ncs-1*$^{-/-}$ são desprovidos de expressão da proteína *Ncs-1*.

3.4.5 Ratos Wistar WT

Estes animais são considerados portadores de background genético selvagem. Foram utilizados exclusivamente para gerar o modelo experimental de mania induzida por AMPH no Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em Criciúma, SC.

3.4.6 Caenorhabditis elegans: cepa WT N2 Bristol

Este verme é considerado portador de background genético selvagem. A cepa foi adquirida do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – *University of Minnesota*) e é mantida no Laboratório de Neurociência do INCT de Medicina Molecular da UFMG.

3.4.7 Caenorhabditis elegans: cepa XA406

Este verme é nocaute para o gene *NCS-1*. A cepa foi adquirida do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – *University of Minnesota*) e é mantida no Laboratório de Neurociência do INCT de Medicina Molecular da UFMG.

3.5 Genotipagem de animais modificados geneticamente

3.5.1 Extração de DNA

O DNA para genotipagem dos camundongos utilizados neste estudo foi extraído a partir de 0,5 - 1 cm da parte distal da cauda de cada animal. Para tal, adicionou-se 300 µL de solução de lise e 2 µL de proteinase K a 10 mg/mL a cada amostra, e incubou-se a 55 ^{o}C até se verificar que as caudas estavam completamente digeridas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 x *g* e removeu-se o sobrenadante para novos tubos. Adicionou-se 300 µL de isopropanol e homogeneizou-se as amostras invertendo os tubos algumas vezes; neste passo, o DNA precipitou, formando na maioria das vezes um pellet esbranquiçado visível a olho nu. As amostras foram novamente centrifugadas durante 5

minutos a 12.000 x *g* e o sobrenadante foi descartado com o cuidado para não perder o pellet. Adicionou-se 500 µL de etanol a 70% e voltou-se para mais uma centrifugação das amostras durante 5 minutos a 12.000 x *g*, descartando-se novamente o sobrenadante. Após evaporação do volume residual do etanol à temperatura ambiente durante 10 minutos, o precipitado insolúvel de DNA foi dissolvido em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) incubando a solução por 10 minutos a 65 ^{o}C. As amostras foram mantidas 4 ^{o}C até à sua utilização.

3.5.2 Quantificação do DNA extraído

A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria (Ultrospect 2100 pro, Amersham Biosciences), utilizando para tanto a diluição de 1:100 (DNA : TE) em cuvetas de quartzo. Esta técnica quantifica o DNA de cadeia dupla de acordo com a seguinte equação (lei de Lambert-Beer):

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

onde ***C*** é a concentração de DNA em ng/µL, ***Abs*** a absorbância (neste caso a 260 nm, que corresponde ao pico de absorção do comprimento de onda ultravioleta (UV) pelo DNA), ***e*** o coeficiente de extinção (50 ng.cm/µL para o DNA de cadeia dupla) e ***b*** o comprimento do caminho óptico no espectrofotômetro (1,0 cm nas condições do estudo). Sendo assim, quando o equipamento mede a absorbância a 260 nm obtêm-se um valor, que multiplicado por 50 (constante ***e***) indica a concentração de DNA na amostra, em ng/µL. A absorbância de 280 nm (que corresponde ao pico de absorção de UVs por proteínas) e a de 230 nm (pico de absorção

de UV por contaminantes orgânicos) foram também coletadas para gerar as razões da absorbância 260/280 e 260/230, as quais são medidas de pureza da amostra. Quanto mais pura for a amostra, maiores serão estas razões. Geralmente considera-se o valor 1,8 como referência de pureza do DNA. Desta forma, considera-se que a amostra é pura quando A260/A280 ≥ 1,8 e A260/230 ≥ 1,8.

3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Sequências genuínas dos genes (exclusivamente em genes selvagens) ou insertos que silenciam o gene (exclusivamente em genes nocauteados) foram amplificadas utilizando primers específicos através da PCR utilizando-se cerca de 100 ng de DNA genômico (Tabela 4). As amplificações foram realizadas utilizando-se um controlador termal programável *Mastercycler* (Eppendorf, Hamburg – EUA). O DNA foi incubado em um meio contendo 10 pmol de cada *primer,* dNTP 0,2 mmol/L, 1 U da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Life Technologies, Carlsbad – EUA), seu tampão 1X, e água para o volume final de 20 μL. A reação foi realizada com temperatura de desnaturação de 94 ^{o}C por 30 s, temperatura de anelamento de acordo com cada par de primers e extensão à 72 ^{o}C por 30 s, com repetição de 30 ciclos pelo menos.

3.5.4 Eletroforese em gel de agarose

Cerca de 5 μL do produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% preparado em tampão TAE (Tris.acetato 0,4 M e EDTA 1,0 m) contendo brometo de etídio 0,25 μg/mL. As amostras foram preparadas através da adição de uma mistura contendo azul de bromo-fenol 0,25% (p/v) e glicerol 30% (p/v). A corrida eletroforética foi processada em uma cuba

contendo tampão TAE, utilizando-se 9 V/cm por 30-45 minutos. Após eletroforese, os géis foram fotodocumentados no equipamento *ImageQuant 400* (*GE Life Sciences,* Little Chalfont, RU) e os genótipos dos animais foram determinados como descrito no tópico seguinte.

Tabela 4. Primers utilizados para genotipagem dos camundongos

Primer	Sequência (5' è 3')
Ncs-1	
NCS-1-new-F	CCGAGCATGGGGAAATCCAAC
NCS-1R	GCACGCTGACAGGCGACACC
NeoF	GCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC
D2R	
D2-I7-as	CTCCCCAGAGTTGTGGCAAAAGG
D2-I7-s	TGATGACTGGGAATGTTGGTGTGC
Neo-as	AGGATTGGGAAGACAATAGCAG
BARR-2	
SS/21CIN	GATCAAAGCCCTCGATGATC
SS/BAR FL23	GGGGCAACCTTAATTTCATT
SS/BAR FL22	TCTGGGCTATAGCTATCTAGTAACG
Flox-GSK3β	
FLOX-F	GGGGCAACCTTAATTTCATT
FLOX-R	TCTGGGCTATAGCTATCTAGTAACG
GSK3β	
Gsk3β Neo	CGTGCTACTTCCATTTGTCACG
Gsk3β exon	ACCCACAGTAGTGGCAACTC
Gsk3β intron	CCAGTCACAAATCGTACTGC
CamKII-Cre	
Cre-1	GTCCAATTTACTGACCGTACACC
Cre-2	GTTATTCGGATCATCAGCTACACC
GSK3α	
5Gsk3α1 3Gsk3α1	GGGTAGCCTGGTGTGGCTGGATT TCCACAGACAGACCATGGCCACA

3.5.5 Identificação dos genótipos

Ncs-1: Animais Ncs-$1^{-/+}$ possuem dois fragmentos amplificados: 221pb (correspondente a amplificação do gene *NCS-1*) e 480pb (correspondente à sequência inserida para nocautear o gene *NCS-1*). Animais Ncs-$1^{+/+}$ e Ncs-$1^{-/-}$ são identificados pela única presença do fragmento 221pb e 480pb, respectivamente.

D2R: Animais D2R$^{-/+}$ possuem dois fragmentos amplificados: 200pb (correspondente a amplificação do gene D2R) e 350pb (correspondente à sequência inserida para nocautear o gene D2R). Animais D2R$^{+/+}$ e D2R$^{-/-}$ são identificados pela única presença do fragmento 200pb e 350pb, respectivamente.

βArr2: Animais βArr2$^{-/+}$ possuem dois fragmentos amplificados: 600pb (correspondente a amplificação do gene *βARR2*) e 300pb (correspondente à sequência inserida para nocautear o gene *βARR2*). Animais βArr2$^{+/+}$ e βArr2$^{-/-}$ são identificados pela única presença do fragmento 600pb e 300pb, respectivamente.

GSK3α: Animais Gsk3α$^{-/+}$ possuem dois fragmentos amplificados: 800pb (correspondente a amplificação do *GSK3α*) e 400pb (correspondente à sequência inserida para nocautear o gene *GSK3α*). Animais Gsk3α$^{+/+}$ e Gsk3α$^{-/-}$ são identificados pela única presença do fragmento 800pb e 400pb, respectivamente.

GSK3β: Animais Gsk3β$^{-/+}$ possuem dois fragmentos amplificados: 500pb (correspondente a amplificação do *GSK3β*) e 650pb (correspondente à sequência inserida para

nocautear o gene *GSK3β*). Animais Gsk3β$^{+/+}$ são identificados pela única presença do fragmento 500pb.

Flox-GSK3β: Animais Flox-Gsk3β$^{-/+}$ possuem dois fragmentos amplificados: 800pb (correspondente a amplificação do *GSK3β*) e 1100pb (correspondente à sequência Flox flanqueando o gene *GSK3β*). Animais Flox-Gsk3β$^{+/+}$ e Flox-Gsk3β$^{-/-}$ são identificados pela única presença do fragmento 800pb e 1100pb, respectivamente.

CamKII-Cre: Animais CamKII-Cre^{+} possuem apenas um fragmento amplificado de 700pb (correspondente ao gene CamKII-Cre inserido). Animais CamKII-Cre^{-} não mostram amplificação.

3.6 Manutenção e tratamento farmacológico em roedores

Os animais permaneceram acondicionados em gaiolas individuais de aço inoxidável, 4-5 animais por gaiola, em ambiente com temperatura de 23 ± 1 ºC, umidade relativa de 55 ± 10% e iluminação apropriada com ciclo claro/escuro de 12 h (06:00 ás 18:00) tendo livre acesso ao consumo de ração e água. Para camundongos, foram utilizados animais com aproximadamente 8 semanas de idade e com cerca de 20-23g. Os ratos da linhagem Wistar tinham cerca de 250-350g e foram utilizados como modelos experimentais exclusivamente nos experimentos de mania induzida por AMPH. 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 de comitê de ética local.

3.6.1 Tratamento Agudo

O tratamento agudo consistiu em uma única injeção intraperitoneal (i.p.) do fármaco em camundongos. Os animais foram tratados com lítio (200 mg/kg), VPA (400 mg/kg), LTG (20 mg/kg), MS275 (20 mg/kg), TDZD-8 (30 mg/kg), SL327 (50 ou 75 mg/kg) ou AMPH (3 mg/kg) com o intuito de avaliar o comportamento e mensurar a expressão de proteínas ou RNAm no cérebro. Este experimento foi realizado em camundongos C57 B/L WT originados no IUSMQ, Université Laval, Canadá. Como individualmente indicado nas seções posteriores, os animais foram imediatamente decapitados por decapitação uma ou duas horas após a administração do fármaco.

3.6.2 Tratamento Crônico

O tratamento crônico foi realizado com os estabilizadores do humor Li, VPA e LTG e inibidor de histona deacetilase MS275 em camundongos C57 B/L WT, $\beta Arr2^{+/+}$, $\beta Arr2^{-/-}$, $D2R^{+/+}$ ou $D2R^{-/-}$. Li foi adicionado na água dos animais por 15 dias a uma concentração de 0,12% (v/v). Para controle do grupo Li, foram utilizados animais expostos as mesmas condições, simultaneamente, mas sem Li na água. VPA foi adicionado a ração para que a dose de 10 ou 25 mg/kg/dia fosse atingida. Os animais foram expostos ao VPA por 21 dias. Para controle do grupo VPA, foram utilizados animais expostos as mesmas condições, simultaneamente, mas sem VPA na ração. LTG e MS275 foram diluídos em uma solução de tween 1% em água e a dose de 10 mg/kg/dia (LTG) ou 20 mg/kg/dia (MS275) foram administradas intraperitonialmente por 21 dias.

No fim do último dia de tratamento os animais foram decapitados. Os regimes de tratamento farmacológicos foram empregados baseando-se na literatura científica, a qual mostra que estes regimes possuem eficácia antidepressiva e ansiolítica em camundongos.

3.6.3 Tratamento crônico com VPA para avaliação da memória

Este tratamento farmacológico foi realizado em camundongos Ncs-$1^{+/+}$, Ncs-$1^{-/+}$ e Ncs-$1^{-/-}$. O tratamento consistiu de injeções intraperitoneais diárias, por 21 dias, de NaCl 0,9% ou VPA 250 mg/kg dissolvidos em NaCl 0.9%.

3.6.4 Modelo animal de mania induzida por AMPH e tratamento com VPA para reversão dos sintomas

Este modelo experimental reproduz um episódio agudo de mania, o qual é revertido através do tratamento com ácido valpróico por duas semanas (Tabela 5). Ratos da linhagem Wistar receberam uma injeção i.p. diária de 0,25 mg/kg de d-anfetamina (AMPH) ou solução salina 0,9% (Sal) durante 14 dias. No dia 8 do tratamento, os animais do grupo de AMPH e Sal foram divididos em dois grupos: tratamento com VPA 250 mg/kg (i.p.) ou Sal 0.9% (i.p.) duas vezes por dia durante 7 dias. No dia 15 do tratamento, os animais receberam uma única injeção de AMPH (0,25 mg/kg) ou Sal e atividade locomotora foi avaliada 2 h após esta última injeção. Cada grupo experimental foi composto por 12 animais.

Tabela 5. Experimento reversão da mania induzida por AMPH após tratamento com VPA.

Grupo experimental	Regime de tratamento	Fenótipo esperado após 15 dias
Sal + Sal[a]	Uma injeção diária (i.p.)[d] de NaCl 0,9% nos primeiros 7 dias; Duas injeções diárias (i.p) de NaCl 0,9% nos 8 dias seguintes.	Nenhuma alteração na locomoção
Sal + VPA[b]	Uma injeção diária (i.p.) de NaCl 0,9% nos primeiros 7 dias; Duas injeções diárias (i.p.) de VPA 250 mg/kg nos 8 dias seguintes.	Nenhuma alteração na locomoção
AMPH[c] **+ Sal**	Uma injeção diária (i.p.) de AMPH 0,25 mg/kg nos primeiros 7 dias; Duas injeções diárias (i.p.) de NaCl 0,9% nos 8 dias seguintes.	Hiperlocomoção, caracterizando mania aguda.
AMPH+ VPA	Uma injeção diária (i.p.) de AMPH 0,25 mg/kg nos primeiros 7 dias; Duas injeções diárias (i.p.) de VPA 250 mg/kg nos 8 dias seguintes..	A hiperlocomoção observada nos primeiros 7 dias é abolida após o tratamento com VPA

[a]Sal: grupo de animais tratados com solução de NaCl a 0,9%; [b]VPA: grupo de animais tratados com valproato 250 mg/kg; [c]AMPH: grupo de animais tratados com anfetamina 2,5 mg/kg; [d]i.p.: injeção intraperitoneal.

3.6.5 Obtenção dos tecidos cerebrais

Após decapitação, as regiões cerebrais de interesse foram dissecadas em não mais que 2 min e mantidas provisoriamente em nitrogênio líquida. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80 ºC até as análises posteriores.

3.7 Testes comportamentais

3.7.1 Habituação

Cada animal foi levado para a sala de testes afim de ser habituado às condições experimentais. Lá, o animal foi posto em contato com o experimentador e, em seguida, foi colocado em uma gaiola de acrílico com serragem no assoalho onde permaneceu por 30 minutos.

3.7.2 Habituação ao Campo Aberto (*Open-Field Task*)

O teste do campo aberto (*open-field*) foi concebido para medir respostas comportamentais tais como a atividade motora, a hiperatividade e comportamentos exploratórios (CRAWLEY, 2008). Embora ainda seja de difícil definição, o termo "atividade exploratória" é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade uma vez que esse

comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como a autolimpeza corporal (*grooming*), defesa e reações sexuais.

O teste foi realizado em um campo "aberto" de 40 x 60 cm delimitado por quatro paredes com 50 cm de altura, sendo três de madeira e uma de vidro transparente. O piso da caixa é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas (Figura 18). Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de "*rearings*" foram avaliados em ambas sessões. *Crossing*: atividade motora, *Rearings*: atividade exploratória.



Figura 18. Habituação ao Campo Aberto.

3.7.3 Memória de Reconhecimento de Objetos

Este teste foi empregado para avaliar a memória de longa duração e, para sua realização, usa-se o *Open Field* cuja descrição já foi relatada anteriormente. No primeiro dia realizou-se o treino, onde o animal foi colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, e foi permitido explorar o ambiente por 5 minutos. O primeiro dia serviu como habituação do animal. No segundo dia o animal foi recolocado no aparelho, no qual estiveram dois objetos iguais, objeto X e objeto Y (forma, tamanho e cor), contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (X e Y). No dia seguinte (24 horas após) avaliou-se a memória de longa duração. O animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto X) e o novo objeto (objeto Z) e conta-se novamente o tempo total que o animal explora cada objeto (Figura 19).

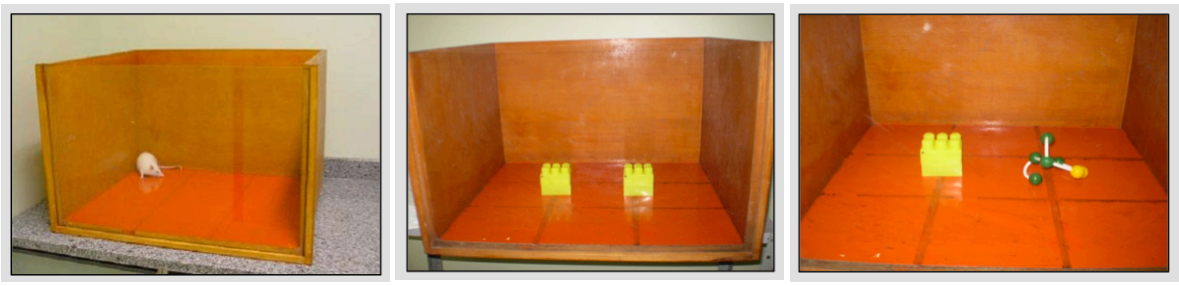


Figura 19. Memória de reconhecimento de objeto.

3.8 Cultura de Células

3.8.1 Cultivo

As células foram mantidas em frascos ou placas contendo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* com alta concentração de glicose (*DMEM-High Glucose*) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de soro fetal equino (SFE) para células PC12, ou apenas 10% de SFB para células da linhagem HEK 293. Em ambos os meios de cultura, solução antibiótica-antimicótica penicilina/estreptomicina foi acrescentada. As células foram mantidas em incubadora à temperatura controlada de 37 ^{o}C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 para manutenção do pH próximo ao fisiológico. Todos os procedimentos do cultivo se realizaram em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura a serem utilizados. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de fase Axiovert 25 (Carl Zeiss) e o meio de cultura trocado conforme a necessidade de cada linhagem celular. Todos os reagentes citados foram obtidos da Life Technologies (Carlsbad – EUA) ou da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis – EUA).

3.8.2 Subcultivo

Após ocuparem entre 70% e 80% do frasco ou placa, o que se denomina confluência, as células PC12 foram subcultivadas, utilizando, para tanto, solução de tripsina a 0,05% (Thermo Fisher Scientific, Waltham – EUA) em PBS (solução salina tamponada pH 7,2 composta por NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2PO_4 8 mM e KH_2PO_4 1,5 mM) contendo 1 mM de EDTA para que em cinco minutos a 37 °C, a monocamada celular fosse liberada (tendo sido a cultura previamente lavada uma vez com solução de PBS). A tripsina foi

inativada com o soro fetal bovino contido em uma nova alíquota de meio de cultura. Diferente de células PC12, a monocamada de células HEK 293 foi facilmente separada por pipetagens repetitivas. As células em suspensão foram contadas utilizando câmara de Neubauer e alíquotas da suspensão foram distribuídas em novos recipientes de cultivo contendo o meio de cultura apropriado, e novamente levadas de volta à estufa, onde cada procedimento deste deu origem a uma nova passagem de linhagem celular.

3.8.3 Congelamento

O meio de cultura foi removido por aspiração, a monocamada celular lavada com PBS, tripsinizada (para PC12), ressuspendida em 1,5 ml de meio de cultura e centrifugada a 600 x *g* por três minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em 1 ml de meio de cultura contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA) estéril de modo que a concentração celular estivesse entre 1-2 x 10^6 células/ml. Esta suspensão de células foi incubada por 24 h a -80 °C. Após este período, a ampola foi transferida para o reservatório de nitrogênio líquido.

3.8.4 Descongelamento

A ampola contendo a cultura de interesse foi retirada do nitrogênio líquido e colocada em banho a 37 °C. Logo que o conteúdo da ampola ficou líquido, homogeneizou-se a suspensão de células cuidadosamente e, transferiu-se a suspensão para frascos ou placas de cultivo contendo meio de cultura apropriado. Em seguida a cultura foi incubada de acordo com as condições padrões de cultivo até que as células aderissem. Assim que as células aderiram, o meio de cultivo foi trocado de maneira que as células tivessem permanecido o

menor tempo possível em contato com o DMSO já que este é tóxico para as mesmas.

3.8.5 Obtenção para experimentação

Após ocuparem 80% do frasco ou placa, a monocamada celular foi separada como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo de ensaio estéril e centrifugadas a 600 x *g* por três minutos a 4 °C. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspendido em soluções apropriadas de acordo com o experimento.

3.8.6 Tratamento farmacológico

Células PC12 ou HEK 293 foram tratadas com fármacos de interesse por tempo e concentrações de acordo com a literatura científica e padrões experimentais internos. As células foram utilizadas para posteriores análises de expressão de proteínas, RNAm e viabilidade celular após exposição a diferentes condições. Após ocuparem 80% do frasco ou placa, o meio de cultura foi removido e cuidadosamente substituído por um novo contendo os compostos a serem testados ou seus respectivos veículos para o controle experimental. Em seguida, as placas foram levadas de volta para a estufa e lá permaneceram pelo tempo determinado de acordo com experimentação.

3.8.7 Transfecção

Utilizou-se células HEK 293 ou PC12 para inserir plasmídeos por eletroporação. Cerca de 3 x 10^6 células de uma cultura plaqueada 20 h antes (placas de 100 mm^2), com 80% de confluência, foram centrifugados a 600 x *g* por cinco minutos a 4 °C. Em seguida, o precipitado de células foi lavado em PBS estéril por duas vezes. Após o precipitado celular ser ressuspendido em 800 μL de PBS, adicionaram-se cerca 10 μg do plasmídeo num volume não superior a 40 μL. Exclusivamente para o plasmídeo βGal-CMV, utilizou-se 0,5 μg de DNA. Após a adição do DNA plasmidial, as células foram submetidas a eletroporação com um pulso de 20 ms a 200 V (HEK 293) ou 300 V (PC12) em cubetas especializadas de 0,8 mm (Bio-Rad, Hercules – EUA) previamente resfriadas a 4°C. As células foram eletroporadas no sistema Bio-Rad Gene Pulser modelo II (Bio-Rad, Hercules – EUA). Logo após o pulso, o conteúdo foi imediatamente transferido para uma placa de cultura pré aquecida contendo meio de cultura completo. As células foram incubadas a 37 °C por 48 horas para expressão do gene de interesse codificado pelo plasmídeo.

3.9 Avaliação da Viabilidade Celular

Os testes de viabilidade foram utilizados para avaliar os efeitos dos fármacos sobre a sobrevivência celular ou para avaliar o efeito protetor do pré-tratamento com os compostos testados em células expostas ao H_2O_2. Neste último, as células PC12 foram tratadas com fármacos e em seguida foram expostas a uma concentração de H_2O_2 capaz de diminuir a viabilidade celular em cerca de 50% em um período de 24 h. Em seguida, dois métodos foram utilizados para avaliar a viabilidade celular: MTT e marcação com Hoechst 33342.

3.9.1 Teste do MTT

O MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de amarelo para um composto róseo escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória e, indiretamente, a quantidade de células viáveis em cultura. O MTT diluído em PBS foi adicionado a cultura celular para uma concentração final de 0,5 mg/ml e incubado em estufa de cultura durante 3 horas até à formação de cristais violetas de formazan. Em seguida, adicionou-se propanol-2 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA) para dissolução destes cristais e as placas foram agitadas vigorosamente para acelerar a solubilização. O conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços e lidos em não mais do que 1 hora no espectrofotômetro de microplacas Victor™ X4 (Perkin Elmer, Inc., Whaltam – EUA) no comprimento de onda de 595 nm. A viabilidade celular foi expressa em percentagem relativamente à absorbância determinada nas células da situação controle.

3.9.2 Marcação com Hoechst 33342

O cultivo celular foi realizado em placas de 6 poços, contendo uma lamínula previamente autoclavada. Após decorrido o tempo de tratamento, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS gelado e foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA) por 20 minutos em temperatura ambiente. As células fixadas foram novamente lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos e em seguida foram incubadas por 30 minutos com o corante *Hoechst* 33342 a uma concentração final de 5 μM. Como controle de marcação específica, algumas lamínulas não foram incubadas com *Hoechst* 33342. As

lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem *Vectashild* (Vector Lab, Burlingame – EUA) e as imagens das células foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha). A análise da viabilidade celular foi feita através de análise da morfologia e marcação nuclear. Nesta marcação fluorescente, células em processo de morte apresentam núcleos menores com maior intensidade de fluorescência devido à condensação e fragmentação da cromatina, enquanto que o núcleo de células viáveis apresenta uma fluorescência azul difusa. Com o objetivo de comparar as taxas de viabilidade no grupo controle com as taxas do grupo exposto aos fármacos, fez-se necessário a determinação do índice de células apoptóticas. Para isto foram contadas, em três campos escolhidos de forma aleatória no microscópio, o número total de células presentes e o número de células em apoptose. Com isto obteve-se a porcentagem de células apoptóticas em cada condição experimental.

3.10 Western Blot

3.10.1 Extração de proteínas totais de células e tecidos

Para linhagens celulares, o meio de cultura foi aspirado e a camada celular foi cuidadosamente lavada duas vezes com PBS a 4 °C. Foi adicionado então PBS em quantidade suficiente para cobrir a superfície da placa e, com a ajuda de um removedor, as células foram raspadas delicadamente e transferidas para tubos cônicos de 15 ml gelados. As células foram coletadas centrifugando-se por 3 minutos à 800 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em cerca de 100 e 200 μL do tampão de lise contendo um coquetel de inibidores de protease (AEBSF 104 mM; aprotinina 80 μM; bestatina 4 mM; E-64

1,4 mM; leupeptina 2 mM e pepstatina A 1,5 mM) adicionado de fluoreto de sódio 50 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e 1% Triton X100 e a seguir sonicadas em gelo no equipamento Vibra-Cell™ (Sonics & Materials, Inc., Newtown – EUA) a uma amplitude de 20-30% para que ocorresse a lise celular. Para os tecidos cerebrais, dois protocolos de homogeneização foram utilizados. Um foi baseado na sonicação dos tecidos em tampão de lise gelado contendo inibidores de proteases e fosfatases (previamente citado). O outro protocolo foi baseado na maceração dos tecidos em SDS 1% previamente aquecidos a 96 °C e mantidos por 5 minutos a 96 °C para completada ação detergente do SDS. Após homogeneização, em ambos os casos, os lisados foram centrifugados à 20.000 x *g* por 10 minutos para remoção de debris celulares e teciduais. Alíquotas de cada lisado foram submetidas à quantificação de proteínas (descrito logo a seguir) e mantidas a -80 °C até as análises posteriores. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA.

3.10.2 Quantificação de proteínas

A quantificação protéica foi realizada como descrita no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Entre 1,0 e 2,0 μL de extrato protéico foi adicionados ao reagente de Bradford (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA) em microplacas de 96 poços. Após a homogeneização, a mistura foi levada para leitura das absorbâncias no leitor de microplacas Victor™ X4 (Perkin Elmer, Inc., Whaltam – EUA) no comprimento de onda de 595 nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina sérica bovina (0,2 a 2,0 μg) foi utilizada como padrão.

3.10.3 SDS PAGE

Quantidades iguais de proteína (25-50 μg) foram preparadas para eletroforese com tampão de amostra desnaturante 2x (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS 4% m/v; glicerol 20% v/v; β-mercaptoetanol 10% v/v; azul de bromofenol 0,2% m/v). Após incubação a 70 °C por 10 minutos, as amostras foram aplicadas em gel Bis-Tris NuPAGE 4-12% (Life Technologies, Carlsbad – EUA) para eletroforese. Em seguida foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose Hybond (Amersham Biosciences, Amersham, Reino Unido) com tampão apropriado (glicina 39 mM; Tris.HCl 48 mM; metanol 20%; pH 8,3) e coloração com Ponceau S (0,1% ponceau m/v; 10% ácido acético glacial) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA).

3.10.4 Imunodetecção

Antes da incubação com os anticorpos, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4) contendo 5% de albumina sérica bovina e 0,1% Tween 20 por 60 minutos a temperatura ambiente (TA). Em seguida, as membranas foram incubadas overnight a 4 ^{o}C com anticorpos primários de interesse (Tabela 6). Após a incubação em anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBST (TBS + 0,1% Tween 20) três vezes e incubadas com anticorpo secundário específico por uma hora em temperatura ambiente. Após três novas lavagens em TBST, as membranas foram submetidas à detecção de imunoreatividade por dois diferentes métodos ao longo do estudo. Primeiramente, quimioluminescente conforme instruções do kit *ECL Plus* (GE, Fairfield – EUA), e visualizadas no equipamento *ImageQuant 400* (GE, Fairfield – EUA). Bandas imunorreativas não saturadas foram submetidas à varredura densitométrica e a quantificação pelo programa

Image J (*National Institutes of Health*, EUA). O segundo método foi baseado na detecção de anticorpos secundários com emissão fluorescente no infravermelho. Após serem incubadas com os anticorpos secundários apropriados, as membranas foram submetidas a detecção e análise densitométrica através do equipamento *Odissey infrared imaging system* (LI-COR Biosciences, Lincoln – EUA). Em ambas as técnicas, os valores obtidos foram corrigidos pelos valores da actina ou tubulina.

Tabela 6. Anticorpos utilizados pelo estudo.

Anticorpo	**Catálogo**	**Fornecedor**
Anti-Ncs1(FL-190)	#sc-13037	*Santa Cruz Biotechnology*
Anti-Actina (clone C4)	#MAB1501	*Millipore*
Anti-Tubulina (clone TU-20)	#MAB1637	*Millipore*
Anti-Erk 1/2 (137F5):	#4695	*Cell Signalling Technology*
Anti-pErk 1/2 Thr202/Tyr204 (E10)	#9160	*Cell Signalling Technology*
Anti Gsk3β (3D10)	#9832	*Cell Signalling Technology*
Anti pGsk3β Ser9 (5B3)	#9323	*Cell Signalling Technology*
Anti Gsk3α (D80E5)	#4337	*Cell Signalling Technology*
Anti pGsk3α Ser21 (27E5)	#5090	*Cell Signalling Technology*
Anti Gsk3 α/β (D75D3)	#5676	*Cell Signalling Technology*
Anti pGsk3 α/β Ser 21/9 (37F11)	#9327	*Cell Signalling Technology*
Anti β-Catenina	#9562	*Cell Signalling Technology*
Anti Akt1 (C73H10)	#2938	*Cell Signalling Technology*
Anti- IgG camundongo IR 680	#5470	*Cell Signalling Technology*
Anti- IgG camundongo IR 800	#5257	*Cell Signalling Technology*
Anti- IgG coelho DyLight® 680	#5366	*Cell Signalling Technology*
Anti- IgG coelho DyLight® 800	#5151	*Cell Signalling Technology*
Anti-IgG-HRP coelho	#7074	*Cell Signalling Technology*
Anti-IgG-HRP camundongo	#7076	*Cell Signalling Technology*

3.11 Análise da Expressão Genética

A análise de expressão do gene *NCS-1* através dos níveis de RNAm (RNA mensageiro) foi feita através da metodologia RT-PCR (transcriptase reversa por reação de em

cadeia da polimerase). O RNA foi extraído com Trizol® (Life Technologies, Carlsbad – EUA) a partir de células em cultura ou tecidos cerebrais homogeneizados, sintetizado a cDNA e em seguida amplificados em tempo real com SYBR® Green utilizando primers específicos em um equipamento apropriado para detecção de fluorescência.

3.11.1 Extração de RNA

RNA de diferentes tecidos ou culturas de células foram extraídos utilizando o reagente Trizol® seguindo o protocolo do fabricante com mínimas modificações. Para células, o meio de cultura foi removido e a camada celular foi rapidamente lavada duas vezes com PBS a 4 ^{o}C e o preciptado celular foi obtido conforme previamente explicado. Em seguida, 300 μL de Trizol® foi adicionado e a solução permaneceu em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente para a completa lise e dissociação de complexos formados por RNA e proteínas. Para os tecidos cerebrais, dois protocolos de homogeneização tecidual foram utilizados. Estes foram baseados em sonicação ou maceração na presença de Trizol®. Em ambos os casos, assim como para células, a solução permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 5 minutos após homogeneização para a completa lise e dissociação de complexos formados por RNA e proteínas. Em seguida, adicionou-se 60 μL de clorofórmio em cada tubo contendo o homogeneizado dissolvido em Trizol® e foi feita uma vigorosa homogeneização em vórtex. Após centrifugação a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4 ^{o}C, transferiu-se a fase aquosa da mistura contida na parte superior para outro tubo contendo 150 μL de isopropanol (normalmente, 50% do volume inicial de Trizol® utilizado). Novamente, incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4 ^{o}C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e redissolvido em 30 μL de água-DEPC.

3.11.2 Quantificação de RNA total

Uma vez isolado, o RNA foi diluído 1:100 (RNA:TE) em cuvetas de quartzo e quantificado através de espectrofotometria (Ultrospect 2100 pro, Amersham Biosciences, Amersham, Reino Unido) medindo-se a absorbância a 260 e 280 nm, no qual um valor de A260 = 1,00 equivale a 40 μg/ml de RNA. A relação A260/A280 também foi determinada para se estimar o grau de pureza do RNA, sendo utilizado o valor entre 1,8 e 2,0 como ideal. Em seguida o RNA foi estocado e mantido a -80 °C.

3.11.3 Eletroforese do RNA

Cerca de 1 μg de RNA foi separado em eletroforese de gel de agarose 1,0 % para visualização da integridade do mesmo para controle de qualidade antes das reações de síntese de cDNA (DNA complementar). Os parâmetros da corrida eletroforética seguiram os mesmo padrões previamente explicados, a exceção de que, tanto a cuba quanto o tampão de corrida TBE (5X : 446 mM Tris-Base; 445 mM ácido bórico; 10 mM EDTA; pH 8,0) foram utilizados exclusivamente para RNA.

3.11.4 Reação da transcriptase reversa (síntese de cDNA)

Após diluição do RNA para 1 μg em 7,1 μL de água-DEPC, foi realizado o tratamento enzimático com DNAse I para eliminar possíveis contaminações do RNA com DNA genômico. Para tal, o meio reacional consistindo de tampão e DNAse I livre de RNAses (New England Biolabs, Ipswich – EUA) foi adicionado as amostras como indicado pelo fabricante. As reações foram incubadas a 37 °C por 10 min. Após o fim da reação, no intuito de inativar a DNAse I, 1 μL de EDTA 50 mM foi adicionado a cada tubo reacional (obtendo concentração

final de 5 mM) e, em seguida, estes foram transferidos novamente para o termociclador para reação a 75 °C por 5 min. O cDNA foi sintetizado a partir dos 10 µL da solução tratada com DNAse I. Além das amostras, incluíram-se os controles negativos "RT-", no qual a mistura da reação é desprovida da enzima transcriptase reversa, e "NTC", o qual não possui RNA. As condições de reação para esta síntese foram as indicadas no protocolo do kit comercial *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Life Technologies, Carlsbad – EUA), no entanto, foi utilizado um volume final de 20 µL.

3.11.5 qPCR

Após síntese do cDNA, os seguintes primers mostrados na Tabela 7 foram desenhados utilizando o software online e gratuito *Primer-BLAST* para avaliar os níveis de expressão de RNAm.

Tabela 7. Primers utilizados no qPCR.

Gene	Primer F[c]	Primer R[d]	Genoma
NCS-1[a]	GCCGCCGAGGATGGGGAAATC	AGCTTGAAGGCCCACCGTAGC	Humano
	GCAGTGGTACAAGGGTTTCA	CCGATAGAGCCTGGATGAAT	Rato
	AAGCCTCGGACTTTGAGACA	CTGGACCACACCCCTAAAGA	Camundongo
BACT[b]	GCACAGAGCCTCGCCTTTGCC	CATGCCCACCATCACGCCCTGG	Humano
	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	Rato ou Camundongo

[a]*NCS-1*: sensor neuronal de cálcio tipo 1; [b]*BACT*: actina beta; [c]F: forward; [d]R: reverse

Para amplificação do cDNA, foi realizada uma PCR em tempo real com *SYBR® Green* normalizado pela fluorescência ROX. O protocolo recomendado pelo kit comercial

Brilliant™ SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, Santa Clara – EUA) foi seguido com modificações mínimas no termociclador com leitura de fluorescência MX3005P (Stratagene California, La Jolla – EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 ^{o}C por 3 minutos, desnaturação a 95 ^{o}C por 30 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 ^{o}C por 30 segundos. Cada amostra foi feita em quadriplicata biológica, usando também triplicata de poços. Como controle negativo para a reação de PCR em tempo real foram utilizados poços que continham a mistura da reação e os primers, mas ausência de cDNA, além dos controles RT- e NTC. No final de cada reação foi realizada uma curva de dissociação para avaliar a especificidade de amplificação. As possíveis variações na concentração inicial de RNAm entre as amostras foram calculadas através da normalização do gene constitutivamente expresso da actina beta (*BACT*). Para análise da expressão gênica, foi aplicado o método compartivo Delta-Delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔC_T de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_T (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene controle (*BACT*) dos valores de C_T do gene alvo. Após determinação do ΔC_T da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA de células cultivadas ou animais tratados com o veículo de diluição dos fármacos (grupo controle). Para o cálculo do $\Delta\Delta C_T$ utilizou-se a seguinte fórmula: [ΔCT (amostra) – ΔCT (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_T$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

3.12 Estudo da regulação transcricional do gene *NCS-1*

O promotor é uma seqüência de DNA reconhecida pelo aparato de transcrição, que após ligação, indica a sequência a ser lida e a direção da transcrição. Até então não existe nenhuma referência sobre a localização da região promotora do gene *NCS-1* em vertebrados.

Sendo assim, no intuito de avaliar o potencial regulatório das regiões adjacentes ao sítio de início de transcrição (TSS; *transcription start site*) do gene *NCS-1* humano (NM_014286.3; ENSG00000107130), um sistema de gene repórter com luciferase foi desenvolvido. Insertos candidatos a conter a região promotora foram isolados por PCR e artificialmente inseridos em plasmídeos pGL4.10[luc2]. O monitoramento da indução da expressão da luciferase codificada no plasmídeo, a qual reflete a habilidade da seqüência regulatória inserida em promover a transcrição, foi utilizada como parâmetro para avaliar o potencial regulatório dos insertos.

3.12.1 Seleção da região candidata a promotor do gene *NCS-1*.

Uma das maiores dificuldades na identificação de uma região no DNA que contém elementos reguladores dos níveis de expressão genética é definir a sua localização exata no genoma. Ao contrário de procariotos, cujo o promotor normalmente encontra-se imediatamente antes do sítio de início da transcrição, em mamíferos esta região pode ser encontrada muito mais distante, na ordem de alguns kb (1.000 pares de bases, pb). No entanto, a estratégia de considerar regiões proximais como ponto de partida em estudos ainda é amplamente utilizada, mostrando-se eficaz (CURK *et al.*, 2009; TRINKLEIN *et al.*, 2003). De fato, a maioria dos promotores descritos em humanos estão localizados em uma região imediatamente anterior ao sítio de início da transcrição, também conhecida como "5' *upstream*". Um determinado local dentro desta região é designado com um valor negativo (-), que representa a quantidade de pares de bases (pb) antes do TSS. Presumidamente, valores positivos (+) designam posições gênicas após o TSS. Alia-se a esta estratégia o estudo da estrutura genômica local, uma vez que, com frequência, na região promotora encontram-se elementos *cis* (sequências de nucleotídeos específicos que são reconhecidas e servem para ligação de fatores de transcrição) e também as sequências consenso, como TATA, CAAT box

e ilhas de CpG (CpG *islands*). Uma vez reunidas tais características, uma região candidata configura-se ter alta probabilidade de conter o promotor pesquisado. Para este estudo, estes princípios foram utilizadas para definir as regiões candidatas a promotor do gene *NCS-1*, e a descrição detalhada da estratégia utilizada durante seleção é apresentada nos parágrafos seguintes.

A primeira pergunta feita foi qual seria a possível distância que o candidato a promotor poderia estar do TSS do gene *NCS-1*? Levando em consideração que a região intergênica 5' *upstream* que separa os genes *NCS-1* e *GPR107* é de 32,409 kb, essa foi uma pergunta muito improvável de ser respondida (Tabela 8).

Tabela 8. Posição da região intergênica entre *NCS-1* e *GPR107*.

Gene	Fim da transcrição	Início da transcrição	Tamanho da região intergênica
GPR107[a]	9:132,902,448	-	32,409kb
NCS-1[b]	-	9:132,934,855	

[a]GPR107: *G protein-coupled receptor 107*; [b]*NCS-1*: sensor neuronal de cálcio.

A alternativa encontrada foi selecionar arbitrariamente cerca de 2 kb 5' *upstream* do TSS do *NCS-1* baseado no pressuposto de que a maioria dos promotores descritos na literatura encontram-se entre -1 e -1.000 pb. A alternativa de amplificar -2.000 pb, tal como foi feita, seria razoavelmente apropriada baseando-se em nossas limitações técnicas. Como previamente exposto, uma região genômica considerada "promotor" é caracterizada pela presença de elementos *cis* e sequências de consenso. No intuito de aprofundar o conhecimento sobre a estrutura genômica da região -2.000 pb selecionada para estudo, diversas ferramentas de bioinformática foram utilizadas.

Primeiramente, a identificação de elementos *cis* foi determinada levando em consideração 80% de homologia entre os motivos e com 95% de confiança estatística através da plataforma online e gratuita NSITE[1], desenvolvida pela *SoftBerry*. Foram encontrados 60 potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição (FT) em -2.100 pb 5' *upstream* ao TSS do *NCS-1*. Interessantemente e indo de encontro com a hipótese do estudo, alguns dos sítios de ligação encontrados correspondem a FTs regulados por Gsk3 e MAPKs os quais são indicados na sequência mostrada na Figura 20.

Em seguida, o software HCtata[2] foi utilizado para predição de TATA *box*, sequências nucleotídicas acreditadas determinar o sítio de ligação da RNA polimerase II. De acordo com o parâmetro interno mais restringente do programa, três TATA *boxes* foram identificadas (GAGATGAGGT, TTTCTAAAGG e AGTATGCTTA) (Figura 20). Outros elementos genômicos também considerados importantes para início da transcrição são as "Ilhas CpG". Estas regiões são ricas em citosina (C) e guanina (G) (geralmente acima de 50% dos nucleotídeos da região) e estão localizadas quase sempre na extremidade 5' *upstream* do gene, geralmente na região do promotor e, algumas vezes, se estendendo ao primeiro éxon. O programa EMBOSS CpGPlot[3] mostrou que quanto maior a aproximação do início do TSS do gene *NCS-1*, maior é o conteúdo de C e G computando porcentagens de até 80% (Figura 21 A e B). Utilizando os parâmetros padrões internos de análise, identificou-se através do programa uma região de 575 pb (-54 pb a -628 pb) como sendo a ilha de CpG mais próxima do TSS do *NCS-1* dentro do *input* de -2100 pb (Figura 21 C).

[1] Disponível online em: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=nsite&group=programs&subgroup=promoter> [Acessado em 05/04/2012].

[2] Disponível online em: http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata.html [Acessado em 05/04/2012].

[3] Disponível online em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/> [Acessado em 05/04/2012].

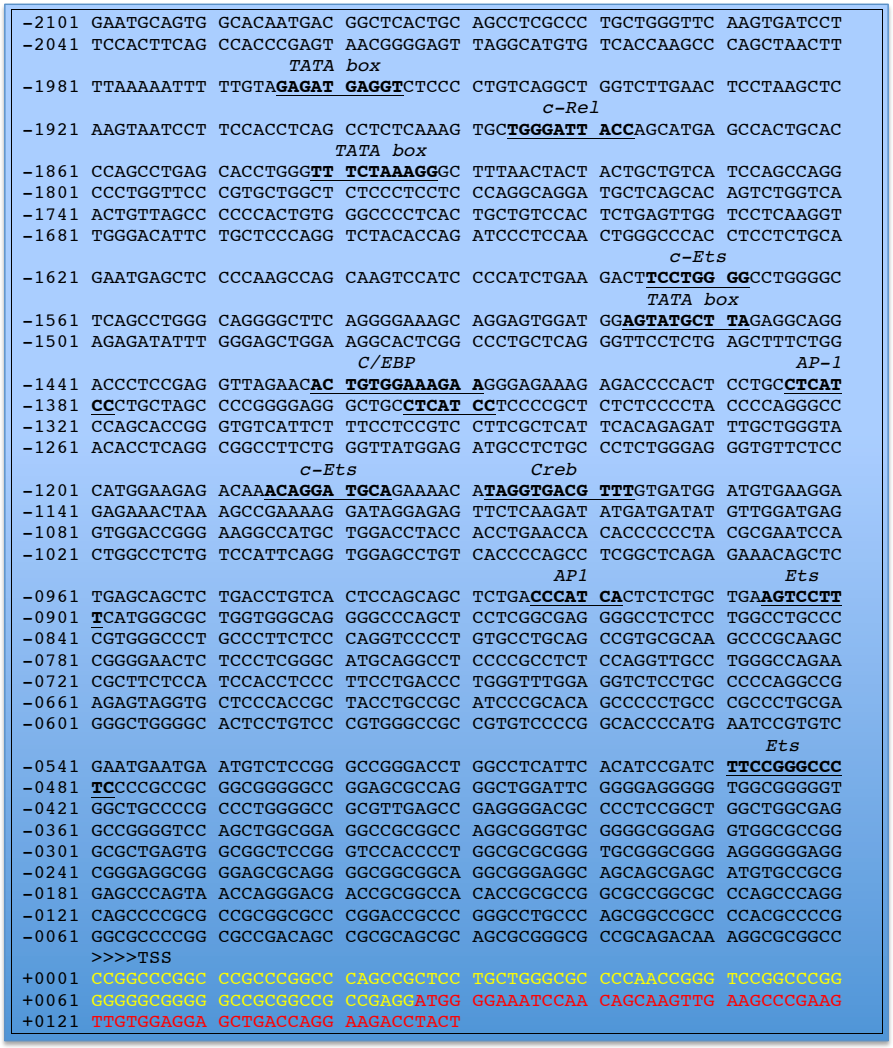


Figura 20.Sequência de -2.100 pb (GRCh37:9:132932757-132934978) 5' *upstream* ao TSS do *NCS-1.* As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição. As bases em amarelo correspondem a região não traduzida ou *untranslated region* "UTR" do éxon 1 do gene *NCS1*. As bases em vermelho, iniciadas pelo códon "ATG" correspondem a sequência codificante. c-Rel: proteína membro da família de fatores de transcrição NF-κβ; c-Ets, Ets: proteína pertencente a família de fatores de transcrição ETS; C/EBP: família de fatores de transcrição CCAAT-*enhancer-binding proteins;* AP-1: proteína ativadora 1; Creb: proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc.

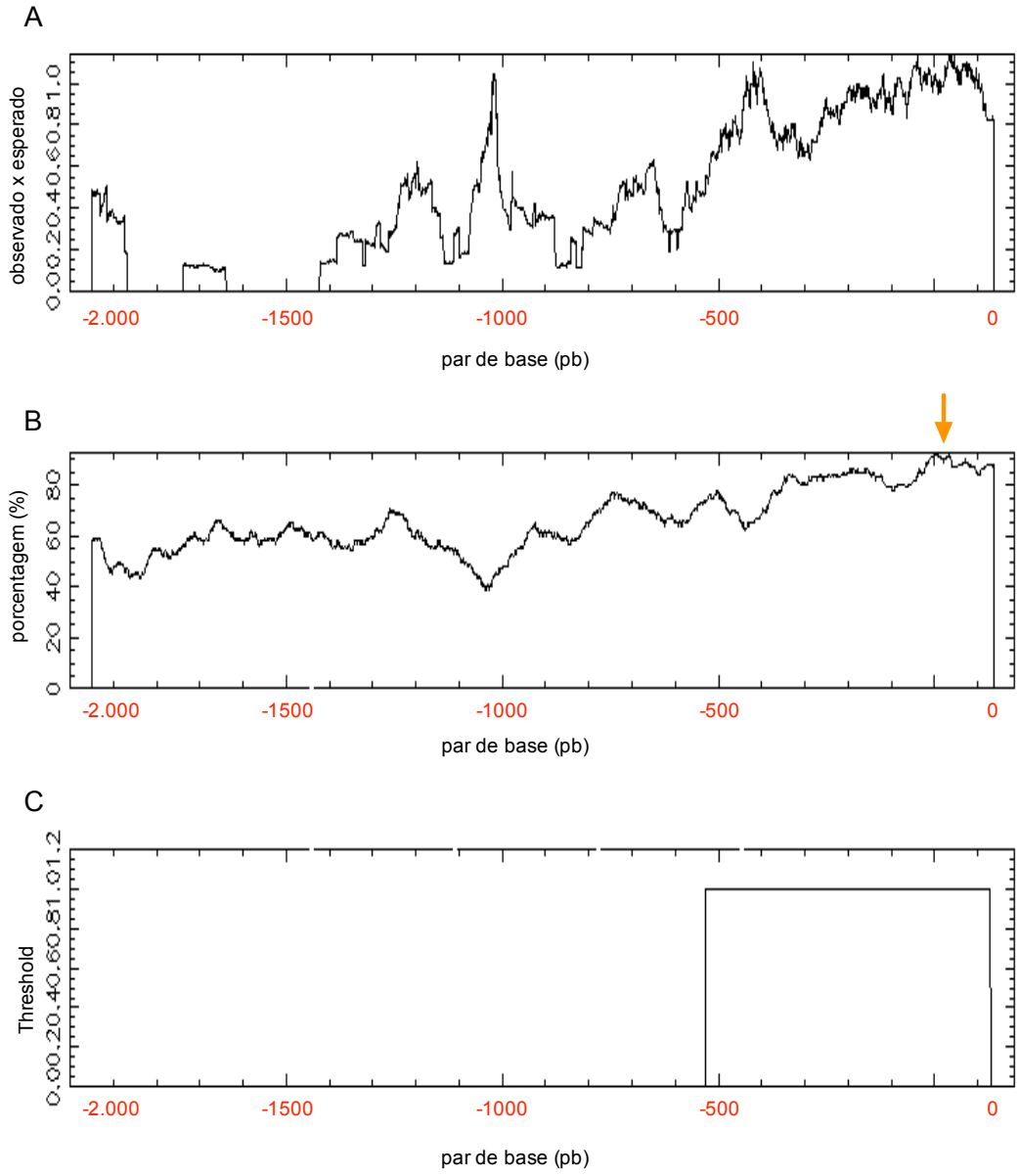


Figura 21. Predição de ilhas de CpG em -2.000 pb na extremidade 5' *upstream* do gene *NCS-1*. (A) De acordo com este resultado obtido no programa EMBOSS CpGPlot existe um conteúdo maior de nucleotídeos C e G quanto mais aproxima-se do início do gene *NCS-1*. A porcentagem de CpG chega a valores superiores a 80% na região com cerca de -200 pb 5' *upstream* do mesmo gene, como é indicado pela seta em B. Em C, é mostrado o sítio de CpG mais provável, o qual encontra-se numa região uma região de 575 pb, entre -54 pb e -628 pb 5' *upstream* do gene *NCS-1*.

Baseado nas análises efetuadas, este estudo julgou que a região que cobre cerca de 2.000 pb 5' *upstream* do TSS do *NCS-1* é de potencial interesse para objeto de estudo a candidato a promotor do gene *NCS-1* humano. Alguns estudos tem constantemente reportado que regiões genômicas localizadas no primeiro íntron exercem regulação sobre a atividade do promotor (CURK *et al.*, 2009). Interessantemente, o íntron 1 do gene *NCS-1* é o mais extenso, separando o éxon 1 (150 pb) dos outros sete éxons por exorbitantes 28.230 kb. Desta forma, também seria possível encontrar alguma região regulatória dentro do íntron 1 do *NCS-1*. No intuito de comparar o efeito de hipotéticos elementos reguladores contidos no íntron 1 com aqueles presentes na extremidade 5' *upstream*, um outro inserto de cerca de +1,5 kb cobrindo o início do íntron 1 também poderia ser considerado interessante para comparação de eficiência no sistema de gene repórter.

Em resumo, nossa estratégia partiu do estudo de cerca de -2.000 pb a +1.400 pb, uma região consistindo de cerca de 3.400 pb, como sendo candidata a conter elementos reguladores da transcrição do gene *NCS-1*. Também foi considerado acrescentar ao estudo dois insertos menores dentro da região 5' *upstream*, os quais seriam versões deletadas de um maior que cobriria todos os –2.000 pb 5' *upstream*. Sendo assim, neste estudo, foi comparada a performance de 4 insertos isolados a partir de regiões adjacentes ao TSS como candidatos a conter o promotor do gene *NCS-1*. Os insertos, ora batizados de Clone 1 (3.381 pb), Clone 2 (2.005 pb), Clone 3 (1.048 pb) e Clone 4 (588 pb) estão esquematizados na Figura 22.

Para fins de comparação nos experimentos funcionais, foi necessário obter insertos desprovidos de atividade regulatória e com tamanho aproximado aos obtidos naqueles isolados no gene *NCS-1*. Este controle é de suma importância para normalizar os efeitos de insertos de diferentes tamanhos inseridos no vetor pGL4.10. Para este estudo, foram gerados insertos amplificados a partir do último éxon (éxon 5) do gene humano *CKAMP44* (NM_001145204.2). Este gene é expresso especificamente no cérebro, e portanto, foram

utilizados como controles negativos. Tais insertos foram batizados de “controle clone x”, em que “x” representa 1, 2, 3 ou 4, ou seja, os insertos clonados do gene *NCS-1* de tamanho correspondente. Sendo assim ficou-se determinado que 4 insertos deveriam ser gerados, com tamanhos aproximados a 3.381 pb (controle clone 1), 2.005 pb (controle clone 2), 1.048 pb (controle clone 3) e 588 pb, referente ao controle clone 4.

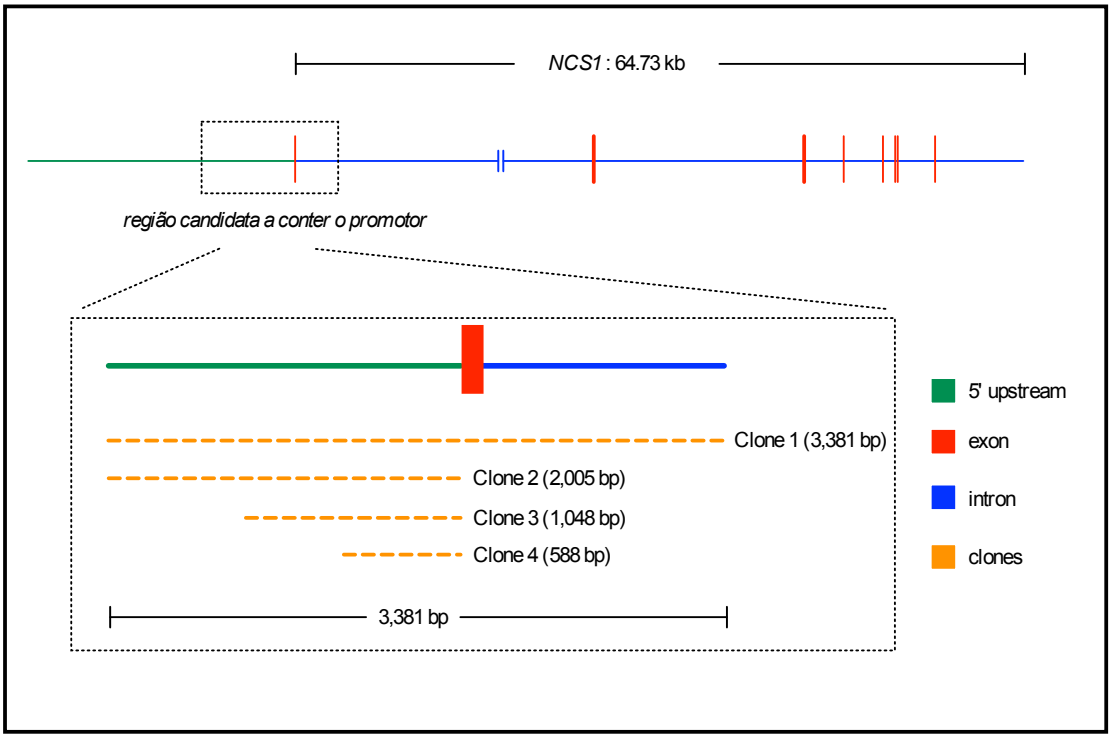


Figura 22.Esquema representando a estrutura genômica do gene *NCS-1* (superior) e dos clones utilizados como candidatos a promotor no estudo (inferior).

3.12.2 Vetor pGL4.10[luc2]

O pGL4.10 [luc2] é um vetor básico otimizado para alta expressão em células de mamíferos e com reduzida transcrição anômala (Figura 23). Este plasmídeo porta a sequência que codifica o gene repórter da luciferase (*Photinus pyralis*), no entanto, é desprovido de promotor. Com estas características, este vetor é considerado ideal para experimentos que envolvem estudos de sequências reguladoras da transcrição, como promotores. A funcionalidade de uma determinada sequência é avaliada inserindo-a na extremidade 5' do gene Luc, o qual passa ser transcrito no caso da sequência de nucleotídeos inserida possuir atividade regulatória. O conjunto plasmídeo e inserto também é conhecido como sistema de gene repórter. Além disso, este plasmídeo contêm uma origem de replicação (necessário à sua replicação em bactérias), o gene que confere resistência a ampicilina e múltiplos sítios de clonagem (MSC), que são vários locais únicos de clivagem para endonucleases de restrição, constituindo o sítio de inserção do candidato a promotor (Figura 24).

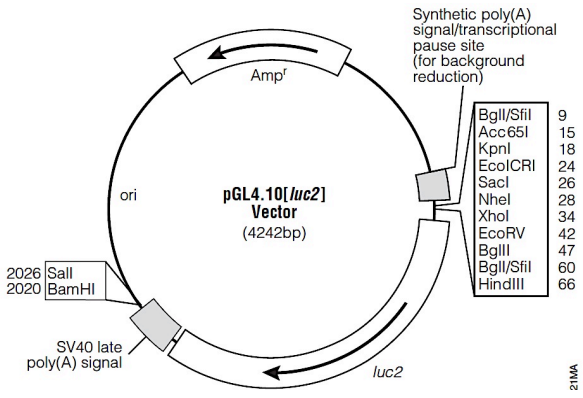


Figura 23. Plasmídeo pGL4.10[luc2]

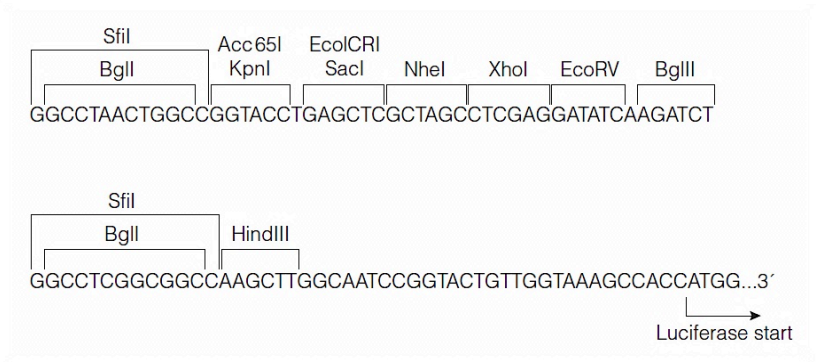


Figura 24. Múltiplos sítios de clonagem do plasmídeo pGL4.10[luc2].

3.12.3 Desenho dos primers para clonagem em plasmídeo repórter

As sequências dos *primers* foram obtidas utilizando os programas Primer 3[1] e Primer-BLAST[2]. Os parâmetros considerados foram: tamanho dos oligonucleotídeos (15 – 23 nucleotídeos), conteúdo de G/C em torno de 50% e temperatura de anelamento (60 ºC). Foi levado em consideração o anelamento que permitisse a amplificação de um fragmento de tamanho mais próximo possível dos almejados pelo estudo. A Figura 25 mostra os locais exatos de anelamento dos primers usados para amplificar os clones 1, 2, 3 e 4. Além disso, foram inseridos um poli A de quatro nucleotídeos (AAAA) e sítios de restrição na extremidade 5' de cada um deles de acordo com o MSC do vetor pGL4.10[luc2] (Tabela 9). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Alpha DNA (Montreal, Canada) e são mostrados na Tabela 10.

[1] Disponível online em: <http://frodo.wi.mit.edu> [Acessado em 02/05/2012]

[2] Disponível online em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome> [Acessado em 02/05/2012]

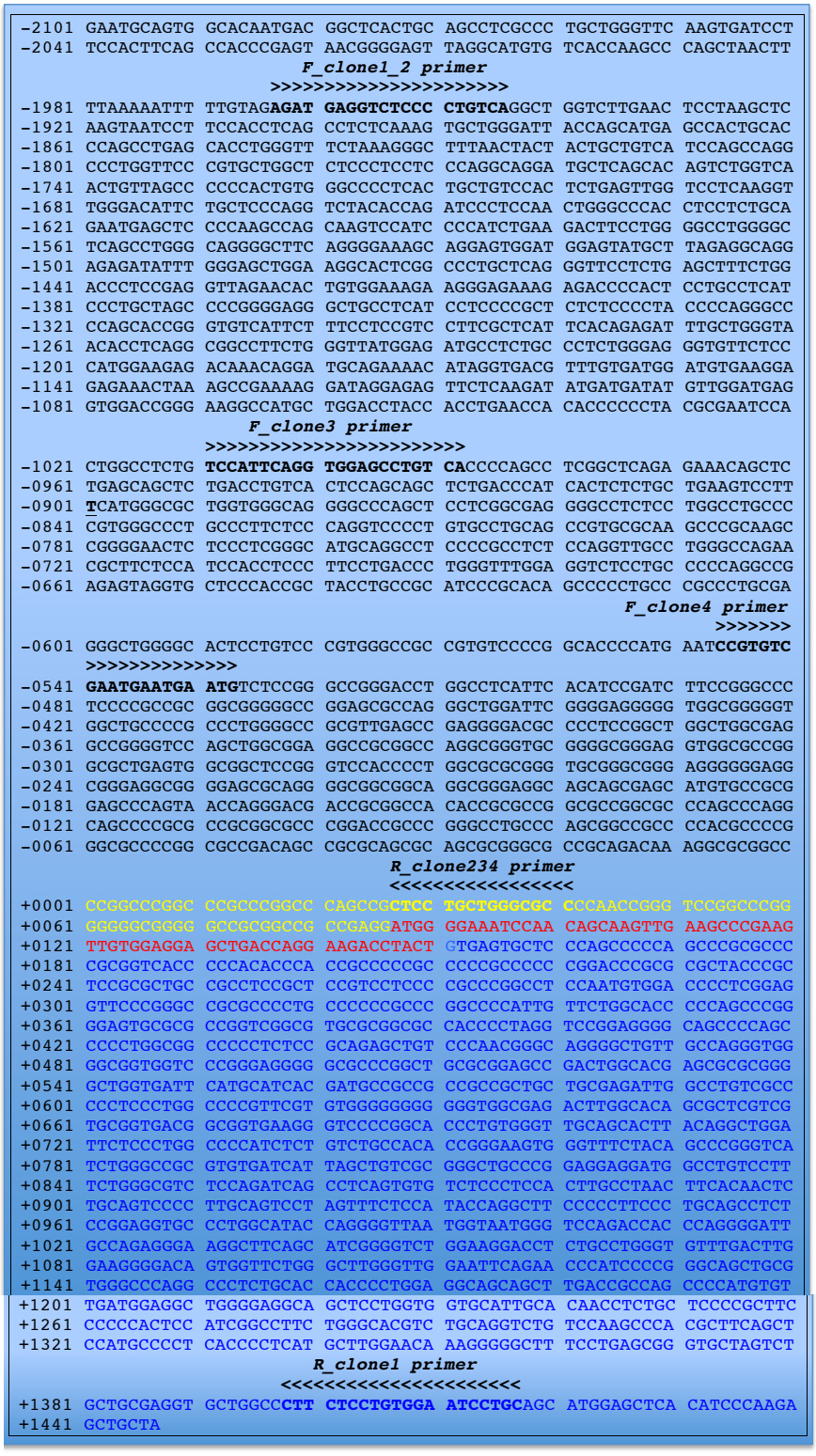
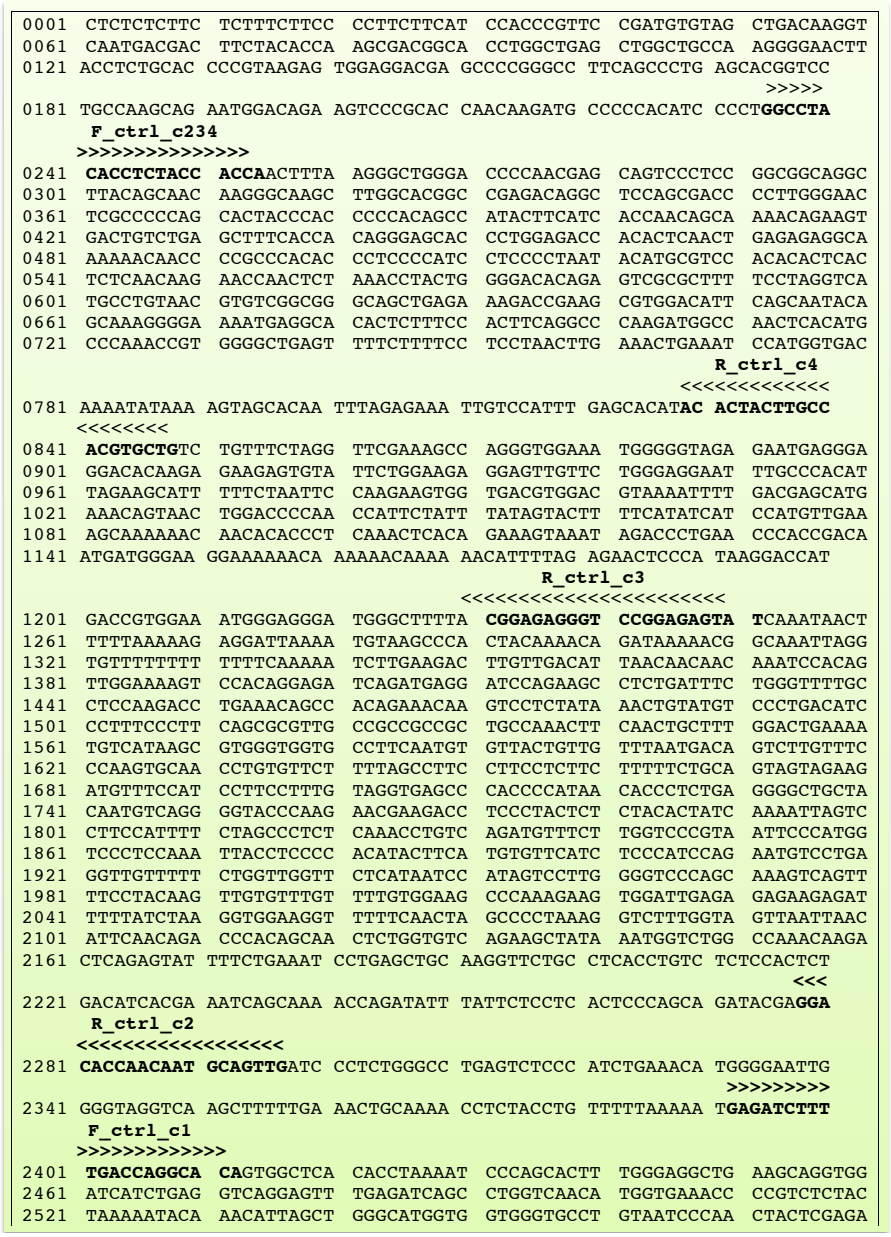


Figura 25. Anelamento de primers na sequência de GRCh37:9:132932757-132936303:1. As bases em preto representam a extremidade 5' *upstream*, as amarelas a região não traduzida "UTR" do éxon 1, as vermelhas correspondem a sequência codificante do éxon 1 e as azuis, o íntron 1 do gene *NCS-1* humano. As bases indicadas em negrito correspondem ao sítio de anelamento dos primers "F" (*forward*) ou "R" (*reverse*).



(continua na próxima página)

```
2581  GGCTGAGGCA  GGAGAATCGC  TTAAACTTGG  GAGGTTGCAG  TGAGCTGAGA  CCACACCACT
2641  GCCCTCTAGC  CTGGGTGACG  GAGTGAGACT  ATCTCAAAAA  AAAAAAAAAA  AAGAAAAAAA
2701  AAGAGATCTT  TCAAAGAACG  CATAATAGGA  GATCTCCATG  TATAAAAAGG  TACCATGCTG
2761  TACAAAGCTG  GGGTCAGAGA  TTTAGTGCCC  ACCTTCTCAG  CCTCCTTGGG  AAGACCCCAG
2821  AGCTTCCCAG  AGTCAAGTAA  ATACCACTGG  GCATGGTCAG  AGTTTCCTTG  ACGTTAATGA
2881  GCTATGTACC  TGCAACACAC  TTTGGCATCT  CTGTATATCA  CCTTCACAAT  ATTTGTATCT
2941  AAATTGATTC  ATTTTAATGC  ATTTTGTTTT  TAAAATGAAA  ACTTCCTGTC  TTCATCACAA
3001  ATTTAAAAAA  AATCATCAGT  TGCCATAAAT  AGAAAGCAAA  CATAAAAATA  AGTACAAAGG
3061  AAACAAGCAG  CGATGATTAA  ATTCCAGCTG  GAGTCTGTTG  TCTGTGAGTC  TGAACTAAAG
3121  CCTGGGGTTC  TTTCTTTCTC  TCTCCATCTC  TCTGTTTCTG  TTTCTCTCTC  TCTCTTAAAA
3181  TGATATCATC  AGGTATTAAA  TAATTGTTAA  AAATACCAGC  ACCCAATGAA  GACTTTCTCT
3241  TTGTACTAAT  AAGATGGACC  AAAAAGTAAA  TGAAAGGGGA  ATCATTTCCT  ATGCAAGTCA
3301  GTGTTGAACA  ATGCTGTAGC  TATGTACTGC  CTATGATCAT  TGTGCATACA  CTAGGGGTGC
3361  ATAGCCCACA  CTTCAGAAAA  CCCTGGGTTG  ACTTATCTGT  GAGGCTCTTT  CCAGCTCAAA
3421  GTTTCCATAA  TTCTTATCTC  CCTTTTACCT  CGTGGTTGCT  CTTTGCCCCC  AGTCCACTTC
3481  GTCCCACCCT  TATCTCAACT  CTGATTAAGA  GTCTTTCTTG  GCCTCTAAAT  CTGTAGTATT
3541  GTATTCCTTC  TGCATGCTCC  TTCTCCTCTG  AATAAACTTC  ATCAATTGAA  CTGGGCTCCT
3601  TGGGGTCTGC  AGTTGTAATT  TTGGCAGCAA  AGGTGCAGAC  TGGTCATTAA  GATGTAGCCA
3661  CAATGATGGC  CCAAGAAGGA  CACGTACTTT  CCAAGTAGTC  CTGTCTAGGA  TGGAAAGCTC
3721  AGGAAGTGCT  TCATAGTTTA  TTATCTTCCA  GTTGGTTTTG  GGAGATGAAC  TGAAGAGGGA
3781  AGTTTGGATA  GGGAAGGTCT  TTTTATTCTT  TTTTTTTTAA  TGTATCCATG  GAGTATTTAT
3841  TATTATTATT  ATTATTATTA  TTATTATTAT  TATACTTTAA  GTTTTAGGGT  ACATGTGCAC
3901  AATGTGCAGG  TTAGTTACAT  ATGTATACAC  GTGTCATGCT  GGTGTGCTGC  ACCCATTAAC
3961  TCGTCATTTA  GCATTAGCTA  TATCTCCTAA  TGCTATCCCT  CCCCCCTCCC  CCCACCCCAC
4021  AACAGTCCCC  AGAGTGTGAT  GTTCCCCTTC  TTGTGTCCAT  GTGTTCTCAT  TGTTCAATTC
4081  CCATCTATGA  GTGAGAACAT  GCAGTGTTTG  GTTTTTTTGT  CCTTGCGATA  GTTTACTGAG
4141  AATGATGATT  TCCAATTTCA  TCCATGTCCC  TACAAAGGAC  ATGAACTCAT  CATTTTTTAT
4201  GGCTGCATAG  TATTCCATGG  TGTATATGTG  CCACATTTTC  TTAATCCAGT  CTATCCTTGT
4261  TGGACTTTTG  GGTTGGTTCC  AAGTCTTTGC  TATTGTGAAT  AGTGCCGCAA  TAAACATACG
4321  TGTGCATGTG  TCTTTATAGC  AGCATGATTT  ATAGTCCTTT  GGGTATATAC  CCAGTAATGG
4381  GATGGCTGGG  TCAAATGGTA  TTTCTAGTTC  TAGATCCCTG  AGGAATCGCC  ACACTGACTT
4441  CCACAATGGT  TGAACTAGTT  TACAGTCCCA  CCAGCAGTGT  AAAAGTGTTC  CTATTTCTCC
4501  ACATCCTCTC  CAGCACCTGT  TGTTTCCTGA  CTTTTTAATG  ATTGCCATTC  TAACTGGCGT
4561  GAGATGGTAT  CTCATTGTGG  TTTTGATTTG  CATTTCTCTG  ATGGCCAGTG  ATGATGAGCA
4621  TTTTTTCATG  TGTCTTTTGA  CTGCATAAAT  GTCTTTTGAG  AAGTGTCTGT  TCATATCCTT
4681  CGCCCACTTT  TTGATGGGGT  TGTTTGTTTT  TTTCTTGTAA  ATTTGTTTGA  GTTCATTGTA
4741  GATTCTGGAT  ATTAGCCCTT  TGTCAGATGA  GTAGGTTGCG  AAAATTTTCT  CCCATTTTGT
4801  AGGTTGCCTG  TTCACTCTGA  TGGTAGTTTC  TTTTGCTGTG  CAGAAGCTCT  TTAGTTTAAT
4861  TAGATCCCAT  TTGTCAATTT  TGGCTTCCTC  TTGGGAGGGT  AGACAGACCT  CACAATATGG
4921  AAAGACGGGA  CAACCTATGG  AACTATCTGT  GACTTCCATG  TACCAAGACA  AGGACGCTAT
4981  AGCTAGGGTA  GTGAGACCTA  GAAGAGAGAA  ACCAGAACAA  AGCAGACAGG  CTGTCCTCTT
5041  CCTAATTCCA  TGCCCTGACA  TCAGCCCCTA  TTTTTTGCCT  TTAGCTGTCC  CCCAGTTTCC
5101 AACCCAATGG GACCAGAGTC TGACTTCCCT TTGCCCTTTC ACAGTGTCTC AGCCTCCATC
                                                          <<<<<
5161 TGCCTTGGGC TCCGCCTGGC CTCCCCATCT AACTCTTCCC AGTTTTTTGT GTAAATGGAG
         R_ctrl_c1
     <<<<<<<<<<<<<<<<<<
5221  CATATTTTAT  GTGCGAATAT  TTTAGTAACC  GTATGTTCTG  CAAGTAAACC  TGTGTTAATA
5281  CTTGTCAACA  ACTGCAGAGT  TTATGATACG  AATAATTCTT  CCTACAATGA  AGAAAAAAAC
5341  ACATTTGTTT  GTTTTCTAAG  AATGTTTATT  TGTAAACATA  TGTATTCACT  ATATTAATAT
5401  GAATTTCTTA  CCTGGCAATA  AAACTGATTA  TATGTGAGGC  TGTTGGGATT  GTCATGTATC
5461 TTTCTAGAAC CCTGCATCCT AATTTG
```

Figura 26. Anelamento de primers na sequência GRCh37:16:13328837:13334322:1, éxon 5 do gene *CKAMP44*. "F" (*forward*) ou "R" (*reverse*); ctrl_c1, ctrl_c2, ctrl_c3 ou ctrl_c4 representam os respectivos controles (ctrl) negativos para os clones 1, 2, 3 ou 4.

Tabela 9. *Primers* com sítios de restrição inseridos (destacados em negrito) para clonagem.

Template	Sítio de clonagem 5'	5' no primer F	Sítio de clonagem 3'	Sítio no primer R
NCS1				
clone 1	*Kpn*I	AAAA**GGTACC**	*Hind*III	AAAA**AAGCTT**
clone 2	*Kpn*I	AAAA**GGTACC**	*Hind*III	AAAA**AAGCTT**
clone 3	*Kpn*I	AAAA**GGTACC**	*Hind*III	AAAA**AAGCTT**
clone 4	*Kpn*I	AAAA**GGTACC**	*Hind*III	AAAA**AAGCTT**
CKAMP44				
controle clone 1	*Sac*I	AAAA**GAGCTC**	*Hind*III	AAAA**AAGCTT**
controle clone 2	*Sac*I	AAAA**GAGCTC**	*Bgl*II	AAAA**AGATCT**
controle clone 3	*Sac*I	AAAA**GAGCTC**	*Bgl*II	AAAA**AGATCT**
controle clone 4	*Sac*I	AAAA**GAGCTC**	*Bgl*II	AAAA**AGATCT**

Tabela 10. Primers utilizados para isolar os insertos para clonagem.

Clone	Tamanho	5' > 3'	Local	Primers F[a] e R[b] (5' > 3')
Testes				
1	3.381 pb	-1.964/+1.416	9:132,932,894 – 132,936,273	**F_clone1_2** AGATGAGGTCTCCCCTGTCA **R_clone1** GCAGGATTCCACAGGAGAAG
2	2.005 pb	-1.964/+41	9:132,932,894 – 132,934,898	**F_clone1_2** AGATGAGGTCTCCCCTGTCA **R_clone2_3_4** GGCGCCCAGCAGGAG
3	1.048 pb	-1.007/+41	9:132,933,851 – 132,934,898	**F_clone3** ATTCAGGTGGAGCCTGTCAC **R_clone2_3_4** GGCGCCCAGCAGGAG
4	588 pb	-547/+41	9:132,934,311 – 132,934,898	**F_clone4** CCGTGTCGAATGAATGAATG **R_clone2_3_4** GGCGCCCAGCAGGAG
Controle				
Ctrl_c1	2.845 pb	Éxon 5	16:13,271,228 – 13,274,072	**F_ctrl_c1** GAGATCTTTTGACCAGGCACA **R_ctrl_c1** TCGCACATAAAATATGCTCCA
Ctrl_c1	2.063	Éxon 5	16: 13,269,071– 13,271,133	**F_ctrl_c234** GGCCTACACCTCTACCACCA **R_ctrl_c2** CAACTGCATTGTTGGTGTCC
Ctrl_c1	1.017	Éxon 5	16: 13,269,071– 3,270,087	**F_ctrl_c234** GGCCTACACCTCTACCACCA **R_ctrl_c3** ATACTCTCCGGACCCTCTCC
Ctrl_c1	614	Éxon 5	16: 13,269,071– 13,269,684	**F_ctrl_c234** GGCCTACACCTCTACCACCA **R_ctrl_c4** CAGCACGTGGCAAGTAGTGT

[a]F: *forward*; [b]R: *reverse*; pb: par de base; ctrl: controle

3.12.4 Ensaios de atividade de luciferase e β-galactosidase

As células foram transfectadas com 10 μg dos plasmídeos pGL4.10 portando a sequência promotora ou 10 μg do pGL4.10 portando a respectiva sequência controle, simultaneamente com 0,5 μg do pβGal-CMV. A atividade enzimática de luciferase e β-galactosidase produzida pelas células HEK 293 ou PC12 transfectadas foi mensurada pelo *NovaBright™ β-galactosidase and Firefly Luciferase Dual Enzyme Reporter Gene Chemiluminescent Detection Kit* (Life Technologies, Carlsbad – EUA). Através deste kit, é possível realizar a quantificação sequencialmente de ambas atividades enzimáticas em uma mesma amostra. As células cultivadas em placas de cultura de 24 poços foram lisadas em 100 μL do tampão fornecido e, imediatamente, os extratos foram utilizados para o ensaio enzimático. Para tal, 10 μL do sobrenadante do lisado foram pipetados em microplaca de 96 poços otimizada para leitura de luminescência (OptiPlate-96, Perkin Elmer, Waltham – EUA). Em seguida, o Buffer A misturado ao substrato *Galacton-Plus*® (diluído 1:100 no Buffer A) foi pipetado. Em menos de 10 min, o Buffer B contendo luciferina foi adicionado e a leitura da luminescência referente a atividade de luciferase foi realizada em leitor de microplacas (EnSpire Multimode, Perkin Elmer, Waltham – EUA). As placas foram mantidas protegidas da luz a temperatura ambiente e, após cerca de 30-60 min, adicionou-se o acelerador de emissão de luz e nova mensuração da luminescência referente a atividade da galactosidase foi imediatamente realizada.

Os valores de luminescência foram subtraídos do background (detectado em células não transfectadas) e apresentados graficamente como:

$$\frac{\textbf{pGL4.10-NCS1.588bp}_{\textbf{Luc}} \ : \ \textbf{pGL4.10-NCS1.588bp}_{\textbf{βGal}}}{\textbf{pGL4.10-Ctrl.614bp}_{\textbf{Luc}} \ : \ \textbf{pGL4.10-Ctrl.614bp}_{\textbf{βGal}}}$$

em que *pGL4.10-NCS1.588bp*$_{Luc}$ e *pGL4.10-NCS1.588bp*$_{\beta Gal}$ correspondem aos valores de luminescência de luciferase e β-galactosidase, respectivamente, de células testadas para o inserto de 588pb; *pGL4.10-Ctrl.614bp*$_{Luc}$ e *pGL4.10-Ctrl.614bp*$_{\beta Gal}$ correspondem aos valores de luminescência de luciferase e β-galactosidase, respectivamente, de células controles. Procedimento similar foi aplicado para os outros plasmídeos testados.

3.13 Clonagem

3.13.1 Reação de PCR para amplificação dos insertos originados a partir do gene *NCS-1* e do éxon 5 do gene *CKAMP44*.

Foi utilizado cerca de 100 ng de DNA genômico isolado de cultura de células HEK 293. O meio reacional consistiu de DMSO a 10%, dNTPs 0,2 mM, primers na concentração final de 10 pmol, 1 U de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific, Waltham – EUA), tampão otimizado para amplificação de insertos com alta porcentagem de GC e água MilliQ® suficiente para 25 μL. Os pares de *primers* utilizados foram de acordo com a Tabela 10. A técnica de PCR *touchdown* foi empregada para amplificação dos insertos. O produto amplificado na PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 μg/ml) e visualizado com transluminador UV.

3.13.2 Digestão dos insertos e vetores

Para que as extremidades dos fragmentos amplificados ficassem compatíveis com as extremidades dos vetores, foi realizado a digestão dos insertos amplificados por PCR de acordo com a Tabela 11. O plasmídeo pGL4.10[luc2] (5 μg) foi linearizado individualmente

nos sítios *Kpn*I/*Hind*III para clonagem dos insertos originados do gene *NCS-1* ou *Sac*I/*Bgl*II para os insertos controles através da digestão com 20 U das respectivas enzimas de restrição. Este mesmo procedimento foi utilizado para a digestão dos insertos. A primeira reação de digestão foi realizada em um volume final de 30 µL com a enzima (New England Biolabs Inc., Ipswich – EUA) cujo tampão de reação possuísse a menor concentração de sais. Para tal foram utilizados 20 µL de DNA, 2 µL da enzima de restrição, 3 µL do tampão de reação 10X e 5 µL de água MilliQ®. A reação foi incubada a 37 ºC em termociclador por 16 h e, logo após, foi realizada a inativação da enzima através de incubação a 65 ºC por 20 minutos. Em seguida, a segunda digestão foi realizada em um volume final de 50 µL. Para tal foram utilizados os 30 µL da reação anterior, 2 µL da enzima (New England Biolabs Inc., Ipswich – EUA), 5 µL do tampão de reação 10X e 13 µL de água MilliQ®. A reação foi incubada a 37º C em termociclador por 16 h. Em todas as condições o volume de enzima não excedeu 1/10 do volume total da reação (Tabela 12).

Tabela 11. Sítios de clonagem utilizados para clonagem no pGL4.10

Inserto	Sítio de clonagem 5'	Sítio de clonagem 3'
NCS1 - clone 1	*Kpn*I	*Hind*III
NCS1 - clone 2	*Kpn*I	*Hind*III
NCS1 - clone 3	*Kpn*I	*Hind*III
NCS1 - clone 4	*Kpn*I	*Hind*III
Ctrl_clone 1	*Sac*I	*Hind*III
Ctrl_clone 2	*Sac*I	*Bgl*II
Ctrl_clone 3	*Sac*I	*Bgl*II
Ctrl_clone 4	*Sac*I	*Bgl*II

Tabela 12. Condições de reação para as enzimas de restrição utilizadas no estudo

Enzima	Quantidade	Temperatura	Tempo	Inativação
*Kpn*I	20 U	37°C	12 h	Por purificação
*Hind*III	20 U	37°C	16 h	65°C por 20 min
*Sac*I	20 U	37°C	12 h	65°C por 20 min
*Bgl*II	20 U	37°C	16 h	Por purificação

3.13.3 Desfosforilação dos vetores

Os fosfatos das extremidades 5' dos vetores linearizados foram eliminados com 2,5 U da enzima fosfatase alcalina extraída de intestino bovino (CIP) (New England Biolabs Inc., Ipswich – EUA), em presença de seu tampão de reação. A reação consistiu de incubação por 1 h a 37 °C.

3.13.4 Purificação dos insertos e vetores

Para retirar as impurezas das digestões, os vetores linearizados e desfosforilados além dos insertos digeridos foram purificados. Para tal, os fragmentos foram eletroforeticamente separados em gel de agarose 0,8% (p/v) preparado em tampão TAE, contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg/mL. Após a corrida, as bandas de DNA foram retiradas do gel utilizando-se um bisturi estéril de forma que a pequena fatia de gel nunca apresentou massa superior a 300 mg. As fatias foram pesadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e purificadas seguindo as instruções do *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen, Hilden – Alemanha). O QG buffer foi misturado na proporção de 100 μL para cada 100 mg de gel para cada fatia e vigorosamente homogeneizado. A mistura foi incubada a 55 °C por 10 minutos ou até que a agarose estivesse totalmente solubilizada. Depois da solubilização, a mistura foi aplicada na coluna de sílica, a qual foi centrifugada por 1 min a 20,000 x *g*. A solução que percolou pela coluna foi descartada. A coluna foi então lavada com os tampões de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; etanol para concentração final de 80%) através de centrifugações nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, 30 μL de Tris-HCl estéril pH 8,5 foi aplicado à coluna para eluição do DNA. Após aproximadamente 1 min em repouso

à temperatura ambiente a coluna foi centrifugada por 1 min a 20,000 x *g* e ao término o DNA purificado foi recuperado em solução aquosa e armazenado a – 20 °C.

3.13.5 Inserção dos fragmentos de DNA no vetor pGL4.10

Os fragmentos previamente digeridos e purificados foram quantificados por fluorescência através do sistema Qubit® (Life Technologies, Carlsbad – EUA). Para que ocorresse o processo de ligação, a proporção da quantidade inserto : vetor de 3:1 ou 5:1 foi determinada segundo o aplicativo *CloningBench*, versão para iPhone® (Life Technologies, Carlsbad – EUA). Após a determinação da proporção, os fragmentos de interesse foram inseridos por ligação fosfodiéster no vetor linearizado a ser clonado, com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs Inc., Ipswich – EUA). Cerca de 10 ng do vetor foram misturados aos insertos respeitando as devidas proporções em presença 1 U de T4 DNA ligase e do tampão de reação fornecido pelo fabricante, em um volume de 10 μL. Após cerca de 18 horas de incubação a 16 ^{o}C, a reação foi inativada por incubação a 65 ^{o}C por 20 minutos e os produtos da reação de ligação foram analisados através de transformação e replicação em *E. coli.*

3.13.6 Preparo de *Escherichia coli* (cepas DH5-α) quimicamente competentes

Células de *Escherichia coli* competentes, cepas DH5-α, foram produzidas de acordo com Lederberg & Cohen (1974). Uma colônia de *E. coli* mantida em meio mínimo M9 (Na_2HPO_4•H_2O 12,8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $MgSO_4$ 2 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM, glicose 0,4%, ágar 15 g/L) foi inoculada em 5 mL de meio LB (10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, pH 7,5), e incubada por cerca de 18 horas a 37

°C sob agitação a 200 rpm. Desta cultura, 0,3 mL foram inoculados em 30 mL de meio SOB (bacto-triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 0,2 g/L, pH = 7,3), contendo 0,6 mL de $MgCl_2$ 1 M, e a suspensão foi incubada a 37 °C sob agitação a 200 rpm até atingir uma D.O. em torno de 0,5 a 600 nm. A cultura foi mantida no gelo por 5 minutos, centrifugada a 1.000 x *g* por 10 minutos a 4 ^oC. As células foram lavadas com 100 mL de $MgCl_2$ 0,1 mol/L 4 ^oC, centrifugadas novamente por 10 minutos, ressuspensas em 100 mL de $CaCl_2$ 0,1 mol/L gelado, mantidas no gelo por 20 minutos, centrifugadas por 10 minutos, ressuspensas em 21,2 mL de $CaCl_2$ 0,1 mol/L a 4 ^oC e 3,8 mL de glicerol 80% (v/v) estéril. As células foram aliquotadas e armazenadas a -80 ^oC.

3.13.7 Transformação de bactérias competentes

A transformação das células competentes de *E. coli* DH5-α foi realizada por choque térmico. Alíquotas contendo 100 μL de células foram retiradas do freezer a -80 ^oC e deixadas descongelar no gelo por cerca de 10 minutos. Após, um volume de 5 μL contendo 10-15 ng do plasmídeo foi adicionado sem agitação. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos e seguida do choque térmico a 42 ^oC por 90 segundos. Após este tempo, as células foram colocadas em gelo novamente e adicionadas de 100 μL do meio LB. A suspensão de células foi logo em seguida semeadas em meio LB-ágar estéril (15 g/L de ágar adicionada ao meio LB) contendo ampicilina e incubadas à 37 °C por não mais que 16 h.

3.13.8 Análise das colônias recombinantes

Uma das colônias recombinantes obtidas no item anterior foram inoculadas em 3 mL de meio LB, contendo 100 μg/ml de ampicilina, e incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas.

Para verificar a clonagem dos insertos no vetor pGL4.10[luc2], foram feitas minipreparações de DNA plasmidial e dupla digestão dos sítios de clonagem para verificação da presença do inserto. Após eletroforese, os fragmentos esperados para cada inserto foram avaliados.

3.13.9 Minipreparação de DNA plasmidial

Uma colônia isolada da bactéria, contendo o plasmídeo de interesse, foi inoculada em 3 mL de meio LB contendo 100 μg/mL de ampicilina. Após incubação a 37 ^{o}C por 16 h sob agitação de 250 rpm, 1 mL da cultura foi centrifugada a 20.000 x *g* por 1 min a 25 ^{o}C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi utilizado para purificação do DNA plasmidial de acordo com as instruções do *Plasmid DNA Extraction Miniprep Kit* (Feldan, Quebec City – Canada). O DNA foi ressuspendido em 30 μL de água ultrapura autoclavada e armazenado a -20 ^{o}C.

3.13.10 Preparação em grande escala de DNA plasmidial

Cerca de 2 mL de cultura restantes do procedimento anterior foram inoculados em um frasco do tipo erlenmeyer com 250 mL de LB e cultivados novamente sob agitação de 150 rpm por 16 horas a 37 ^{o}C. Para a purificação do plasmídeo, o kit comercial *DNA Max Prep Kit* (Feldan, Quebec City – Canada) foi utilizado conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, cerca de 250 mL da suspensão de células de cada frasco foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados a 4.000 x *g* por 20 minutos a 4 ^{o}C. O sedimento de cada tubo foi ressuspenso em tampão de extração de plasmídeos contendo RNAse e em seguida uma solução de NaOH 0,2 N e SDS 0,1% (p/v) foi adicionada e a mistura foi homogeneizada gentilmente por inversão 10 vezes e deixada descansar por 3 minutos. Após, foi adicionado o

tampão com acetato de sódio, pH 5,4. A suspensão foi centrifugada a 4.000 x *g* por 20 minutos a 4 ^{o}C. O sobrenadante foi transferido para a coluna de troca iônica previamente equilibrada, lavado e eluído. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de isopropanol, lavado com etanol a 70% (v/v), seco, ressuspenso em água deionizada estéril e armazenado a -20 ^{o}C.

3.13.11 Quantificação de DNA plasmidial

Os plasmídeos purificados pelos métodos descritos acima foram quantificados da mesma forma como descrito anteriormente para o DNA genômico.

3.14 Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do status antioxidante de tecidos cerebrais foi feita de acordo com diversos protocolos disponíveis na literatura ou como recomendado pelos fabricantes de kits comerciais. Neste intuito, foram investigados os níveis de CAT (catalase), SOD (superóxido dismutases), TBARS (lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), carbonilação de proteínas, além da atividade enzimática de CK (caseína quinase), succinato desidrogenase (SDH) e complexos mitocondriais I, II, II-III e IV.

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, trizma base 10 mM e heparina 50 UI/mL) (1:10, p/v, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 × *g* durante 10 minutos e os sobrenadantes mantidos a -70 °C até a determinação bioquímica. O período máximo entre a preparação do homogeneizado e a análise foi sempre inferior a 5 dias. Para estes experimentos, a normalização dos níveis ou atividades enzimáticas avaliadas foi feita pelo teor de proteínas da

amostra. Para isso, foi utilizado o método descrito por Lowry et al. usando albumina bovina como padrão (LOWRY *et al.*, 1951).

3.14.1 Catalase (CAT)

A determinação da atividade da catalase (CAT) foi detectada espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Aebi (AEBI, 1984). Em uma cubeta de quartzo, 10 µL da solução de reação foi diluída em 990 µL de Tris/EDTA 5 mM, pH = 8,0, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30% e água MilliQ. A atividade desta enzima foi medida pela velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em comprimento de onda de 240 nm. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 240 nm por 5 minutos a 30 ^oC e os resultados foram expressos em µmol de H_2O_2 consumido/mg tecido.

3.14.2 Superóxido dismutase (SOD)

O ensaio para quantificar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi baseado na auto-oxidação da adrenalina como proposto por Misra e Fridovich em 1972 (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Neste ensaio, quando a adrenalina sofre auto-oxidação em meio básico, a reação envolve a geração de radicais livres, especialmente o ânion superóxido, que contribui com a perpetuação da oxidação. Para tanto o método avalia, indiretamente, a ação enzimática da SOD, que ao neutralizar os radicais superóxido evita a oxidação da adrenalina a adrenocromo, um subproduto colorido que pode ser medido a 480 nm. Inicialmente realizou-se uma leitura em espectrofotômetro da auto-oxidação natural da adrenalina, em meio contendo tampão glicina pH 11,3, por cerca de 90 s. A leitura resultou em uma curva, cuja porção ascendente indica a formação de adrenocromo, até o ápice da

curva, a partir de onde observa-se um decaimento que indica a oxidação deste em outros compostos com absorção máxima não mais em 480 nm, e por isso não detectáveis. As absorbâncias interessantes são aquelas do início e fim do segmento da curva mais acentuado, representando o período mais intenso da reação. Após, realizou-se a leitura das amostras em meio contendo tampão glicina pH 11,3, ou adrenalina. Os resultados foram expressos em, unidades de SOD por miligrama de proteína, que representa a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de auto-oxidação da adrenalina.

3.14.3 Peroxidação de lipídios

Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Draper e Hadley (DRAPER; HADLEY, M., 1990). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff.

Alíquotas do sobrenadante (homogeneizado) foram misturadas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) em tubos de ensaio e agitados no vórtex por 15 segundos. Em seguida um dos tubos foi colocado em banho-maria a 37 ^{o}C com agitação de 1 minuto a cada 10 minutos e o outro tubo na geladeira, ambos pelo período de 1 h. Após retirá-los do banho e da geladeira, foram adicionados a cada tubo uma solução composta de TCA (ácido tricloroacético), TBA (ácido tiobarbitúrico) e BHT (hidroxitolueno butilado) diluídas em HCl 0,25N. Em seguida foram novamente agitados no vórtex durante 15 segundos. Os tubos foram levados ao banho-maria fervente por 15 minutos e depois resfriados em gelo para então serem centrifugados a 3.000 x *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para realizar a leitura da absorbância

em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm. As determinações foram realizadas em duplicata. Para a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi usado TEP (1,1,3,3 - tetraetoxipropano) para elaboração da curva padrão. Foram utilizadas soluções contendo TCA/TBA/BHT e volumes de TEP de 0 a 250 μL com intervalos de 50 μL entre eles. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína .

3.14.4 Carbonilação de proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram avaliados em homogeneizados cerebrais através da determinação de grupo carbonil, baseado na reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrita por Levine e colaboradores (LEVINE *et al.*, 1994). Primeiramente, em dois tubos de plástico de 1,5 mL foram adicionados os homogeneizados cerebrais. No tubo A foi pipetado 0,5 mL de uma solução de 10 mM DNPH em HCl 2 M. No tubo B foi pipetado 0,5 mL de uma solução 2 M HCl. Os dois tubos foram incubados a 37 ºC por 90 minutos. Após essa etapa foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético 28% em cada tubo e agitou-se por 3 minutos. Os tubos foram então centrifugados por 3 minutos a 6.000 x *g* e tiveram seu sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 0,5 mL de uma solução 1:1 de etanol e acetato etílico e centrifugado novamente por 6 minutos a 6.000 x *g*. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi finalmente ressuspendido em 0,5 mL de uma solução 6 M hidrocloreto de guanidina. Os tubos foram centrifugados uma última vez a 6.000 x *g* por 3 minutos. Foi lida então a absorbância na faixa de 360 nm utilizando o tubo B como branco, e a concentração de carbonila foi determinada usando um coeficiente de absorção molar de 22.0000 M^{-1} cm^{-1}. Os níveis de carbonila são apresentados em nmol/g de proteína.

3.14.5 Complexos Mitocondriais

NADH desidrogenase (complexo I) contém flavina mononucleotídeo (FMN) e centros ferro-enxofre (Fe-S). FMN recebe elétrons do NADH e é capaz de transferi-los aos centros Fe-S. Quando o NADH é reoxidado a NAD^+ a atividade deste complexo é avaliada pela taxa de redução NADH dependente de ferricianeto em 420 nm, descrito por Cassina e Radi (CASSINA; RADI, 1996).

No complexo II, o FAD recebe 2 elétrons e é reduzido a $FADH_2$. Este transfere seus elétrons para os centros Fe-S da succinato desidrogenase (SDH), que então doa esses elétrons para a coenzima Q (CoQ), para que estes fluam pela cadeia respiratória. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm (FISCHER *et al.*, 1985). O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 μM). Inicialmente pré-incubou-se com o homogeneizado a 30 °C por 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 40 μM de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm.

No complexo III, os elétrons fluem entre os citocromos no sentido do citocromo de menor potencial redox para o de maior. Os átomos de ferro nos citocromos que se encontram no estado Fe^{+3} recebem um elétron e são reduzidos para Fe^{+2} , e, ao passar este elétron para o próximo componente da cadeia respiratória, o ferro é reoxidado a Fe^{+3}. Atividade do complexo II-III foi medida pela redução citocromo c a 550 nm (FISCHER *et al.*, 1985). O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM pH 7,4), de succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 μg/mL de citocromo c e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm.

A citocromo oxidase ou complexo IV, último complexo da cadeia respiratória, transfere elétrons do citocromo c para o O_2. Este complexo contém os citocromos a e a3 e um sítio de ligação ao O_2. Cada molécula de O_2 precisa receber 4 elétrons para ser reduzida a 2 H_2O. Neste complexo, a presença de íons Cu^{+2} facilita a redução do O_2. A atividade da citocromo c oxidase foi analisada de acordo com o método descrito por Rustin e colaboradores medido pela diminuição da absorbância devido à oxidação do citocromo c anteriormente reduzido em 550 nm (RUSTIN *et al.*, 1991). O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), lauril maltósito (0,6 mM) e 10-20 μg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 μg de citocromo c reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25 °C por 10 minutos.

A atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram calculados em nmol.minutos^{-1}.mg de proteina^{-1}.

3.14.6 Succinato desidrogenase

A atividade de succinato desidrogenase foi determinada de acordo com o método de Fischer e colaboradores (FISCHER *et al.*, 1985). A reação baseia-se na diminuição da absorbância devido à redução do 2,6 - diclorofenol-indofenol (2,6-DCIP) a 600 nm, sendo que o comprimento de onda a 700 nm é usado como referência (ε = 19,1 mM^{-1} cm^{-1}) na presença de metilsulfato de fenazina (PMS). A mistura de reação consistindo de fosfato de potássio 40 mM (pH 7,4), 16 mM de succinato e 8 μM 2,6-DCIP foi pré-incubada com a proteína de homogeneizados cerebrais a 30 ° C durante 20 minutos. Subsequentemente, 4 mM de azida de sódio, 7 μM rotenona e 40 μM 2,6-DCIP foram adicionados e a reacção foi iniciada pela adição de 1 mM PMS e foi monitorizada durante 5 minutos. A atividade foi calculada em nmol.minutos^{-1}.mg protein^{-1}.

3.14.7 Creatina quinase (CK)

A atividade da creatina quinase (CK) foi avaliada em homogeneizados cerebrais pré-tratados com lauril maltosídeo 0,625 mM segundo o método de Hughes (HUGHES, 1962). Resumidamente, a reação consistiu numa mistura contendo Tris-HCl 60 mM, pH 7,5, fosfocreatina 7,0 mM, $MgSO_4$ 9,0 mM e cerca de 0,4-1,2 mg de proteína em um volume final de 100 μL. Após um período de 15 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada com a adição de ADP a uma concentração final de 3,2 mM em 100 μL de meio contendo 7,08 mM de fosfocreatina, 0,8 mM de glutationa e de 0,8 a 1 μg de proteínas (homogeneizado). Após um período de 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 20 μL de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição de 100 μL de α-naftol 20%, 680 μL de água MilliQ e 100 μL de diacetil 20%. A leitura foi feita por espectrometria a 540 nm. Para calcular a atividade da CK nas amostras, foi feita uma curva de calibração com creatina nas concentrações de 4 nmol/mL (60 μL de fosfocreatina, 10 μL de creatina-padrão e 10 μL de água MilliQ) e 8 nmol/mL (60 μL de fosfocreatina e 20μL de creatina-padrão). Daí obteve-se o fator de calibração médio (FCM) necessário para os cálculos de atividade da CK. Os resultados foram expressos em unidades / mg de proteína.

3.15 *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um nematódeo transparente, não parasita, de aproximadamente 1 mm quando adultos, que se alimenta da bactéria *E. coli*. O verme apresenta ciclo de vida curto e prole numerosa (~ 300 por verme adulto) (KURZ; EWBANK, 2003). Após eclosão do ovo, o desenvolvimento processa-se em quatro estágios larvais (L1-

L4). Atingida a fase adulta (após 2 dias) o verme é, no caso dos hermafroditas, capaz de se autofecundar. Frente à condições adversas de sobrevivência, como temperatura inadequada e carência de alimento, o nematódeo pode adentrar em estágio de "dormência" conhecido como larva *dauer,* o qual se caracteriza por alta resistência a estressores ambientais e longa sobrevida (3 a 8 vezes o normal). Ainda, possui número constante de células somáticas (959 no hermafrodita adulto e 1.031 no macho adulto) e com desenvolvimento estereotipado (BARGMANN, 1993).

3.15.1 Cultivo

Os vermes foram mantidos em condições-padrão de cultura, em placas de cultivo contendo meio de crescimento para nematódeos NGM (3 g/L NaCl; 17 g/L ágar; 2,5 g/L peptona; 1 mM $CaCl_2$; 5 mg/L colesterol; 1 mM $MgSO_4$; 25 mM KPO_4^{-2}) a 20 ^oC e supridos nutricionalmente com bactéria *E. coli* cepa OP50. Para os experimentos, os vermes foram sincronizados através do método do hipoclorito para a obtenção de população na mesma fase larval. Animais saudáveis foram coletados em tubos de 15 mL. Após lavar uma vez com H_2O e centrifugar (350 g por 3 minutos) para sedimentação dos vermes, foram adicionados 5 mL de solução de sincronização (3,75 mL H_2O; 250 μL 10 N NaOH; 1 mL hipoclorito de sódio 2%). A lise dos vermes foi monitorada através de microscopia e, após a ruptura de aproximadamente 50% dos animais, os tubos foram preenchidos com tampão M9 (3 g/L KH_2PO_4; 6 g/L Na_2HPO_4; 5 g/L NaCl; 1M $MgSO_4$) para parar a reação e, em seguida, centrifugados. O preciptado formado pelos vermes foi lavado três vezes com tampão M9 e estes transferidos para uma placa de Petri contendo 10 mL de tampão M9. Este procedimento mata os vermes em todos os estágios larvais ou adulto, mas preserva os ovos que são resistentes a solução de sincronização (não excedendo 5 minutos). Os ovos foram mantidos a

20 °C até eclodirem (12-14 h após). Devido a ausência de alimentos, os vermes param o seu desenvolvimento no estágio larval L1 e foram assim utilizados para os experimentos.

3.15.2 Tratamento com Paraquat

O paraquat foi dissolvido previamente em PBS e armazenado a 4 °C por até 8 semanas. Esta solução foi então adicionada ao NGM ainda não solidificado e distribuída em placas. Foram escolhidas as concentração de 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 e 2,4 mM visto que foi observado eficiência do composto em induzir atraso no desenvolvimento larval, gerando portanto um modelo de dano oxidativo (MCCORMACK *et al.*, 2005). Após a solidificação do meio, bactérias E. coli OP50 foram semeadas na região central da placa e sua proliferação foi permitida por 24 h a 20-22 ºC. Animais em diferentes estágios larvais foram mantidos sob tratamento pelo tempo de interesse quando então as análises experimentais foram executadas.

3.15.3 Análise da longevidade

Para avaliar se a ausência de Ncs-1 na cepa *XA406* causava alteração na longevidade em *C. elegans* ou susceptibilidade ao paraquat, foi realizada uma metodologia experimental para avaliação da longevidade conforme Gems e colaboradores (GEMS *et al.*, 1998). Para tal, os animais na fase L1 foram cultivados em meio NGM e, assim que chegaram no fim da fase L4, entre 20 e 25 nematódeos das cepas *N2* ou *XA406* foram transferidos para placas de NGM semeadas com *E. coli* (OP50) contendo paraquat na concentração de 2,4 mM, ou PBS. Os animais foram contados diariamente até o dia do último sobrevivente. Durante o período de ovoposição, os animais foram transferidos diariamente para um nova placa com NGM semeadas com *E .coli* (OP50) de modo a evitar mistura entre as gerações. Morte foi

classificada como ausência de movimento e falha completa de reflexo após gentis “cutucadas” com uma haste de platina. Placas eventualmente contaminadas ao longo dos dias foram excluídas das análises. Foram estudadas 6 placas oriundas de 3 diferentes experimentos feitos em duplicata.

3.15.4 Efeito do paraquat sobre a viabilidade e desenvolvimento larval

Para avaliar o efeito do tratamento na viabilidade e desenvolvimento do verme, aproximadamente 15 nematódeos *N2* ou *XA406* sincronizados foram monitorados do estágio larval L1 até adulto sobre placas de NGM semeadas com *E.coli* (OP50) contendo as concentrações indicadas de paraquat ou veículo. Durante as observações, os vermes foram mantidos a 20 °C ± 2 e monitorados a cada dia por 10 dias. Os animais foram classificados como adultos viáveis (aqueles que chegaram a fase adulta em no máximo 10 dias com ovoposição), com atraso no desenvolvimento (aqueles que não chegaram a fase adulta, mesmo após 10 dias) ou decapitados. Para isto, alguns parâmetros como tamanho, desenvolvimento da vulva e presença de ovos foram considerados. Animais que chegaram a fase de adulta realizando ovoposição foram considerados viáveis e o experimento finalizado. Foram realizados 4 experimentos em duplicata para cada condição.

3.15.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata para permitir a realização de testes estatísticos. As diferenças significativas entre as médias obtidas pelos achados bioquímicos e moleculares, quando comparadas dois a dois, foram calculadas através

do teste t de Student e quando comparados em grupos de três ou mais colunas foram submetidos aos testes de variância ANOVA de uma ou duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. O teste t de Student também foi aplicado nos resultados da habituação ao campo aberto. As diferenças entre treino e teste na prova de reconhecimento de objetos foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. O teste log-rank (Mantel-Cox) foi aplicado no experimento de longevidade de *C. elegans*. Os valores apresentados graficamente representam médias ± desvio padrão da média (SEM). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.0) onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Parte I

Os resultados desta seção referem-se aos experimentos realizados para compreender como o Ncs-1 é regulado farmacologicamente por fármacos estabilizadores do humor.

4.1.1 Fármacos estabilizadores do humor modulam os níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro.*

A primeira pergunta gerada pelo estudo foi se, diferente de outras classes de fármacos, os estabilizadores do humor poderiam modular a expressão de Ncs-1. Para isso, quatro diferentes fármacos (Li, VPA, LTG e CBZ) foram selecionados levando-se em conta sua ampla utilização clínica. Para estes experimentos, células não diferenciadas da linhagem PC12 foram utilizadas como modelo de estudo *in vitro*. No intuito de expandir ao máximo o conhecimento dos possíveis efeitos farmacológicos neste modelo *in vitro*, as células foram tratadas sob condições padrões de cultivo celular por 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Esta estratégia foi empregada para avaliar discriminadamente os efeitos farmacológicos a curto ou a longo prazo sobre a expressão de Ncs-1. De forma semelhante, foram utilizadas múltiplas concentrações dos fármacos levando-se em consideração o intervalo terapêutico descrito em estudos em humanos e efeitos farmacológicos associados com a ação destes compostos *in vitro*.

Como mostrado na Figura 27, o tratamento com Li nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mM elevou em aproximadamente 50% a expressão de Ncs-1 após 6 h de tratamento (0,5 mM: $p < 0,05$; 1,0 e 1,5 mM: $p < 0,01$). Interessantemente, nenhuma alteração na expressão de Ncs-1 foi observada em um modelo de tratamento com 5,0 mM simulando hiperdosagem (dados não mostrados).

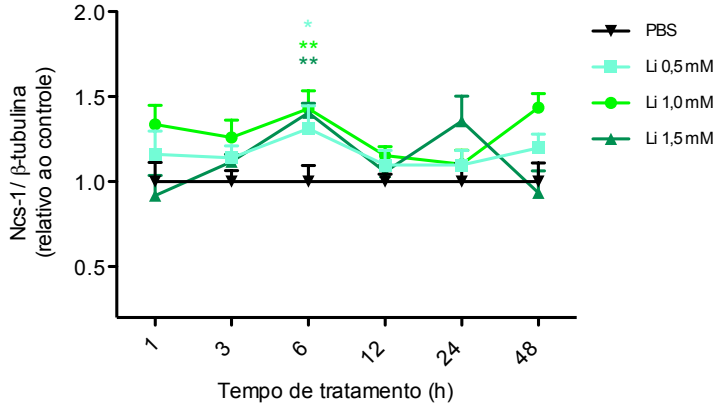


Figura 27.Tratamento com lítio eleva os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram tratadas com três diferentes concentrações de Li (0,5; 1,0 ou 1,5 mM) ou com PBS por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. Li: cloreto de lítio. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (*one way* ANOVA).

Da mesma forma que Li, o tratamento com VPA também elevou os níveis protéicos de Ncs-1 em aproximadamente 50% (Figura 28). No entanto, este efeito foi observado apenas para a menor concentração utilizada, 0,625 mM e após 3 h de tratamento ($p < 0,01$). Além disso, foi observada uma discreta redução de aproximadamente 25% nos níveis da proteína no segundo dia de tratamento com a maior concentração, de 2,5 mM ($p < 0,05$). Nenhum efeito de VPA sobre a expressão de Ncs-1 foi observado para a concentração de 1,25 mM.

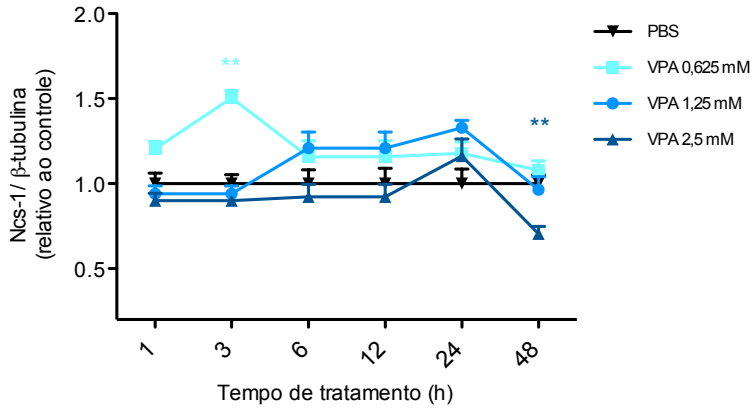


Figura 28.Tratamento com valproato eleva os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram tratadas com três diferentes concentrações de valproato de sódio (VPA) (0,625; 1,25 ou 2,5 mM) ou com PBS por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. ** $p < 0,01$ (*one way* ANOVA).

Os efeitos do tratamento com LTG em células PC12 foram similares aos observados com Li e VPA já que também elevou a expressão de Ncs-1 em células PC12 (Figura 29). No entanto, o aumento aproximado de 50% da expressão de Ncs-1 foi observado só após 24 h para a concentração de 100 µM, a maior utilizada ($p < 0,01$).

O tratamento com CBZ foi realizado com as concentrações de 10 ou 50 µM no grupo teste ou etanol no grupo controle. Diferente dos três outros fármacos avaliados, CBZ não alterou a expressão de Ncs-1 nas condições apresentadas na Figura 30.

Estes resultados indicam que três dos fármacos estabilizadores do humor mais utilizados clinicamente, compartilham a mesma ação farmacológica estimulando a expressão de Ncs-1 *in vitro*.

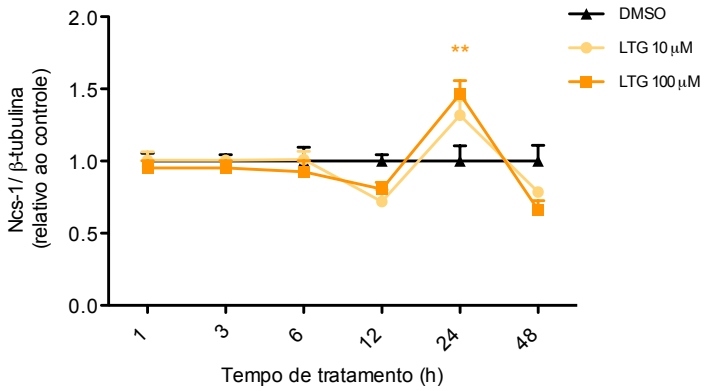


Figura 29. Tratamento com LTG eleva os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram tratadas com duas diferentes concentrações de LTG (10 ou 100 μM) ou com DMSO 0,01% por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. LTG: lamotrigina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. ** $p < 0,01$ (*one way* ANOVA).

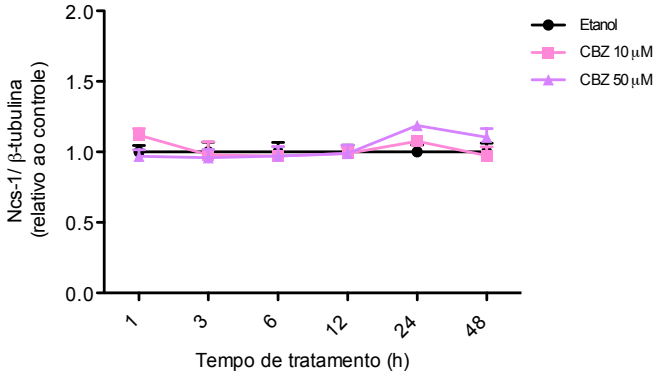


Figura 30. Tratamento com CBZ não altera os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram tratadas com duas diferentes concentrações de CBZ (10 ou 50 μM) ou com etanol 0,01% por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. CBZ: carbamazepina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. (*one way* ANOVA).

4.1.2 Concentrações de fármacos estabilizadores do humor que aumentam os níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro* também aumentam a resistência celular ao dano causado pelo H_2O_2.

Nakamura *et al*., em 2002 (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006) e Benbow *et al*., mais recentemente (2011) (BENBOW *et al.*, 2011), publicaram interessantes resultados relacionando Ncs-1 com proteção celular. No estudo de Nakamura *et al*., os autores mostraram que a lesão de nervos próximo a raiz dorsal causou elevação da expressão de Ncs-1 nesta região. Os autores sugeriram que este mecanismo de indução poderia estar relacionado com uma resposta fisiológica benéfica para a manutenção da integridade celular. No estudo de Benbow *et al*., os autores utilizaram versões mutadas da proteína Ncs-1 que favoreciam ou não sua degradação pela calpaína. Os autores mostraram que condições experimentais que propiciaram a manutenção dos níveis intracelulares de Ncs-1, acarretou em maior proteção de células da linhagem neuroblastoma ao dano induzido por paclitaxel, um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer. Como os primeiros achados deste estudo mostraram que Li, VPA e LTG possuem a habilidade em aumentar os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12, uma relevante questão foi levantada a respeito do mecanismo de ação pelo qual estes fármacos exercem sobre Ncs-1. Se Ncs-1 eleva-se durante condições celulares adversas, estariam estes fármacos induzindo a expressão de Ncs-1 devido a um hipotético dano celular?

Para responder a esta questão, foi realizado um experimento para avaliar o efeito das concentrações utilizadas que aumentam Ncs-1 (ou até mesmo concentrações maiores) na viabilidade de células PC12. Para maximar qualquer possível dano celular induzido por Li, VPA, LTG ou CBZ, as células foram tratadas por 24 h e em seguida a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Nestas condições, como mostrado na Figura 31, apenas a

concentração de 50 μM de CBZ, a qual não induz a expressão de Ncs-1, causou uma discreta diminuição da viabilidade celular (Figura 31 D).

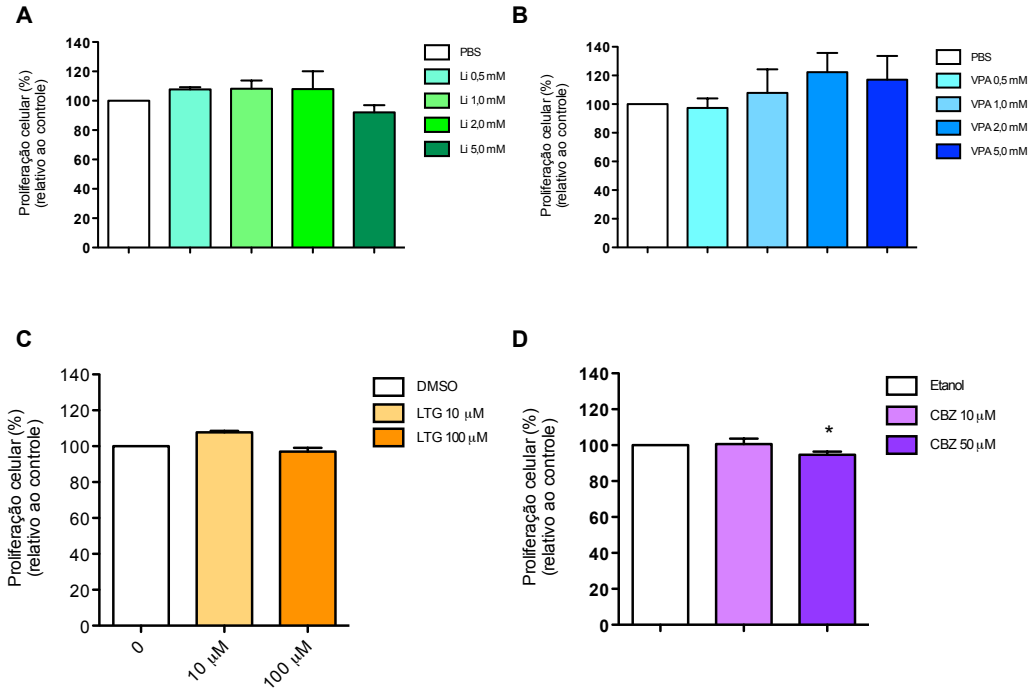


Figura 31. Efeito do tratamento com fármacos estabilizadores do humor na viabilidade de células PC12. As células (N = 4) foram tratadas com os respectivos fármacos por 24 h e logo em seguida a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Os resultados estão apresentados como porcentagem (%) de viabilidade celular normalizada pelo grupo controle correspondente. A redução na viabilidade celular foi observada apenas para o tratamento com 50 μM de CBZ. Li: cloreto de lítio; VPA: valproato de sódio; LTG: lamotrigina; CBZ: carbamazepina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$ (*one way* ANOVA).

A exceção de uma das concentrações de CBZ, de maneira geral, as concentrações dos fármacos não alteraram a viabilidade celular. Esta observação nos levou a especular que as concentrações que aumentam Ncs-1 também poderiam acarretar em maior proteção celular.

Para testar esta hipótese, um modelo de dano oxidativo induzido por H_2O_2 em células PC12 foi empregado. Para tal, selecionou-se uma concentração de H_2O_2 que em 24 h poderia induzir uma taxa de morte celular de cerca de 50%. Após tratamento com 50-500 µM de H_2O_2 por 24 h, a concentração de 300 µM foi a escolhida (Figura 32). Nessas circunstâncias, as células PC12 foram condicionadas com um pré-tratamento com as concentrações e fármacos de interesse por 24 h (dia 1) e, em seguida, adiciounou-se 300 µM de H_2O_2 por mais 24 h (dia 2). Posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada para as diferentes condições experimentais.

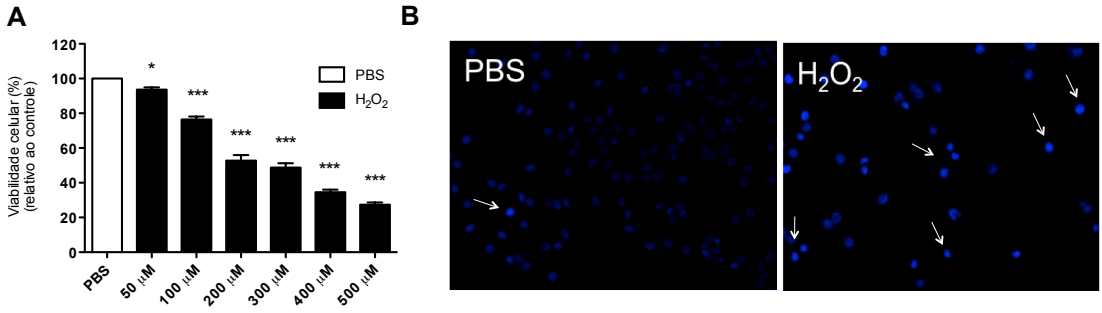


Figura 32. Efeito do tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na viabilidade de células PC12. (A) As células (N = 4) foram tratadas com as concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 ou 500 µM de H_2O_2 por 24 h e logo em seguida a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Os resultados estão apresentados como porcentagem (%) de viabilidade celular normalizada pelo grupo tratado com PBS. A redução na viabilidade celular de aproximadamente 50% observada na concentração de 300 µM de H_2O_2 foi utilizada nos experimentos subsequentes. (B) Marcação nuclear com Hoechst 33342 após tratamento com 300 µM por 24 h confirma o dano celular previsto pelo teste do MTT. As setas indicam alta densidade de núcleos apoptóticos após tratamento com 300 µM por 24 h. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (*one way* ANOVA).

Os pré-tratamentos com Li ou VPA foram capazes de diminuir, ou até quase eliminar, a taxa de morte celular de 50% induzida pelo tratamento com 300 μM de H_2O_2. O efeito "protetor", para ambos os fármacos, foi dependente da concentração. Isso significa que quanto maior a concentração experimentada maior a proteção observada. Para Li, apesar do efeito protetor observado ter sido maior para as concentrações de 2,0 e 5,0 mM, não existiu significância estatística entre estas e as outras concentrações testadas (0,5 e 1,0 mM) (Figura 33 A). O pré-tratamento com VPA revelou que a concentração de 2,0 mM foi a que apresentou um maior efeito protetor, porém com semelhante significância estatística das concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 mM (Figura 33 B). Para CBZ, embora a concentração de 10 μM tenha sido capaz de exercer efeitos protetores, a maior concentração testada (50 μM) não obteve este mesmo efeito (Figura 33 C).

Juntos, estes resultados sugerem que o aumento da expressão de Ncs-1 mediada por fármacos estabilizadores do humor são independentes do dano celular, uma vez que a série de concentrações experimentadas não alteraram a viabilidade celular mesmo sobre as diversas condições experimentais.

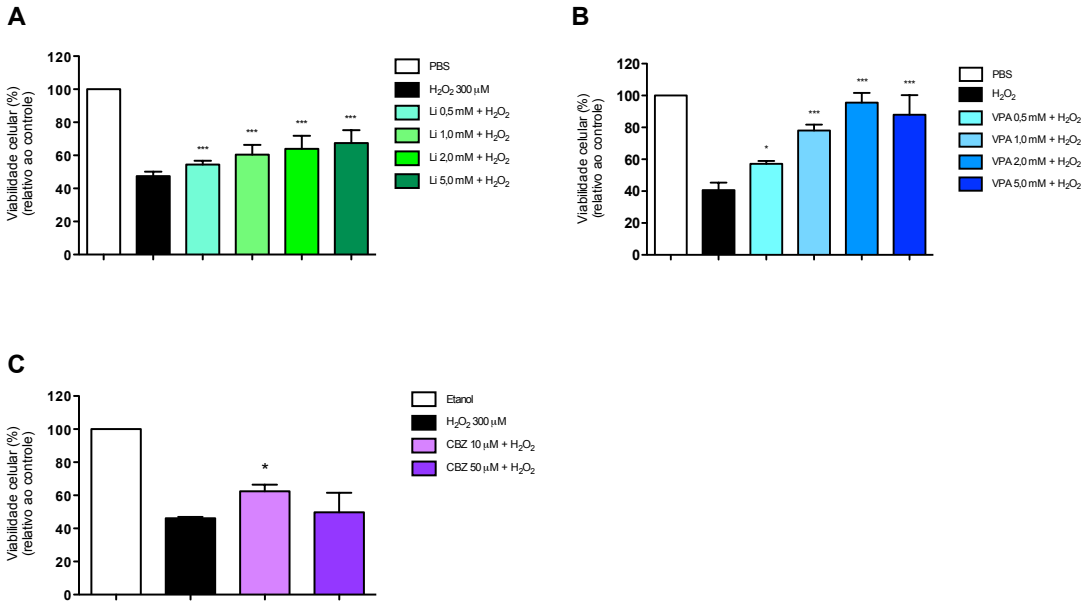


Figura 33. Pré-tratamento com Li, VPA e CBZ causa resistência ao dano celular induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em células PC12. As células (N = 6) foram pré-tratadas com as concentrações indicadas de (A) lítio (Li), (B) valproato (VPA), (C) carbamazepina (CBZ) ou seus respectivos veículos por 24 h e logo em seguida 300 µM de H_2O_2 foi adicionado a cultura por mais 24 h. Após, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Nestas condições, todos os fármacos foram capazes de determinar um efeito protetor dependente da concentração. Os resultados estão apresentados como porcentagem (%) média de viabilidade celular normalizada pelo grupo tratado com PBS ± SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (*one way* ANOVA).

4.1.3 Fármacos estabilizadores do humor modulam os níveis protéicos de Ncs-1 *in vivo.*

Os experimentos *in vitro* deste estudo revelaram que diferentes fármacos estabilizadores do humor, a saber, Li, VPA e LTG foram capazes em induzir a expressão de Ncs-1 em células PC12. Diferente da literatura científica, este efeito ocorreu independentemente de dano celular, já que as concentrações testadas não reduziram a viabilidade das células. Baseando-se nestes dados preliminares, hipotetizou-se que a indução da expressão de Ncs-1 poderia estar relacionada com o mecanismo farmacológico dos compostos testados e, por conseguinte, seria interessante avaliar se este mesmo efeito sobre a expressão de Ncs-1 poderia ocorrer *in vivo*. Para isso, foram realizados tratamentos crônicos com Li, VPA e LTG em camundongos. Tais fármacos foram os escolhidos em virtude do efeito previamente observado sobre o conteúdo intracelular de Ncs-1 *in vitro*. Terminado o tratamento, o cérebro dos animais foi removido para a avaliação dos níveis de Ncs-1.

O tratamento crônico foi realizado de acordo com dados em publicação do nosso grupo mostrando que, nestas condições, todos os três fármacos, guardando-se as devidas proporções, possuem eficácia antidepressiva e ansiolítica. Para este tratamento crônico, os animais foram expostos aos fármacos por 15 (Li) ou 21 dias (VPA e LTG). Findo o último dia tratamento (15° ou 21° dia), os animais foram decapitados e os tecidos cerebrais foram imediatamente dissecados e armazenados a -80 °C.

O efeito do tratamento crônico sobre a expressão cerebral de Ncs-1 variou tanto entre as regiões cerebrais investigadas quanto aos fármacos empregados. Por exemplo, VPA e Li foram capazes de induzir a expressão de Ncs-1 no córtex frontal em cerca de 76% ($p < 0,01$) e 96% ($p < 0,01$), respectivamente (Figura 34 A e B). No entanto, nenhum efeito destes fármacos sobre a expressão de Ncs-1 foi observada no estriado (Figura 34 C e D). Interessantemente, o tratamento com LTG acarretou em um efeito oposto ao observado para

Li e VPA, já que diminuiu expressão de Ncs-1. Além disso, LTG obteve ação sobre as duas regiões cerebrais analisadas, onde foi encontrada uma redução da expressão de Ncs-1 em cerca de 65% ($p < 0,05$) e 64% ($p < 0,05$) no córtex frontal e estriado, respectivamente (Figura 34 A-D).

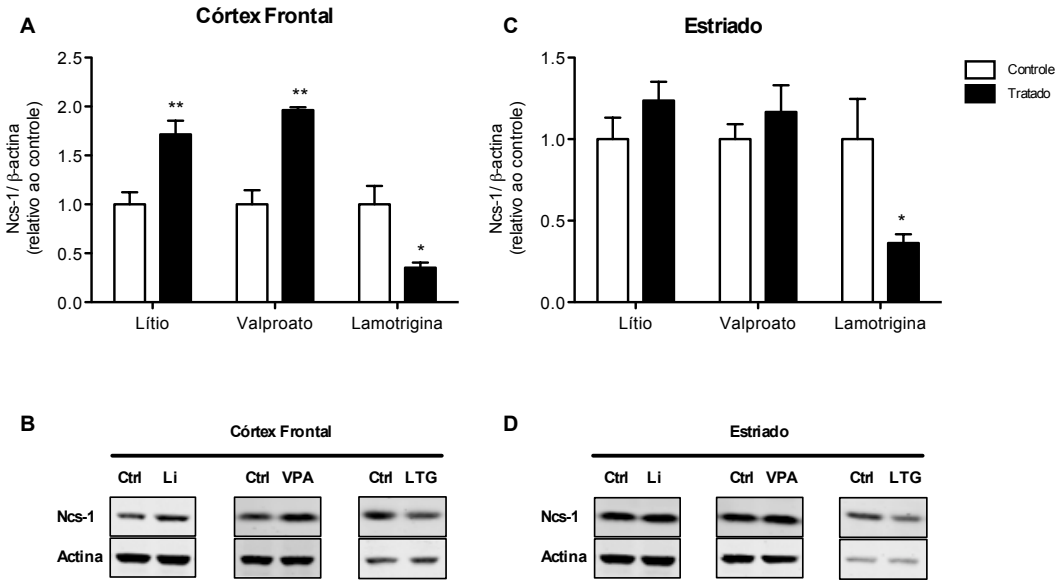


Figura 34. Tratamento crônico com estabilizadores do humor modulam a expressão de Ncs-1 no cérebro de camundongos. Os animais da linhagem C57 B/L WT foram expostos ao Li (0,12% por dia administrado na água, ingestão livre, N = 5 animais), VPA (misturado a ração que corresponde a 25 mg/kg por dia, ingestão livre, N = 5 animais) ou LTG (20 mg/kg por dia dissolvido em água e tween 1%, i.p., N = 5 animais) por 15 (Li) ou 21 (VPA e LTG) dias consecutivos. Para cada fármaco testado, um grupo de 5 animais administrado com o veículo de diluição do composto correspondente foi utilizado como grupo controle. (A e B) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de actina) no córtex frontal ou estriado (C e D) após o tratamento crônico. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/actina encontrado no grupo controle correspondente. Ctrl: controle; Li: cloreto de lítio; VPA: valproato de sódio; LTG: lamotrigina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t teste).

Assim como encontrado em células PC12, o tratamento *in vivo* com Li e VPA foi capaz de elevar os níveis de Ncs-1.

A próxima pergunta do trabalho foi avaliar se o efeito destes fármacos sobre a expressão de Ncs-1 difere entre o regime de tratamento crônico e agudo. Em outras palavras, esta comparação visa saber se o aumento de Ncs-1 está (ou não) especificamente associado com a fase de resposta terapêutica do tratamento farmacológico. Isso decorre, em geral, ao fato do tratamento agudo com Li, VPA e LTG não ser reportado exercer benefício terapêutico em modelos animais, apesar de algumas divergências (BEAULIEU *et al.*, 2009; CAN *et al.*, 2011). Apesar desta particularidade ainda não ser bem entendida, a comparação dos efeitos bioquímicos em animais tratados cronicamente ou com uma simples dose, é, até certo ponto, interessante para diferenciar os efeitos terapêuticos daqueles secundários mediados por estabilizadores do humor. Para tal, o tratamento agudo foi realizado em camundongos com uma aplicação intraperitoneal (i.p.) única de uma dose mais alta que a dose diária utilizada no tratamento crônico. Os animais foram decapitados 30 minutos (Li), duas horas (VPA) ou uma hora (LTG) após a administração dos fármacos para se quantificar os níveis cerebrais de Ncs-1. Para este tipo de tratamento, a análise da expressão de Ncs-1 foi realizada apenas no córtex frontal pois o objetivo do experimento foi avaliar se, a curto prazo, existe ou não o mesmo perfil de elevação de Ncs-1 nesta região como observado no tratamento crônico.

Ao contrário do tratamento crônico, Li e VPA não foram capazes de induzir a expressão de Ncs-1 através do tratamento agudo (Figura 35 A e B). Apesar de diminuir a expressão de Ncs-1 através do tratamento crônico, a LTG, surpreendentemente, foi capaz de induzir os níveis da proteína em cerca de 29% no regime de tratamento agudo ($p < 0,05$) (Figura 35A e B).

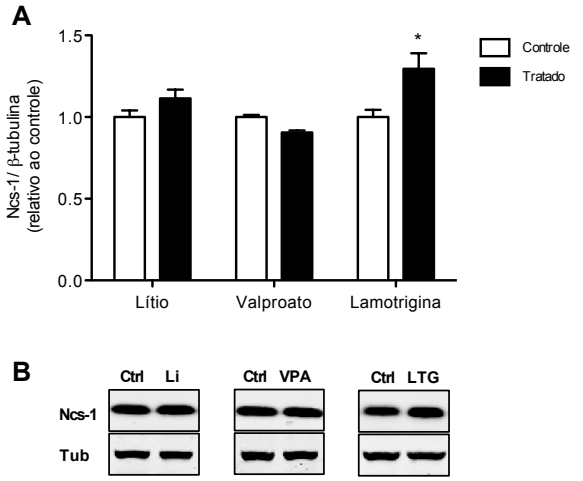


Figura 35. Efeito do tratamento agudo com estabilizadores do humor na expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos. Os animais da linhagem C57 B/L WT foram injetados intraperitonialmente (i.p.) com Li (200 mg/kg, diluído em NaCl 0,9%, N = 5), VPA (400 mg/kg, diluído em NaCl 0,9%, N = 5) ou LTG (20 mg/kg, diluído em água e tween 1%, N = 5) e após 30 min (Li), 2 h (VPA) ou 1 h (LTG), foram decapitados. Para cada fármaco testado, um grupo de 5 animais administrados intraperitonialmente com o veículo de diluição do composto correspondente foi utilizado como grupo controle. (A e B) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) no córtex frontal após o tratamento. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. Ctrl: controle; Li: cloreto de lítio; VPA: valproato de sódio; LTG: lamotrigina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t teste).

Os resultados obtidos através do tratamento crônico com estabilizadores do humor *in vivo* reforçam a idéia de que Li e VPA, mas não LTG, possuem a mesma habilidade em induzir um aumento localizado na expressão cerebral do Ncs-1.

4.1.4 Efeito do tratamento com fármacos estabilizadores do humor nos níveis de RNAm de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*

Como o tratamento *in vitro* e *in vivo* com Li, VPA e LTG teve a capacidade de modular os níveis protéicos de Ncs-1, o próximo passo do estudo para avaliar a relação entre estes fármacos e Ncs-1 foi quantificar os níveis de RNAm de Ncs-1 após a exposição farmacológica.

O tratamento com Li, VPA ou LTG em células PC12 por 1, 4, 12 e 24 horas revelou que apenas o VPA foi capaz de induzir os níveis de RNAm de Ncs-1 (Figura 36 A). Este efeito, cerca de 5,5 vezes a mais que aquele observado no grupo controle, foi observado após 24 h de tratamento ($p < 0,01$). A avaliação dos níveis de RNAm de Ncs-1 *in vivo* foi realizada no córtex frontal de animais tratados cronicamente com Li ou VPA. O efeito da LTG *in vivo* sobre os níveis de RNAm de Ncs-1 não foi avaliado já que, após este ponto, o estudo foi direcionado para entender os efeitos mediados por Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1. Os experimentos mostraram que, assim como em células PC12, o VPA, mas não o Li, foi capaz de induzir a expressão de Ncs-1 (Figura 36 B). Nestas condições, observou-se que VPA aumentou os níveis de RNAm de Ncs-1 em cerca de 50% no córtex frontal de camundongos ($p < 0,05$).

Estes resultados indicam que apesar de Li e VPA determinarem efeitos similares sobre a expressão dos níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*, apenas o VPA foi capaz de causar indução da expressão genética de Ncs-1. Interessantemente, estes efeitos foram replicados entre células PC12 (rato) e camundongos.

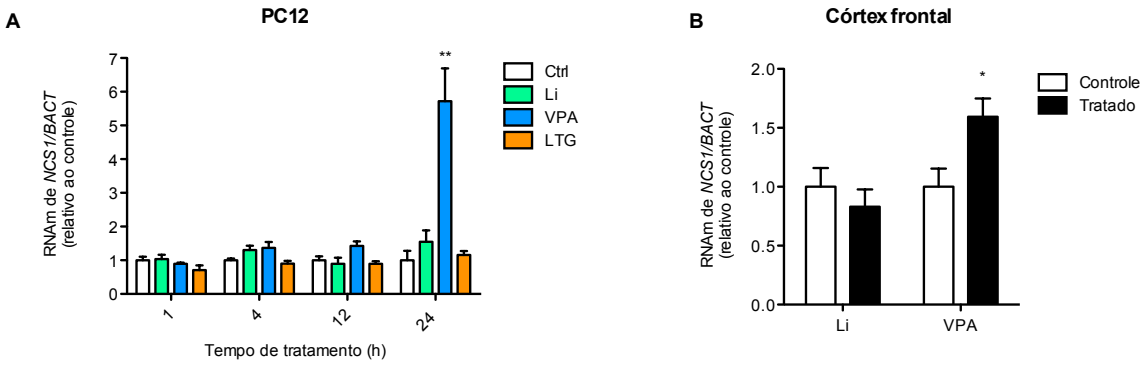


Figura 36. Efeito do tratamento com fármacos estabilizadores do humor sobre os níveis de RNAm de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*. (A) Tratamento com VPA elevou os níveis de RNAm de Ncs-1 em células PC12. Representação gráfica da quantificação de RNAm de Ncs-1 relativa ao controle. As células (N = 4) foram tratadas com Li (1,0 mM), VPA (0,625 mM), LTG (100 μM) ou com veículo de diluição farmacológico (Ctrl) por 1, 4, 12 ou 24 horas. (B) Tratamento com VPA elevou os níveis de RNAm de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos tratados cronicamente. Representação gráfica da quantificação de RNAm de Ncs-1 relativa ao controle. Os animais da linhagem C57 B/L WT foram expostos ao Li (0,12% por dia administrado na água, ingestão livre, N = 5 animais) ou VPA (misturado a ração que corresponde a 25 mg/kg por dia, ingestão livre, N = 5 animais) por 15 (Li) ou 21 (VPA) dias consecutivos. Para cada fármaco testado, um grupo de 5 animais administrado com o veículo de diluição do composto correspondente foi utilizado como grupo controle. Para todos as análises, os níveis de RNAm do gene *NCS-1* estão normalizados pelos níveis de RNAm de *ACTB* (gene da actina beta), relativo ao grupo experimental controle nos respectivos tempos. Ctrl: controle; Li: cloreto de lítio; VPA: valproato de sódio. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t teste).

4.1.5 Efeito da modificação de histonas sobre os níveis protéicos de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*

Os resultados anteriores mostraram que o VPA, mas não o Li, possui a habilidade de induzir a expressão genética de Ncs-1. Apesar do conhecimento a respeito dos mecanismos farmacológicos destes compostos ainda ser limitado, o VPA é amplamente reconhecido como um inibidor competitivo de histonas deacetilases (PHIEL *et al.*, 2001). As enzimas histonas deacetilases removem grupos "acetil" das proteínas histonas, as quais sofrem uma modificação conformacional para um estado menos relaxado. Esta modificação causa uma maior compactação do DNA, dificultando a sua interação com fatores de transcrição. O significado fisiológico deste processo é a redução da expressão genética local. Agindo como um inibidor de histona deacetilase, o VPA mantêm níveis elevados de histonas acetiladas e expressão genética (CHETCUTI *et al.*, 2006). De fato, muitos estudos têm associado as propriedades neuroplásticas e terapêuticas do VPA devido a indução da expressão de genes correlacionados através da modificação de histonas (ROSENBERG, 2007). Levando-se em conta estas evidências, o próximo passo do estudo para entender a ação de fármacos estabilizadores do humor sobre a expressão de Ncs-1 foi avaliar se a modificação de histonas está associada com a indução de Ncs-1.

Para tal, células PC12 ou animais foram tratados com compostos inibidores específicos de histona deacetilase e, em seguida, a expressão de Ncs-1 foi avaliada através de western blot.

No experimento *in vitro,* células PC12 foram tratadas com SAHA (*Suberoylanilide hydroxamic acid* ou *Vorinostat*), um inibidor específico das classes I e II de histona deacetilases, por 1, 6, 12 e 24 h nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 mM. Tais concentrações foram as escolhidas baseando-se em estudos anteriores mostrando que elas são eficientes em induzir aumento dos níveis de acetilação de histonas das classes I e II (MARKS;

DOKMANOVIC, 2005). Os resultados deste experimento mostraram que a concentração de SAHA de 5,0 mM pôde induzir em cerca de 60% a expressão de Ncs-1 após 6 h de tratamento ($p < 0,05$) (Figura 37 A).

Para o experimento *in vivo*, animais C57/BL foram tratados com MS275 (entinostat), um inibidor de histona deacetilase de classes I (SIMONINI *et al.*, 2006). O regime de tratamento empregado neste estudo foi baseado nos dados da literatura mostrando sua eficácia em induzir os níveis de acetilação de histonas. Além disso, nestas condições, este tratamento farmacológico possui propriedades antidepressivas (LIN, H. *et al.*, 2012). Apesar de não alterar a expressão de Ncs-1 no córtex frontal, o tratamento com MS275 causou redução da expressão de Ncs-1 no estriado de camundongos ($p < 0,01$) (Figura 37 B).

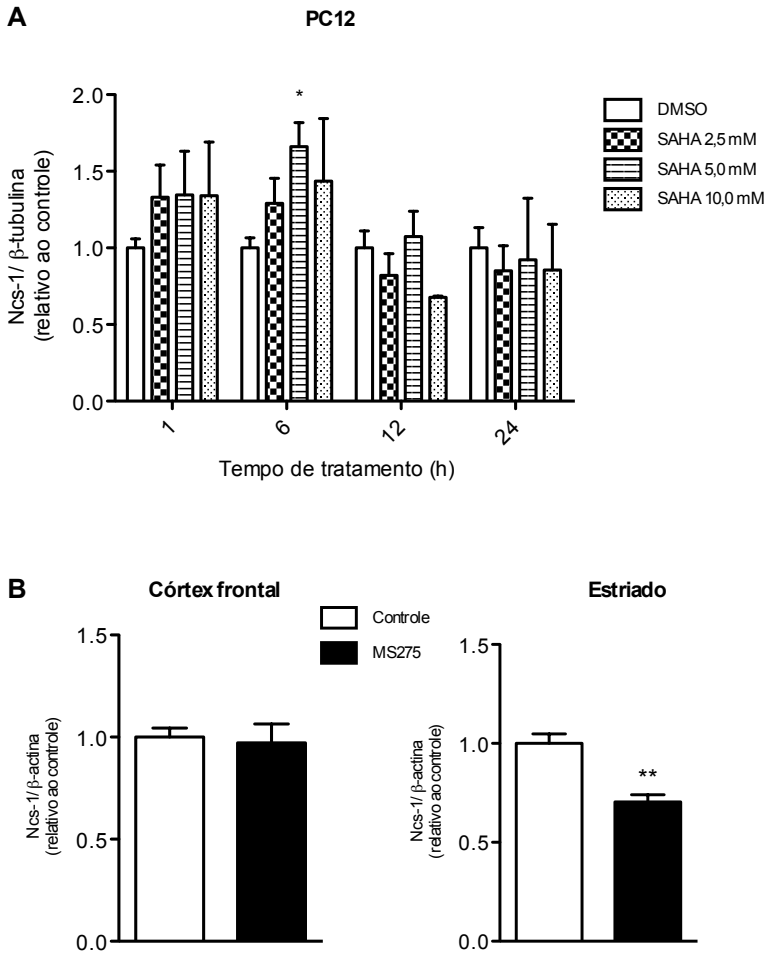


Figura 37. Efeito do tratamento com inibidores de histona deacetilase sobre a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*. (A) Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram tratadas com três diferentes concentrações de SAHA (2,5; 5,0 e 10,0 mM) ou com DMSO 0,01% por 1, 6, 12 ou 24 horas. (B) Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de actina) no córtex frontal de camundongos C57 B/L WT. Os animais foram administrados com uma injeção intraperitoneal de MS275 (20 mg/kg dissolvido em água e tween 1%, N = 5 animais) ou uma solução de água e tween 1% (N = 5 animais). Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/actina encontrado no grupo controle correspondente. MS275 e SAHA são inibidores de histona deacetilase de classe I ou I/II, respectivamente. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t teste).

4.1.6 Fármacos estabilizadores do humor inibem Gsk3β

Os resultados deste estudo mostram que Li e VPA aumentam a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*. A partir de então, as próximas questões visaram entender qual a via de sinalização intracelular, previamente reportada sendo alvo destes fármacos, poderia estar relacionada com a "transmissão farmacológica" dos efeitos mediados por Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1. Para tal, o ponto de partida foi avaliar o estado funcional da proteína Gsk3β.

Diversas linhas de evidências têm, cada vez mais, reforçando a hipótese de que a inibição da Gsk3β via fosforilação da Ser9 (que causa inibição da atividade quinase na enzima) é crucial para sucesso dos efeitos terapêuticos dos fármacos estabilizadores do humor em modelos animais (BEAULIEU *et al.*, 2009). Desta forma, para avaliar a relação entre estabilizadores do humor, Gsk3β e Ncs-1, os níveis de fosforilação de Gsk3β no resíduo Ser9 (p-Ser9), um medidor do seu estado funcional, foi experimentalmente avaliada.

As condições escolhidas para tal foram aquelas que, após o tratamento com estabilizadores do humor, observaram-se aumento nos níveis de Ncs-1. A saber *in vitro*: Li 0,5; 1,0 e 1,5 mM (por 6 h) e VPA 0,625 mM (por 3 h). Para determinação *in vivo*, a expressão de Gsk3β p-Ser9 foi avaliadoa após o tratamento crônico em camundongos com Li e VPA.

Observou-se nas amostras de PC12 que todas os regimes de tratamento avaliados foram capazes de aumentar os níveis de Gsk3β p-Ser9 sem causar mudanças na expressão total de Gsk3β (Figura 38 A). De forma semelhante, como esperado, o tratamento crônico em camundongos com Li e VPA também aumentou a expressão de Gsk3β p-Ser9 sem alterar o nível protéico total de Gsk3β (Figura 38 B).

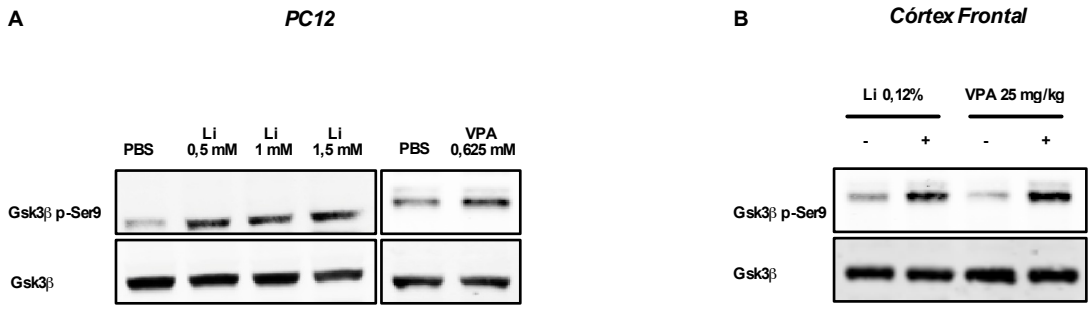


Figura 38.Li e VPA aumentam os níveis de Gsk3β p-Ser9 *in vitro* e *in vivo*. (A) Representação densitométrica dos níveis de Gsk3β p-Ser9 e Gsk3β em PC12. (A) Células PC12 (N = 4) foram tratadas com três diferentes concentrações de Li (0,5; 1,0 e 1,0 mM) por 6 h, VPA 0,625 mM por 3 h ou com PBS nos respectivos tempos. (B) Representação densitométrica dos níveis de Gsk3β p-Ser9 e Gsk3β no córtex frontal de camundongos C57 B/L WT. Os animais foram expostos ao Li (0,12% por dia administrado na água, ingestão livre, N = 5 animais) ou VPA (misturado a ração que corresponde a 25 mg/kg por dia, ingestão livre, N = 5 animais) por 15 (Li) ou 21 (VPA) dias consecutivos. Para cada fármaco testado, um grupo de 5 animais administrado com o veículo de diluição do composto correspondente foi utilizado como grupo controle. Li: cloreto de lítio; VPA: valproato de sódio.

Estes resultados indicam que a atividade de Gsk3β está reduzida nas condições em que Li e VPA aumentam a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*, o que sugere a existência de associação entre inibição de Gsk3β e aumento da expressão de Ncs-1.

4.1.7 Efeito do Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1 *in vivo* é dependente de βarr2 e D2R.

Os resultados deste estudo até o momento sugerem a inibição de Gsk3 como uma possível modificação farmacológica relacionada com o aumento de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos e em células da linhagem PC12. Vale ressaltar que em 2008 foram publicados resultados mostrando que o efeito ansiolítico e antidepressivo do Li (em modelos animais) é dependente do complexo de sinalização formado por βarr2/PP2A/Akt (BEAULIEU; MARION; *et al.*, 2008a). Este estudo ainda mostrou que o Li perde seu efeito inibitório sobre Gsk3β em animais deficientes de formação do complexo βarr2/PP2A/Akt. Esses achados, além de revelar um interessante mecanismo de ação do Li envolvendo D2R, βarr2, PP2A e Akt, também reforça a teoria de que a inibição de Gsk3 está fortemente relacionada com o benefício terapêutico em doenças neuropsiquiátricas. Recentemente, resultados ainda não publicados originados do laboratório do Prof. Dr. Beaulieu têm mostrado que outros fármacos estabilizadores do humor, como VPA e LTG, dependem da integridade do complexo βarr2/PP2A/Akt para inibir Gsk3β e ter eficácia ansiolítica e antidepressiva em camundongos. Baseando-se nestas evidências, acredita-se que a via de sinalização βarr2-PP2A-Akt-Gsk3β possa desempenhar um papel chave para ocorrência dos efeitos terapêuticos de fármacos estabilizadores do humor.

A hipótese levantada por este estudo foi que a inibição de Gsk3β poderia estar associada com a indução dos níveis de Ncs-1, observada após o tratamento com Li e VPA. Para avaliar esta hipótese, foi realizado um novo tratamento crônico com Li e VPA em duas linhagens de camundongos que, no entanto, não causaria nenhum efeito sobre a atividade de Gsk3β devido a uma modificação genética. Com esta finalidade, foram empregados animais nocautes para βarr2 e D2R. A ausência constitutiva de qualquer uma destas proteínas é suficiente para que não haja formação do complexo βarr2/PP2A/Akt e, consequentemente,

efeito dopaminérgico e de FEHs sobre a função de Gsk3β (BEAULIEU et al., 2008; dados não publicados). Se os fármacos não mais apresentarem efeito sobre a expressão de Ncs-1 nestas condições, seria uma evidência de que a ação de FEHs testados dependeria da ação em Gsk3β para sortir efeitos sobre a expressão de Ncs-1.

Para excluir a possibilidade de que as linhagens de camundongo nocautes βarr2 e D2R (βarr2$^{-/-}$ e D2R$^{-/-}$, respectivamente) possuíssem níveis alterados de Ncs-1 e consequentemente mascarar os resultados obtidos do tratamento farmacológico, o córtex frontal de animais da mesma ninhada (βarr2 x WT; D2R x WT) foi removido para as análises de western blot.

Nenhuma diferença estatística foi encontrada quando comparou-se os níveis de expressão de Ncs-1 entre animais selvagens, βarr2 e D2R (Figura 39).

Em seguida, o tratamento crônico em animais βarr2$^{-/-}$ e D2R$^{-/-}$ com estabilizadores do humor foi realizado da mesma forma como reportado previamente em animais selvagens. A saber, Li (0,12% por dia administrado na água, ingestão livre, n = 5 animais), VPA (misturado a ração que corresponde a 25 mg/kg por dia, ingestão livre, n = 5 animais) e LTG (20 mg/kg por dia dissolvido em água e tween 1%, i.p., n = 5 animais) por 15 (Li) ou 21 (VPA e LTG) dias consecutivos. Neste regime, os animais foram decapitados no fim do último dia de tratamento (15° ou 21° dia) e o córtex frontal foi removido para as análises posteriores. Apenas a LTG aumentou a expressão de Ncs-1 em 72% no córtex frontal de animais βarr2$^{-/-}$ ($p < 0,05$) (Figura 40). Estes resultados indicam que a formação do complexo βarr2/PP2A/Akt é fundamental para que Li e VPA possam aumentar a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos. Possivelmente, esta perda de efeito farmacológico sobre a expressão de Ncs-1 seja devido a ausência do efeito dos fármacos sobre a atividade de Gsk3β nos animais modificados geneticamente.

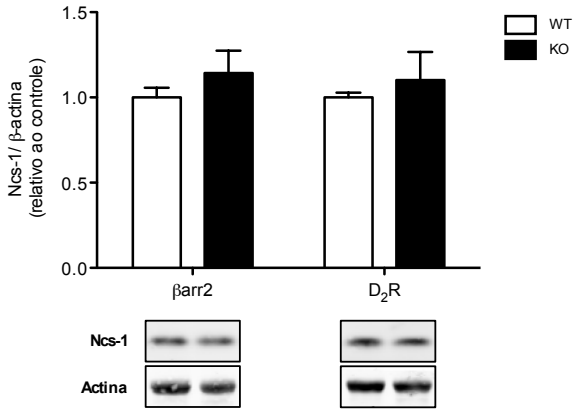


Figura 39.Camundongos nocautes de βarr2 e D2R não possuem níveis alterados de Ncs-1 no córtex frontal. Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de actina) no córtex frontal de animais da linhagem C57 B/L selvagem (WT, N = 5 animais) ou nocautes (KO) para βarr2 (N = 5 animais) e D2R (N = 5 animais). Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/actina encontrado no grupo de animais WT de mesma ninhada originados pelo acasalamento entre heterozigotos. βarr2: beta arrestina 2; D2R: receptor de dopamina tipo 2. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM (t teste).

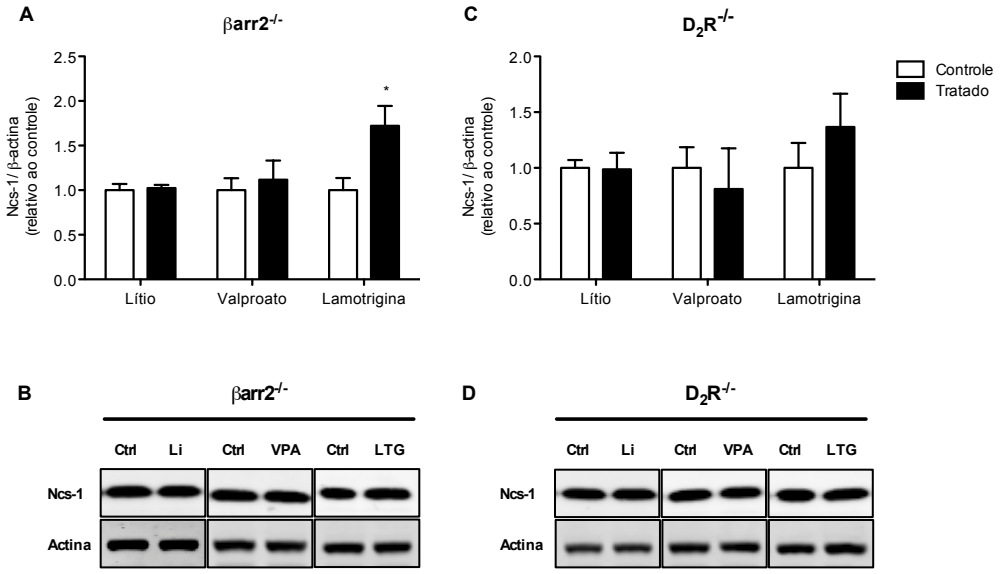


Figura 40. Tratamento crônico com Li e VPA não modulam a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos nocautes para βarr2 e D2R. Os animais da linhagem C57 B/L nocautes (KO) para βarr2 e D2R foram expostos ao Li (0,12% por dia administrado na água, ingestão livre, N = 5), VPA (misturado a ração que corresponde a 25 mg/kg por dia, ingestão livre, N = 5) ou LTG (20 mg/kg por dia dissolvido em água e tween 1%, i.p., N = 5) por 15 (Li) ou 21 (VPA e LTG) dias consecutivos. Para cada fármaco testado, um grupo de 5 animais administrado com o veículo de diluição do composto correspondente foi utilizado como grupo controle. (A e B) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de actina) no córtex frontal de animais βarr2$^{-/-}$ ou D2R$^{-/-}$ (C e D) após o tratamento. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/actina encontrado no grupo controle correspondente. Ctrl: controle; Li: cloreto de lítio; VPA: valproato de sódio; LTG: lamotrigina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$ (t teste).

4.1.8 TDZD-8, um inibidor específico de Gsk3, aumenta a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*

Resultados deste estudo corroboram que o tratamento com FEHs inibe a atividade Gsk3β (BEAULIEU *et al.*, 2009). Além disso, foi encontrado que o tratamento com Li e VPA aumenta a expressão de Ncs-1 em animais selvagens, no entanto, este efeito é abolido em camundongos deficientes de formação do complexo βarr2/PP2A/Akt. Interessantemente, também já foi mostrado que o lítio perde seu efeito inibitório sobre a atividade de Gsk3β nestes animais. Acredita-se que a ausência de efeitos comportamentais do lítio no animal βArr2 seja devido a ausência da inibição de Gsk3β. De fato, recentes estudos têm apontado que muitos alvos dos FEHs estão relacionados com via de sinalização de Gsk3β, que uma vez inibida por estes compostos, favorece modificações moleculares relacionadas com o efeito estabilizador do humor (HARWOOD, A. J.; AGAM, 2003).

Para testar diretamente se o efeito negativo sobre a via de sinalização mediada por Gsk3β é responsável pelo aumento dos níveis de Ncs-1, foram realizados tratamentos *in vitro* e *in vivo* com TDZD-8 (*4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione*) e, em seguida, a expressão de Ncs-1 foi mensurada. O TDZD-8 é reportado inibir especificamente as isoformas Gsk3β e Gsk3α e é, portanto, amplamente utilizado em estudos que avaliam os efeitos da inibição de Gsk3 no comportamento e vias de sinalização farmacológicas (MARTINEZ, A. *et al.*, 2002).

Células PC12 foram expostas a uma concentração de 10 μM de TDZD-8 ou DMSO por 1, 3, 6, 12 e 24 horas e, em seguida, a expressão de Ncs-1 e tubulina foi mensurada por *western blot*. Este tratamento revelou que em 1 h o TDZD-8 foi capaz de induzir um aumento de 69% na expressão de Ncs-1 ($p < 0,05$) (Figura 41 A e B). Para o tratamento *in vivo*, camundongos C57 B/L WT ($n = 5$) foram administrados i.p. com uma dose única de 30

mg/kg de TDZD-8 ou solução salina a 0,9% (n = 5) e após uma hora foram decapitados para a análise da expressão de Ncs-1 no córtex frontal e estriado. As análises densitométrica do western blot revelaram que o TDZD-8 proporcionou um aumento de 17% da expressão de Ncs-1 no córtex frontal ($p < 0,05$) (Figura 41 C e D). No entanto, nenhuma diferença estatística da expressão de Ncs-1 entre os grupos tratados e controle foi observada no estriado (Figura 41 E e F).

Estes resultados indicam que a inibição direta de Gsk3 pelo TDZD-8 induz a expressão dos níveis de Ncs1 *in vitro* e *in vivo*.

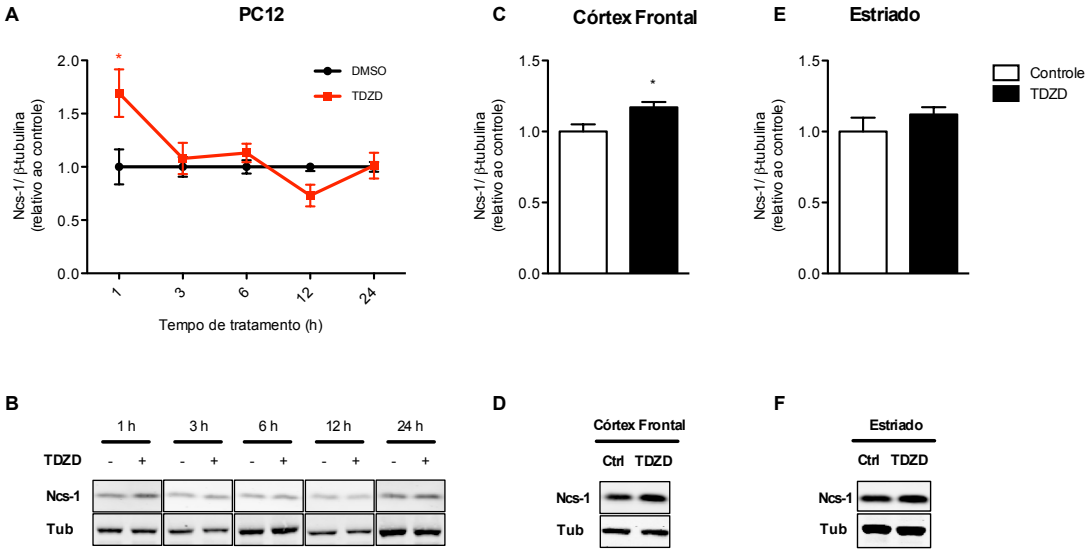


Figura 41. Tratamento com TDZD-8, um inibidor seletivo de Gsk3, aumenta a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos. (A e B) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram expostas a uma concentração de 10 µM de TDZD-8 ou DMSO 0,01% por 1, 3, 6, 12 e 24 horas e, em seguida, a expressão de Ncs-1 e tubulina foi mensurada por *western blot*. (C-F) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em camundongos da linhagem C57 B/L WT após tratamento com TDZD-8. Os animais foram administrados i.p. com uma dose única de 30 mg/kg de TDZD-8 (diluído em água e tween 1%, N = 5) ou água e tween 1% (N = 5) e após uma hora foram decapitados para a análise da expressão de Ncs-1 no córtex frontal (C e D) e estriado (E e F). Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. TDZD: TDZD-8; Ctrl: controle; Tub: tubulina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$ (*one way* ANOVA em A ou t teste em C e E).

4.1.9 Diminuição específica da expressão de Gsk3α ou Gsk3β não altera os níveis cerebrais de Ncs-1.

Os resultados deste estudo mostraram que a inibição farmacológica de Gsk3 com TDZD-8 possibilitou a indução da expressão de Ncs-1. Além disso, estes dados preliminares também sugerem que o efeito mediado por Li e VPA sobre Gsk-3/Ncs-1 é dependente da integridade do complexo βarr2/PP2A/Akt. Por exemplo, estes fármacos perderam o efeito sobre Gsk3 (inibitório) e Ncs-1 (estimulatório) em animais $\beta arr2^{-/-}$ e $D2R^{-/-}$.

Como existem duas isoformas de Gsk3 codificadas por diferente genes, Gsk3α e Gsk3β, o objetivo dos experimentos seguintes foi avaliar o efeito da diminuição ou ausência, especificamente, de cada uma das isoformas sobre a expressão de Ncs-1. Dentre os diversos inibidores de Gsk3 disponíveis, como o TDZD-8, nenhum deles é capaz de inibir especificamente cada uma das isoformas Gsk3α e Gsk3β (MARTINEZ, A. *et al.*, 2002). Neste sentido, a estratégia encontrada para investigar os efeitos independentes de cada isoforma foi medir a expressão de Ncs-1 no cérebros de animais com ausência geneticamente determinada de Gsk3α (animais nocautes, $Gsk3\alpha^{-/-}$) ou diminuição de Gsk3β (animais heterozigotos, $Gsk3\beta^{+/-}$). Particularmente para Gsk3β, o animal heterozigoto $Gsk3\beta^{+/-}$ foi utilizado pelo fato de que os embriões com deleção em homozigose do gene ($Gsk3\beta^{-/-}$) não chegarem a termo (JOPE; ROH, 2006).

Os resultados do western blot a partir de extratos protéicos do córtex frontal não mostraram nenhuma alteração na expressão de Ncs-1 em animais $Gsk3\alpha^{-/-}$ ou $Gsk3\beta^{+/-}$ em comparação com seus respectivos controles selvagens de mesma ninhada (Figura 42 A-C).

Animais $Gsk3\beta^{-/+}$ possuem em torno de 50% de expressão de Gsk3β (LATAPY *et al.*, 2012). Sendo assim, este estudo propôs um novo modelo experimental que proporcionasse uma maior redução da expressão de Gsk3β. Além disso, que tal redução fosse limitada a

áreas corticais superiores onde o aumento da expressão de Ncs-1 foi detectada diante da inibição de Gsk3. Para tal, a expressão de Ncs-1 foi quantificada em animais Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ os quais possuem uma depleção de Gsk3β especificamente no prosencéfalo (Figura 43) (LATAPY *et al.*, 2012). Essa depleção de Gsk3β condicionada ao prosencéfalo também é interessante uma vez que a inibição de Gsk3 no córtex frontal, mas não no estriado, esteve relacionada com o aumento dos níveis de Ncs-1.

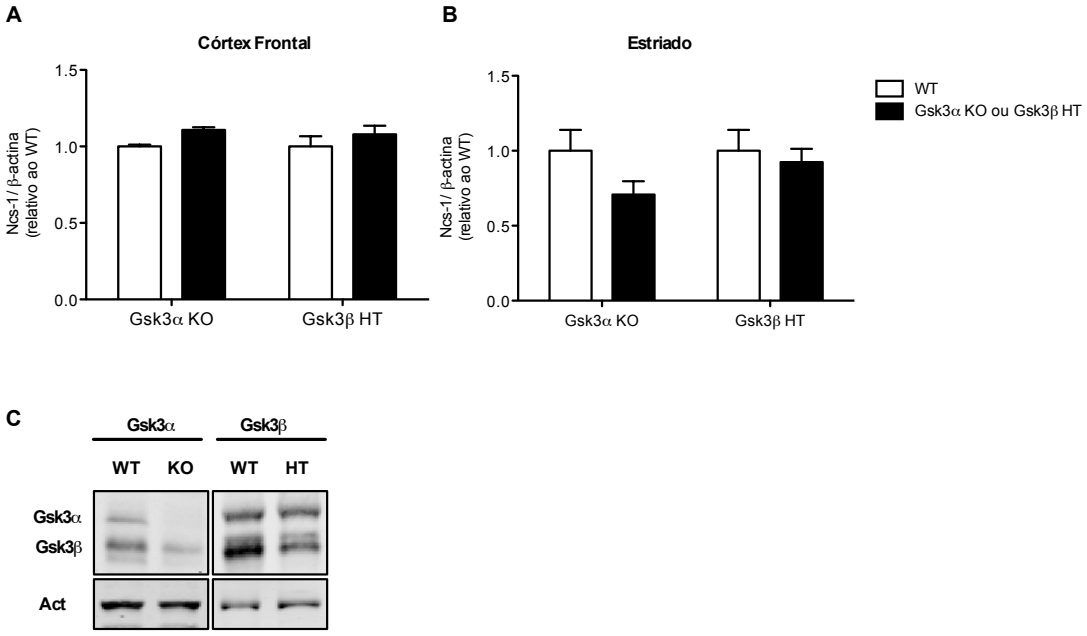


Figura 42. Camundongos Gsk3α$^{-/-}$ ou Gsk3β$^{+/-}$ não possuem níveis alterados de Ncs-1 no córtex frontal e estriado. Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de actina) no (A) córtex frontal e (B) estriado de animais da linhagem C57 B/L selvagem (WT, N = 5 animais), nocautes (KO) para Gsk3α (Gsk3α$^{-/-}$; N = 5 animais) ou heterozigotos para Gsk3β (Gsk3β$^{-/+}$; n = 5 animais) (C). Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/actina encontrado no grupo de animais WT de mesma ninhada originados pelo acasalamento entre heterozigotos. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM (t teste).

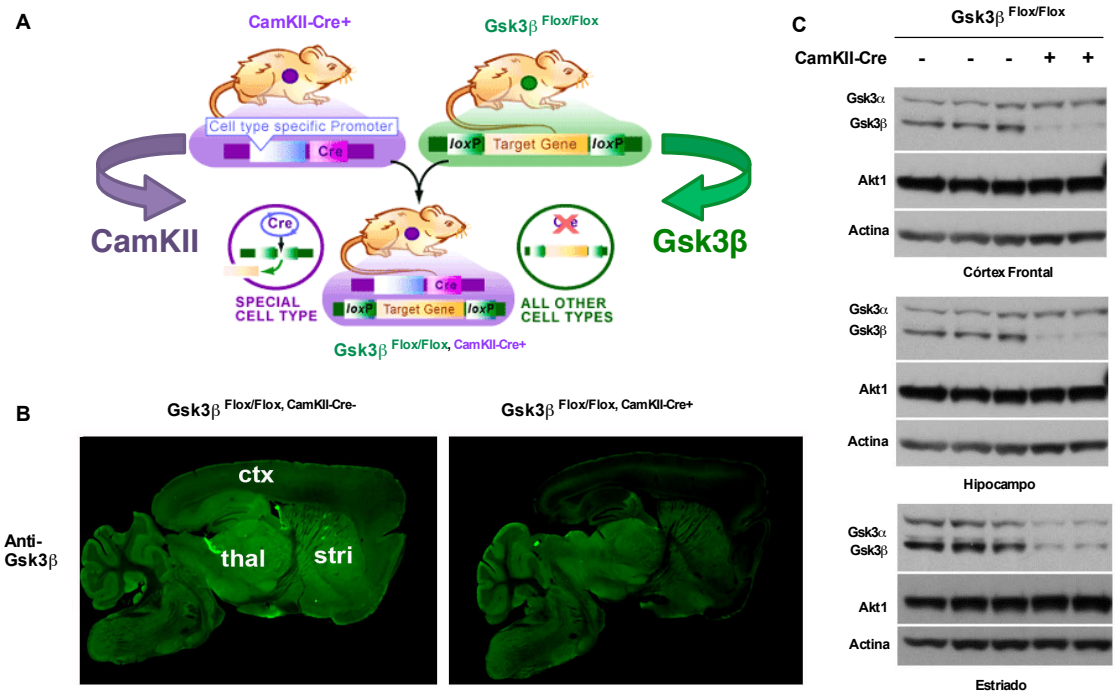


Figura 43. Animais Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ possuem depleção de Gsk3β especificamente no prosencéfalo. (A) O animal Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ é o resultado do acasalamento das linhagens de camundongos CamKII-Cre+ (os quais expressam a enzima Cre recombinase sob o controle específico do promotor do gene *CaMKII*) e Gsk3β$^{Flox/Flox}$ (os quais possuem o gene *GSK3β* flanqueado por dois sítios loxP). A expressão da Cre recombinase causa a excisão do gene *GSK3β* através dos sítios loxP nos animais Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ [imagem online modificada, disponível em: <http://www.scq.ubc.ca>. Acessado em 08/01/2012]. (B) Corte sagital do cérebro de camundongos Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre-}$ mostrando expressão global de Gsk3β em todas as regiões (esquerda), e animais Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ com depleção Gsk3β especificamente no prosencéfalo (direita). ctx: córtex frontal; thal: tálamo; stri: estriado. (C) Análises de western blot mostram que os níveis de Gsk3β, mas não de Gsk3α e Akt1, estão diminuídos no cérebro de camundongos Gsk3β$^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ (LATAPY *et al.*, 2012).

As análises de western blot revelaram uma redução de cerca de 73% ($p < 0,001$) da exprtessão de Gsk3β assim como uma leve diminuição de 22% da expressão de Gsk3β p-Ser9 ($p < 0,05$) no córtex frontal de animais $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ em comparação com os animais $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre-}$ (Figura 44 A, B e D). No entanto, nestas condições, nenhuma diferença na expressão de Ncs-1 foi encontrada (Figura 44 C e D). Juntos, estes dados sugerem que a inibição mútua das isoformas Gsk3α e Gsk3β são necessárias para ocorrer a indução dos níveis protéicos de Ncs-1.

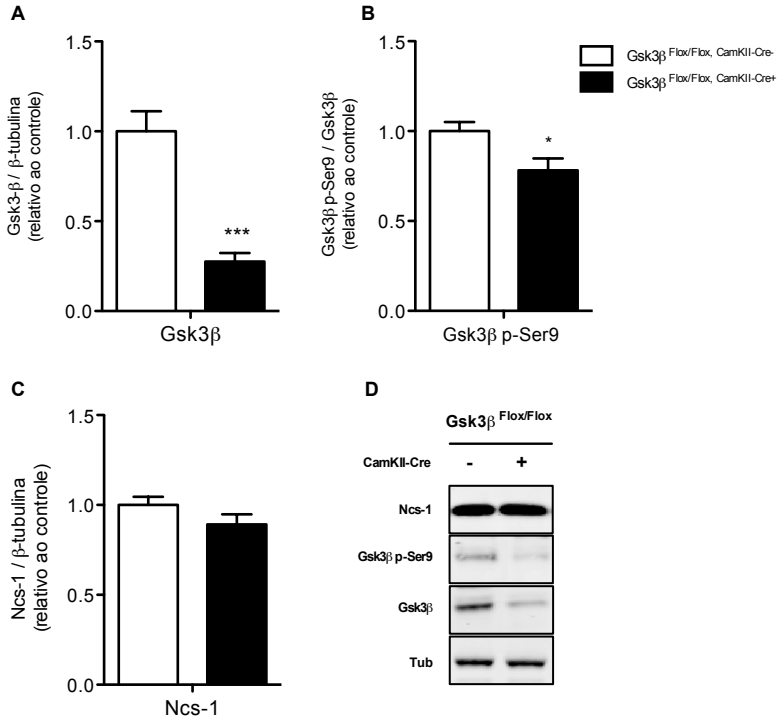


Figura 44. A expressão de Ncs-1 não está alterada no córtex frontal de animais $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$. Representação gráfica da análise densitométrica e western blot dos níveis de (A) Gsk3β, (B) pGsk3β (Ser 9) e (C) Ncs-1 (normalizados pelos níveis de tubulina) ou (B) (normalizados pelos níveis de Gsk3β) no córtex frontal de animais $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$ e $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre-}$. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo de animais $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre-}$ de mesma ninhada originados pelo acasalamento entre heterozigotos. Tub: tubulina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ (t teste).

4.1.10 TDZD-8 induz a expressão genética de Ncs-1.

Os resultados deste estudo indicam que a inibição de Gsk3 permite a indução dos níveis da proteína Ncs-1 em torno de 1 h. O próximo passo do estudo foi avaliar se esta indução está relacionada com o aumento da expressão do gene *NCS-1*, medido pelos níveis de seu RNAm. De fato, após 30 min de exposição ao TDZD-8, observou-se uma indução de cerca de 71% nos níveis de RNAm de Ncs-1 em células PC12 ($p < 0,001$) (Figura 45 A). Um experimento semelhante foi reproduzido em células HEK 293 e, da mesma forma que em PC12, também foi observado um aumento de cerca de 122% dos níveis de RNAm de Ncs-1 nesta linhagem celular de origem humana ($p < 0,001$) (Figura 45 B).

Estes dados sugerem que a indução da expressão genética de Ncs-1 pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo qual TDZD-8, um inibidor de Gsk3, aumenta os níveis intracelulares de Ncs-1.

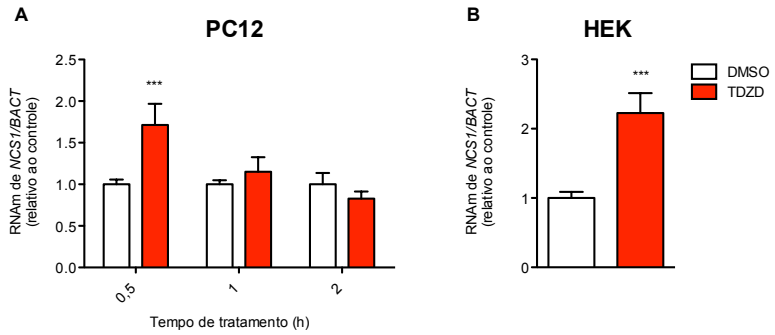


Figura 45. TDZD-8 induz os níveis de RNAm de Ncs-1 em PC12 e HEK 293. (A) Representação gráfica da quantificação de RNAm de *NCS-1* relativa ao controle em PC12 (A) e HEK 293 (B). As células (N = 4) foram tratadas com TDZD-8 (10 μM) ou com DMSO (0,01%) por 0,5; 1 ou 2 horas em PC12 ou 1 h em HEK 293. Para todos as análises, os níveis de RNAm de *NCS-1* estão normalizados pelos níveis de RNAm de *ACTB,* relativo ao grupo experimental controle nos respectivos tempos. TDZD: TDZD-8. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. *** $p < 0,001$ (t test).

4.1.11 Inibição de Gsk3 pelo TDZD-8 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12.

Como TDZD-8 induziu os níveis de proteína e RNAm de Ncs-1, a próxima questão do estudo foi avaliar se este fármaco depende da nova síntese de proteínas para que ocorra o efeito indutor nos níveis de Ncs-1. Para tal, o tratamento com TDZD-8 foi replicado, porém num modelo experimental cujo a síntese de novas proteínas foi antecipadamente inibida pela ciclohexamida (CHX). Este fármaco é uma tetraciclina produzida pela bactéria *Streptomyces griseus* que inibe a tradução em células eucariotas por bloquear a enzima peptidil transferase, o que retém a proteína no ribossomo. Se nestas condições o TDZD-8 perdesse seu efeito sobre a expressão de Ncs-1, poderia ser interpretado que a ação primária da inibição de Gsk3 que permite o aumento dos níveis da proteína Ncs-1 seria dependente da expressão genética. Caso contrário, a inibição de Gsk3 poderia favorecer uma maior estabilidade intracelular da proteína Ncs-1 permitindo seu acúmulo e, consequentemente, poderia explicar o aumento observado através dos experimentos anteriores.

Cerca de 30 min antes de expor as células ao TDZD-8, as mesmas foram tratadas com DMSO ou 10 μg/ml de CHX para inibir a síntese de novas proteínas. Em seguida, o inibidor de Gsk3 foi adicionado na cultura e após 0,5; 1 ou 2 h e a expressão de Ncs-1 foi mensurada por western blot. Apesar da inibição de Gsk3 por 0,5 e 1 h induzir a expressão de Ncs-1 nas células pré-tratadas com DMSO, nenhum efeito do fármaco sobre Ncs-1 foi observado no grupo pré-tratado com CHX (Figura 46).

Estes resultados revelam que a integridade da maquinaria celular de tradução de proteínas é fundamental para que a inibição de Gsk3 cause o aumento dos níveis da proteína Ncs-1.

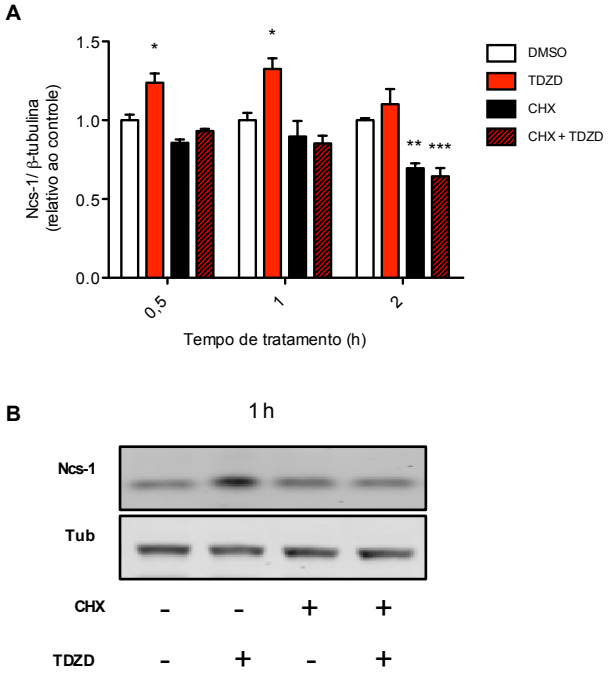


Figura 46. Inibição de Gsk3 pelo TDZD-8 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. (A) Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram pré-tratadas com DMSO (0,01%) ou ciclohexamida (10 µg/ml) por 30 minutos e, em seguida, TDZD-8 (10 µM) foi adicionado ao meio de cultivo por 0,5; 1 ou 2 horas. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. (B) Western blot representativo da expressão de Ncs-1 e tubulina (Tub) após tratamento com TDZD-8 por 1 h em PC12. TDZD: TDZD-8; CHX: ciclohexamida. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (*one way* ANOVA).

4.1.12 Superexpressão de Gsk3β diminui a expressão do RNAm de Ncs-1 sem alterar os níveis protéicos de Ncs-1.

Este estudo tem mostrado que a inibição de ambas isoformas de Gsk3 através do tratamento farmacológico com TDZD-8 induz a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo*. O próximo experimento buscou responder se, pelo contrário, a superexpressão de Gsk3β poderia causar algum efeito negativo sobre a expressão de Ncs-1 *in vitro*. Para tal, células HEK 293 foram transfectadas com um plasmídeo carreando uma cópia do gene Gsk3β humano e, após 48 h da transfecção, a expressão de Ncs-1 foi mensurada (Figura 47 A). Células transfectadas com um plasmídeo carreando a sequência codificadora de uma proteína fluorescente inerte foram utilizadas como controle experimental. HEK 293 (ao invés de PC12) foram empregadas para este experimento devido a sequência promotora do plasmídeo Myc-Gsk3β.pcDNA3 funcionar exclusivamente em células de origem humana (dados não mostrados). Como a inibição de Gsk3 também induziu a expressão de Ncs-1 em HEK 293, considerou-se a utilização desta mesma linhagem neste experimento.

Apesar da transfecção resultar em um aumento de cerca de 7 vezes dos níveis de Gsk3β ($p < 0,001$), nenhum efeito estatisticamente significante da expressão de β-catenina e Ncs-1 foi observado (Figura 47 B). No entanto, as análises de qPCR mostraram uma redução de cerca de 60% nos níveis de RNAm de Ncs-1 nas células transfectadas com Gsk3β ($p < 0,01$).

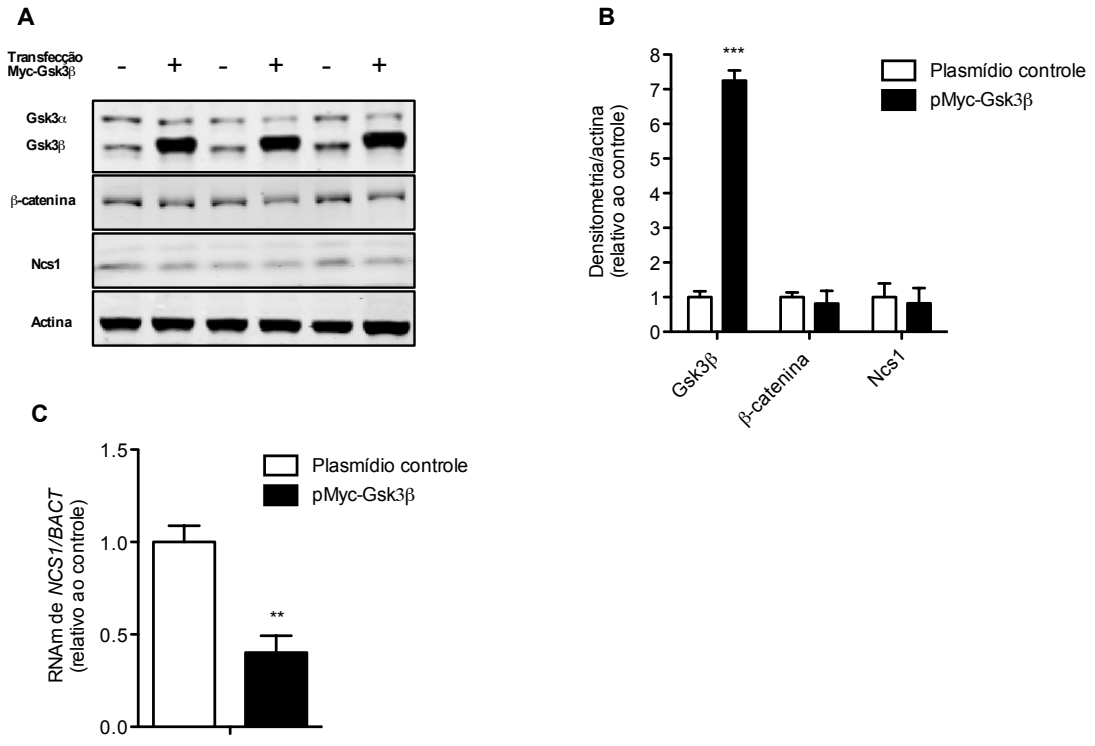


Figura 47. Efeito da superexpressão de Gsk3β sobre os níveis de proteína e RNAm de Ncs-1 em HEK 293. Células HEK 293 (N = 4) foram transfectadas por eletroporação com 10 µg do plasmídeo Myc-Gsk3β.pcDNA3 e após 48 h, as análises foram realizadas. (A) Western blot mostrando aumento dos níveis de Gsk3β (mas não de Gsk3α) em células HEK 293 transfectadas (+). (B) Representação gráfica da análise densitométrica dos níveis de Gsk3β, β-catenina e Ncs-1 (normalizados pelos níveis de tubulina) em HEK 293. (C) Superexpressão de Gsk3β diminui os níveis de RNAm de Ncs-1 em células HEK 293. Representação gráfica dos níveis de RNAm de *NCS-1* normalizados pelos níveis de RNAm de *ACTB,* relativo ao grupo experimental controle. *BACT*: gene da actina beta. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.13 Inibição de Mek/Erk induz a expressão de Ncs-1 *in vitro* e *in vivo.*

A via de sinalização das MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) possui uma função central na regulação dos processos de sobrevivência e proliferação celular. De forma semelhante, a expressão de Ncs-1 oscila em modelos experimentais de dano celular e, este aumento, pode estar relacionado com proteção célula. Como a via das MAPKs é extensivamente acreditada participar na mediação dos efeitos terapêuticos de diversas classes de fármacos psiquiátricos, incluindo o ácido valpróico, o objetivo do próximo experimento foi estudar a importância desta via de sinalização na modulação dos níveis intracelulares de Ncs-1. Dados não publicados originados no laboratório do Prof. Dr. Beaulieu tem mostrado que o tratamento crônico *in vivo* com duas doses de VPA (10 e 25 mg/kg) apesar de obterem efeitos antidepressivos e ansiolíticos, diferentes efeitos sobre a fosforilação de Erk1/2 (Erk1/2) são observados. Por exemplo, apenas a dose de 25 mg/kg causa a redução dos níveis de pErk1/2. Interessantemente, os experimentos iniciais realizados por este estudo mostraram que o tratamento crônico com VPA a 25 mg/kg, mas não a 10 mg/kg, induziu a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos (dados não mostrados). Juntos, estes dados levam a crer que é possível que a redução a expressão de pErk1/2 poderia estar relacionada com o aumento dos níveis de Ncs-1.

Para avaliar esta possibilidade, foi realizada a administração *in vitro* e *in vivo* de compostos farmacológicos que inibem a atividade de Mek1/2 (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 1/2*), uma proteína MAPKK. A desfosforilação das proteínas "*downstream*" participantes desta via acarreta em redução dos efeitos moleculares e fisiológicos da via das MAPKs por um todo. Por exemplo, o tratamento com compostos que diminuem a fosforilação de substratos de MEK1/2, como Erk1/2, previnem a transmissão dos sinais associados com a indução de genes pró inflamatórios (KIM, E. K.; CHOI, E.-J., 2010).

No modelo *in vitro*, células PC12 foram expostas a uma concentração de 10 μM de U0126 (*1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene*) ou DMSO por 1, 3, 6, 12 e 24 horas e, em seguida, a expressão de Ncs-1 e tubulina foi mensurada por *western blot*. Este tratamento revelou que em 1 h o U0126 foi capaz de induzir um aumento de 81% na expressão de Ncs-1 ($p < 0,05$) e reduziu os níveis de pErk 2 em 74% ($p < 0,01$) (Figura 48 A-C). Interessantemente, a medida que os níveis de pErk 2 foram-se aumentando com o passar do tempo, também observou-se que a expressão de Ncs-1 voltou para o nível basal (Figura 48 A-C).

Para o tratamento *in vivo*, camundongos C57 B/L ($n = 5$) foram administrados i.p. com uma dose única de 50 ou 75 mg/kg de SL327 ou solução de DMSO 0,3% diluído em água ($n = 5$) e após duas horas foram decapitados para a análise da expressão de Ncs-1 no córtex frontal e estriado.

As análises densitométricas do western blot revelaram que o tratamento com SL327 a 50 mg/kg diminuiu os níveis de pErk 2 em 33% no estriado ($p < 0,05$) mas não no córtex frontal. Esta dose não alterou a expressão de Ncs-1 em ambas regiões cerebrais estudadas (Figura 48 D-H). Assim como a dose de SL327 a 50 mg/kg, a dose de 75 mg/kg também reduziu a expressão de pErk 2 em 52% no estriado ($p < 0,01$) e não causou nenhuma mudança na expressão de Ncs-1 nesta região (Figura 48 D-H). No entanto, a dose de 75 mg/kg foi a única capaz de reduzir os níveis de pErk 2 ($p < 0,01$) e, simultaneamente, induzir a expressão de Ncs-1 em 79% ($p < 0,05$) no córtex frontal (Figura 48 D-H).

Estes dados mostram que a inibição específica de Mek 1/2 está associada com a indução dos níveis de Ncs1 *in vitro* e *in vivo*.

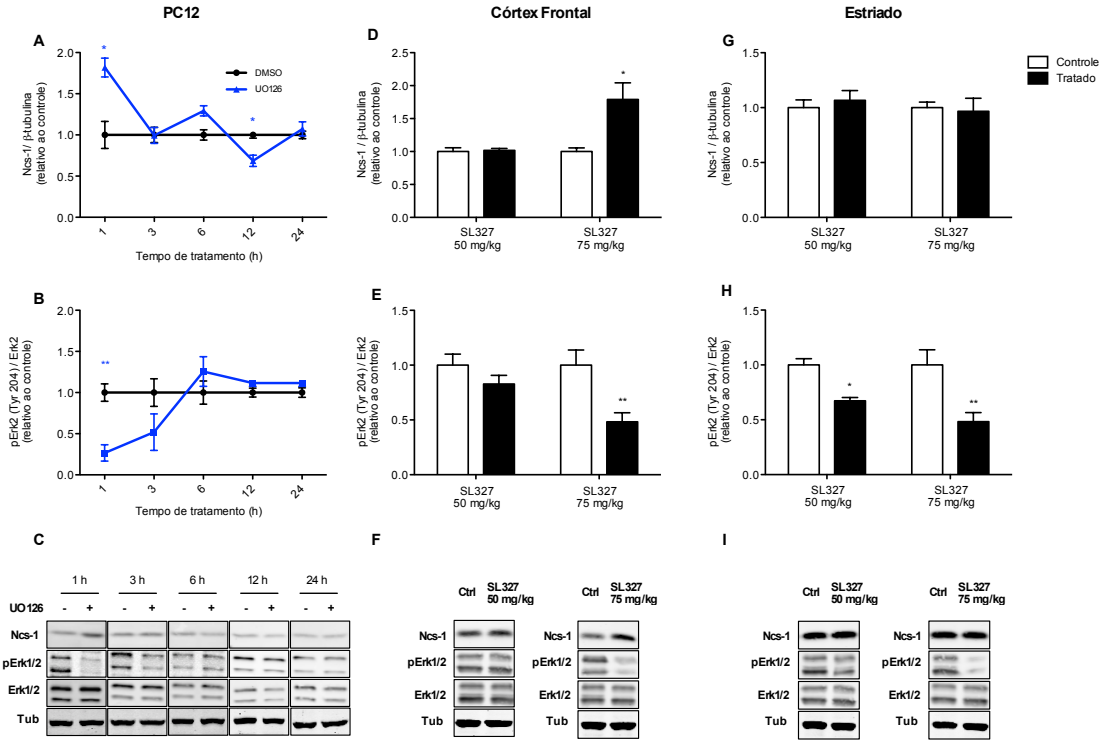


Figura 48. Inibição de Mek 1/2 induz a expressão de Ncs-1 em PC12 e no córtex frontal de camundongos. (A-C) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot dos níveis de (A) Ncs-1 e (B) pErk 2 (normalizados pelos níveis de tubulina e Erk 2, respectivamente) em PC12. (C) As células (N = 4) foram expostas a uma concentração de 10 µM de U0126 (+) ou DMSO 0,01% (-) por 1, 3, 6, 12 e 24 horas e, em seguida, a expressão de Ncs-1 e tubulina foi mensurada por western blot. (D-I) Representação gráfica da análise densitométrica e western blot da expressão de Ncs-1 e pErk 2 (normalizada pelos níveis de tubulina e Erk 2, respectivamente) em camundongos da linhagem C57 B/L após tratamento com o inibidor de Mek1/2, SL327. Os animais (N = 5) foram administrados i.p. com uma dose única de 50 ou 75 mg/kg de SL327 ou solução de DMSO 0,3% diluído em água e após duas horas foram decapitados para a análise da expressão de Ncs-1 no (D-F) córtex frontal e (G-I) estriado. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadas pelos níveis encontrados no grupo controle correspondente. Tub: tubulina. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (*one way* ANOVA em A e B; t test D-H).

4.1.14 Inibição de Mek/Erk induz a expressão genética de Ncs-1.

Os resultados deste estudo indicam que a inibição específica de Mek 1/2 pelo U0126 ou SL327 induziu os níveis da proteína Ncs-1 em torno de 1 h em PC12 e 2 h no córtex frontal de camundongos. O próximo passo do estudo foi avaliar se esta indução está relacionada com o aumento da expressão do gene *NCS-1*, medido pelos níveis de seu RNAm.

De fato, após 0,5 e 1 h de exposição ao U0126, observou-se uma indução de cerca de 76% ($p < 0,001$), e 46% ($p < 0,01$) dos níveis de RNAm de Ncs-1 em células PC12, respectivamente (Figura 49 A). Um experimento semelhante foi reproduzido em células HEK 293 e, diferente ao observado em PC12, nenhuma alteração dos níveis de RNAm de Ncs-1 foi observada nesta linhagem celular de origem humana (Figura 49 B). Nestas condições, estes dados indicam que a inibição de Mek 1/2 induz da expressão genética de Ncs-1 em PC12 mas não em HEK 293.

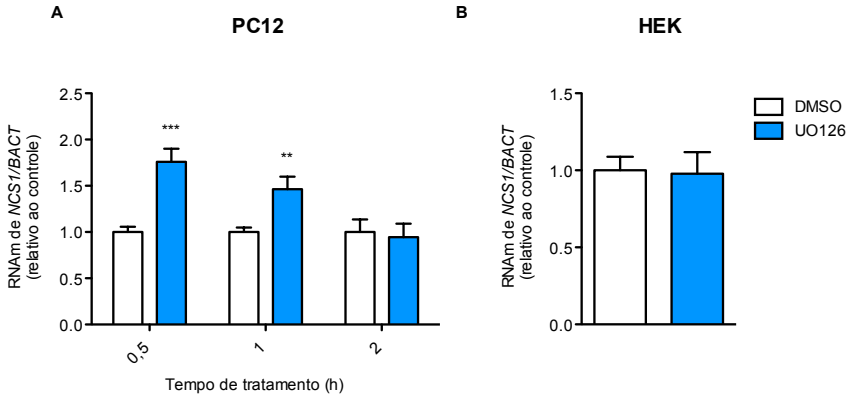


Figura 49. U0126 induz os níveis de RNAm de Ncs-1 em PC12 mas não em HEK 293. (A) Representação gráfica da quantificação de RNAm de *NCS-1* relativa ao controle em (A) PC12 e (B) HEK 293. As células (N = 4) foram tratadas com U0126 (10 µM) ou com DMSO (0,01%) por 0,5; 1 ou 2 horas em PC12 ou 1 h em HEK 293. Para todos as análises, os níveis de RNAm de *NCS-1* estão normalizados pelos níveis de RNAm de *BACT* (gene da actina beta), relativo ao grupo experimental controle nos respectivos tempos. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t teste).

4.1.15 Inibição de Mek/Erk pelo U0126 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12.

Já que o U0126 induziu os níveis de proteína e RNAm de Ncs-1, a próxima questão do estudo foi avaliar se este inibidor depende da nova síntese de proteínas para que ocorra o efeito indutor nos níveis de Ncs-1. Para tal, o tratamento com U0126 foi replicado no modelo experimental cuja síntese de novas proteínas ou tradução foi antecipadamente inibida pela CHX, previamente explicado.

Cerca de 30 min antes de expor as células ao U0126, as mesmas foram tratadas com DMSO ou 10 μg/ml de CHX para inibir a tradução de novas proteínas. Em seguida, o inibidor de Mek 1/2 foi adicionado na cultura e após 0,5; 1 ou 2 h a expressão de Ncs-1 foi mensurada por western blot. Apesar da inibição de Mek 1/2 por 0,5 - 2 h induzir a expressão de Ncs-1 nas células pré-tratadas com DMSO, nenhum efeito do fármaco sobre Ncs-1 foi observado no grupo pré-tratado com CHX (Figura 50).

Estes resultados revelam que a integridade da maquinaria celular de tradução de proteínas é fundamental para que a inibição de Mek 1/2 pelo U0126 cause o aumento dos níveis da proteína Ncs-1.

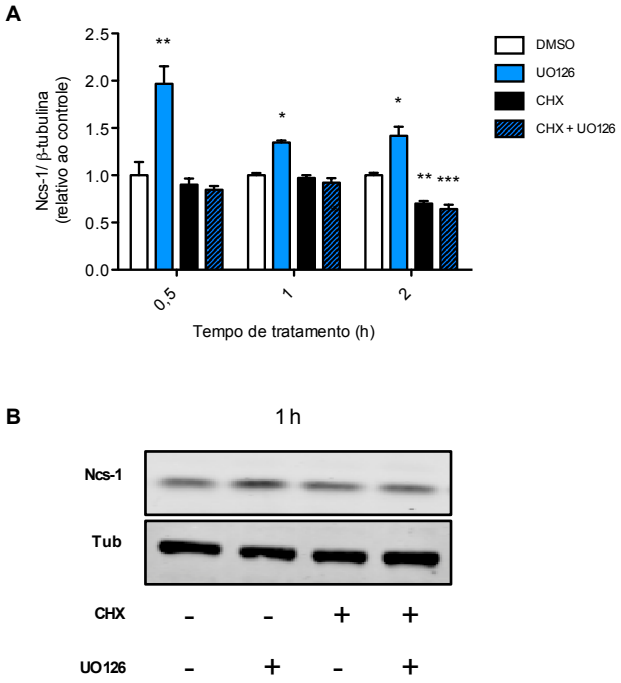


Figura 50. Inibição de Mek 1/2 pelo U0126 depende da nova síntese de proteínas para induzir os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12. (A) Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de tubulina) em PC12. As células (N = 4) foram pré-tratadas com DMSO (0,01%) ou ciclohexamida (10 μg/ml) 30 minutos e, em seguida, U0126 (10 μM) foi adicionado ao meio de cultivo por 0,5; 1 ou 2 horas. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/tubulina encontrado no grupo controle correspondente. (B) Western blot representativo de Ncs-1 e tubulina (Tub) após tratamento com U0126 por 1 h em PC12. TDZD: TDZD-8; CHX: ciclohexamida. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (*one way* ANOVA).

4.1.16 Efeito do tratamento combinado de fármacos sobre os níveis protéicos de Ncs-1 em células PC12.

Os resultados deste estudo mostraram que os fármacos estabilizadores do humor Li e VPA induziram os níveis intracelulares de Ncs-1. Além disso, o tratamento com inibidores específicos de Gsk3 e MAPK causaram efeitos similares aos observados com estes fármacos sobre os níveis de Ncs-1. Como estes inibidores agem justamente em importantes proteínas alvos de Li e VPA, é possível que estas sejam as vias pelas quais estes fármacos induzem a expressão de Ncs-1.

No entanto, os fármacos estabilizadores do humor utilizados neste estudo agem em múltiplas vias de transdução de sinais. Sendo assim, não é descartado que mais de uma via de transdução de sinais possa estar associada com o efeito positivo dos estabilizadores do humor sobre a expressão de Ncs-1. Por exemplo, tanto a inibição de Gsk3 quanto a de Mek 1/2 induz a expressão genética de Ncs-1 em PC12. Portanto, o objetivo do experimento seguinte foi testar se existe efeito aditivo no tratamento combinado por 1 h entre os compostos que puderam induzir a expressão de Ncs-1 em PC12.

As células PC12 foram tratadas por 1 h nas seguintes condições: Li 1,0 mM + VPA 0,625 mM, Li 1,0 mM + TDZD 10 μM; Li 1,0 mM + U0126 10 μM; VPA 0,625 mM + TDZD 10 μM; VPA 0,625 mM + U0126 10 μM ou TDZD 10 μM + U0126 10 μM. Além disso, o tratamento com cada composto isolado e com o veículo de diluição (grupo controle) foram novamente testados no mesmo experimento.

Como esperado, o tratamento por 1 h com Li e VPA não surtiu nenhum efeito estatisticamente significante sobre os níveis de Ncs-1. No entanto, a expressão de Ncs-1 quase dobrou quando os dois fármacos foram empregados simultaneamente ($p < 0,01$). Apesar do

TDZD e U0126 induzirem a expressão de Ncs-1 por 1 h ($p < 0,05$), nenhum efeito aditivo foi observado quando estes compostos foram coadministrados ou com Li e VPA (Figura 51).

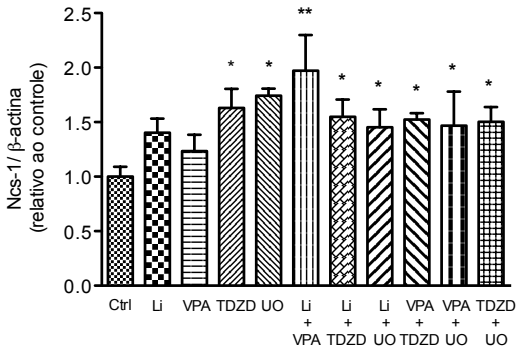


Figura 51. Efeito do tratamento combinado de fármacos sobre os níveis intracelulares de Ncs-1 em células PC12. Representação gráfica da análise densitométrica da expressão de Ncs-1 (normalizada pelos níveis de actina) em PC12. As células PC12 (N = 3) foram tratadas por 1 h nas seguintes condições: Li 1,0 mM + VPA 0,625 mM; Li 1,0 mM + TDZD 10 μM; Li 1,0 mM + U0126 10 μM; VPA 0,625 mM + TDZD 10 μM; VPA 0,625 mM + U0126 10 μM; ou TDZD 10 μM + U0126 10 μM. Além disso, o tratamento com cada composto isolado e com o veículo de diluição (grupo controle) foram novamente testados no mesmo experimento. Para todos as análises de densitometria, os resultados estão apresentados como unidades arbitrárias normalizadaspela expressão de Ncs-1/actina encontrado no grupo controle correspondente. Li: cloreto de lítio; VPA: valproato; TDZD: TDZD-8 (inibidor de Gsk3); UO: U0126 (inibidor de Mek 1/2). Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.17 Estudo da transcrição do gene *NCS-1* através de gene repórter da luciferase

A inibição de Gsk3 ou Mek 1/2 foi capaz de induzir a expressão genética de Ncs-1. Interessantemente, uma série de evidências têm mostrado que estas proteínas fazem parte de importantes vias de transdução de sinais que, dentre muitas funções, regulam diretamente ou indiretamente uma variedade de fatores de transcrição e consequentemente o estado transcricional da célula. Por exemplo, a inibição de Gsk3 é amplamente reportada causar a dissociação do complexo inibitório de IkB da NF-kB no citoplasma. Uma vez dissociado, NF-kB estará então livre para entrar no núcleo e ativar a transcrição de genes pró-sobrevivência. Este mecanismo molecular explica em parte por que a inibição de Gsk3 exercida por FEHs aumenta a sobrevivência celular (CHUANG, DE-MAW, 2005).

Este estudo hipotetizou que a inibição de Gsk3 ou Mek 1/2 poderia induzir algum fator de transcrição que induzisse a transcrição do gene *NCS-1*. Sendo assim, a região promotora do gene *NCS-1* seria fundamental para a iniciação dos efeitos mediados por esta via já que estas sequências constituem o sítio de ligação para fatores de transcrição, essenciais para formação do complexo iniciador da transcrição. Como mostrado previamente, utilizando algoritmos de bioinformática, detectou-se diversos sítios de ligação para fatores de transcrição regulados tanto por Gsk3 ou MAPK numa sequência de 2 kb 5' *upstream* ao gene *NCS-1*. Esta evidência reforçou ainda mais que, hipoteticamente, a inibição dessas vias (Gsk3 e/ou MAPK) favorece a ligação de um fator de transcrição desconhecido que ativa a transcrição de gene *NCS-1*.

Para testar esta hipótese, um sistema de gene repórter para Ncs-1 foi desenvolvido a partir da clonagem de insertos candidatos a promotor do gene *NCS-1* humano *upstream* ao gene da luciferase no vetor pGL4.10 (Figura 52 A). A capacidade regulatória dos insertos foi

avaliada através da mensuração da atividade de luciferase, a qual só é expressa pelo vetor caso o inserto tenha capacidade de regulação gênica como sequências promotoras.

Apenas 3 (clone 1-3) das 4 regiões propostas inicialmente puderam ser isoladas através de PCR. Uma explicação plausível foi a alta porcentagem de "GC" (próximo aos 80%) encontrada nas sequências a serem amplificadas, o que impossibilitou o sucesso da PCR para um *amplicon* da magnitude de 3,3 kb. Sendo assim, o estudo considerou para análise os vetores originados a partir da inserção das seguintes sequências no plasmídeo pGL4.10: clone 2 (2.005 pb); clone 3 (1.048 pb) e clone 4 (588 pb), os quais a partir de então serão referidos como pGL4.10-NCS1.2005, pGL4.10-NCS1.1048 ou pGL4.10-NCS1.588, respectivamente (Figura 52 B). Para avaliar a atividade de cada um dos vetores, os plasmídeos pGL4.10 portando a sequência promotora, pGL4.10 portando a respectiva sequência controle e pβGal-CMV foram transfectados em células HEK 293 e PC12. Após 48 h, a atividade de luciferase e galactosidase (para normalizar a eficiência de transfecção) foi medida através de um kit comercial.

Após adição da luciferina, nenhuma diferença estatisticamente significante da atividade de luciferase foi encontrada em células HEK 293 transfectadas com pGL4.10-NCS1.2005, pGL4.10-NCS1.1048 ou pGL4.10-NCS1.588 se comparadas com as células transfectadas com os respectivos plasmídeos controles ou o pGL4.10 vazio (Figura 52 C). De forma semelhante, o tratamento por 1 h com TDZD-8 ou U0126 não foi capaz de aumentar significantemente a atividade de luciferase nos vetores transfectados. No entanto, em células PC12, foi observado que apenas o vetor pGL4.10-NCS1.2005 pôde induzir a atividade de luciferase cerca de 4 vezes se comparado com o plasmídeo pGL4.10 vazio (Figura 52 D).

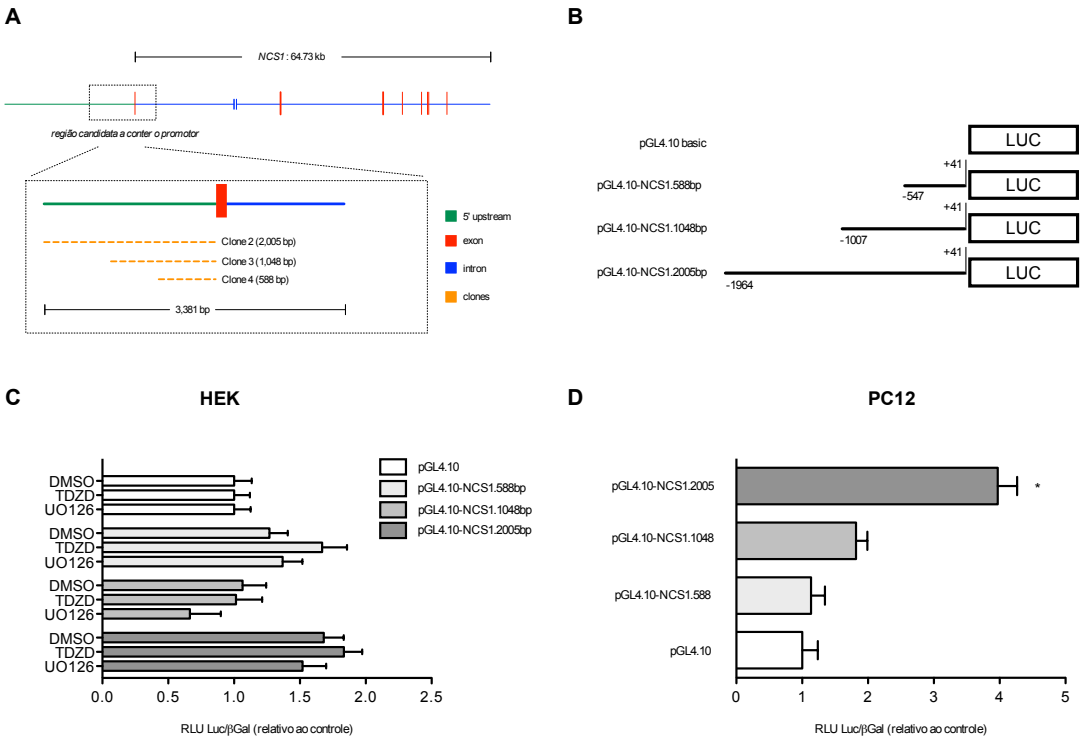


Figura 52. Estudo da transcrição do gene *NCS-1* através de gene repórter da luciferase. (A) Estrutura molecular do gene *NCS-1*. Três sequências de diferentes tamanhos 5' *upstream* ao primeiro éxon do gene foram isoladas por PCR para avaliação de suas capacidades regulatórias no sistema de gene repórter de luciferase. (B) As três sequências foram inseridas *upstream* a sequência gênica da luciferase (LUC) no vetor pGL4.10, originando os vetores pGL4.10-NCS1.2005, pGL4.10-NCS1.1048 e pGL4.10-NCS1.588. (C-D) Representação gráfica da atividade de luciferase normalizada pela atividade de galactosidase (βGal), relativa ao plasmídeo controle (RLU). (C) Nenhuma atividade basal de luciferase (DMSO) ou após o tratamento com TDZD-8 ou U0126 foi detectada nos vetores inseridos em células HEK 293. (D) Um leve aumento na atividade de luciferase foi detectada nas células PC12 transfectadas com o plasmídeo pGL4.10-NCS1.2005. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$ (*one way* ANOVA).

4.2 Resultados Parte II

Os resultados da Parte II mostrados nas seguintes seções foram realizados no intuito de avaliar o impacto da deleção genética de Ncs-1 sobre os efeitos farmacológicos do tratamento com VPA ou AMPH, assim como no estresse oxidativo e metabolismo energético.

4.2.1 Modelo animal de mania induzida por AMPH, tratamento com VPA e expressão cerebral de Ncs-1

A reversão da hiperlocomoção induzida por AMPH em ratos é um dos modelos experimentais tratado através da administração com os fármacos estabilizadores do humor Li e VPA. Uma das explicações para o efeito terapêutico observado é que estes fármacos revertem as modificações moleculares e celulares induzidas pelo AMPH, as quais contribuem para a manifestação do comportamento hiperlocomotor. Sendo assim, o objetivo do experimento seguinte foi o avaliar se o nível de expressão cerebral do Ncs-1 é alterado pela hiperlocomoção induzida por AMPH e, mais importante, com a reversão do comportamento mediado pelo tratamento com VPA.

Na primeira semana, os animais da linhagem Wistar receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) diária de solução salina 0,9% (Sal) ou 0,25 mg/kg de d-anfetamina (AMPH). Em seguida, ambos os grupos Sal e AMPH foram subdivididos em dois: Sal 0.9% (i.p.) e VPA 250 mg/kg (i.p.) duas vezes por dia durante mais 7 dias. Os tratamentos originaram os grupos Sal + Sal, Sal + VPA, AMPH + Sal e AMPH + VPA. No último dia de tratamento, os animais receberam uma única injeção de Sal ou AMPH (0,25 mg/kg) e atividade locomotora foi avaliada 2 h após esta última injeção. Após o teste comportamental os animais foram decapitados por decapitação e a amígdala, córtex frontal, hipocampo e estriado foram dissecados para a avaliação da expressão local de Ncs-1. Cada grupo experimental foi composto por 12 animais (Figura 53 A).

Como esperado, o grupo AMPH + Sal apresentou uma maior locomoção se comparado ao grupo controle Sal + Sal ($p < 0,5$) (Figura 53 B). Porém, esta hiperlocomoção foi abolida quando os animais foram tratados com o ácido valpróico, representado pelo grupo AMPH + VPA (Figura 53 B). A análise da expressão cerebral de Ncs-1 nos grupos Sal + Sal,

Sal + VPA, AMPH + Sal e AMPH + VPA revelou a diminuição de Ncs-1 apenas no córtex frontal dos animais do grupo AMPH + Sal (Figura 54 A-D).

Juntos estes resultados além de reforçar a eficácia do VPA para reverter a hiperlocomoção induzida pelo AMPH, também indicam que a diminuição da expressão de Ncs-1 no modelo experimental de mania pode ser alvo do tratamento com VPA.

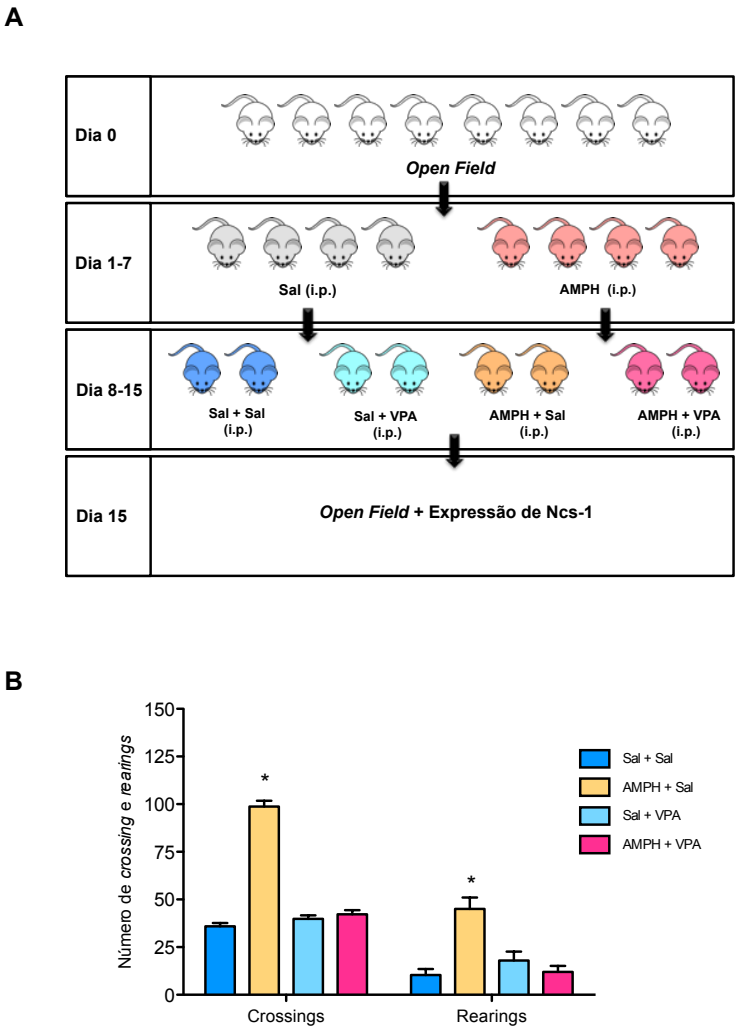


Figura 53. Reversão da hiperlocomoção induzida por AMPH após tratamento com VPA. (A) Ratos da linhagem Wistar receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) diária de solução salina 0,9% (Sal) ou 0,25 mg/kg de d-anfetamina (AMPH) durante sete dias. Em seguida, ambos os grupos Sal e AMPH foram subdivididos em dois, Sal 0.9% (i.p.) e VPA 250 mg/kg e foram tratados i.p. duas vezes por dia durante mais 7 dias. Os tratamentos originaram os grupos Sal + Sal, Sal + VPA, AMPH + Sal e AMPH + VPA. No último dia de tratamento (dia 15), os animais receberam uma única injeção de Sal ou VPA e a atividade locomotora através do teste do *open field* foi avaliada 2 h após esta última injeção. Após o teste comportamental os animais foram decapitados por decapitação para a avaliação da expressão cerebral de Ncs-1. (B) Os animais do grupo AMPH + Sal apresentaram uma maior locomoção (*crossings* e *rearings*) se comparado ao grupo controle Sal + Sal. A hiperlocomoção foi abolida quando os animais foram tratados com o ácido valpróico (representado pelo grupo AMPH + VPA). Cada grupo experimental foi composto por 12 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$.

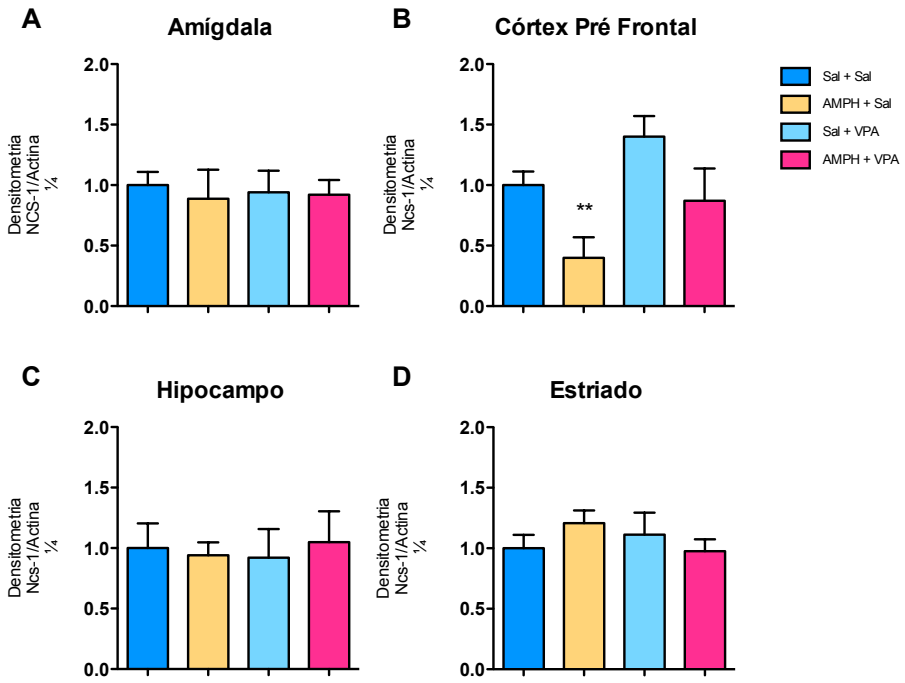


Figura 54. Redução da expressão de Ncs-1 no modelo experimental de hiperlocomoção induzida por AMPH é revertida após tratamento com VPA. Ratos da linhagem Wistar receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) diária de solução salina 0,9% (Sal) ou 0,25 mg/kg de d-anfetamina (AMPH) durante sete dias. Em seguida, ambos os grupos Sal e AMPH foram subdivididos em dois: Sal 0.9% (i.p.) e VPA (VPA) 250 mg/kg e foram tratados i.p. duas vezes por dia por mais 7 dias. Os tratamentos originaram os grupos Sal + Sal, Sal + VPA, AMPH + Sal e AMPH + VPA. No último dia de tratamento (dia 15), os animais receberam uma única injeção de Sal ou VPA (0,25 mg/kg) e os animais foram decapitados por decapitação para a avaliação da expressão cerebral de Ncs-1 na (A) Amígdala, (B) Córtex Frontal, (C) Hipocampo e (D) Estriado. Cada grupo experimental foi composto por 12 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. ** $p < 0,01$ (*one way* ANOVA).

4.2.2 Abolição da hiperlocomoção induzida pela AMPH em animais Ncs-1 KO

Os resultados anteriores mostraram que a expressão de Ncs-1 é alterada após um regime específico de tratamento com AMPH que induz hiperlocomoção, sugerindo a participação de Ncs-1 na ação farmacológica deste composto. Para testar esta hipótese, uma dose de 3 mg/kg de AMPH conhecida por induzir hiperlocomoção foi administrada i.p. em animais selvagens (Ncs-1 $^{+/+}$), heterozigotos (Ncs-1 $^{-/+}$) ou nocautes para Ncs-1 (Ncs-1 $^{-/-}$) e, em seguida, o efeito da AMPH sobre a locomoção nos animais Ncs-1 $^{-/-}$ foi comparado com aquela observada em animais Ncs-1 $^{+/+}$ e Ncs-1 $^{-/+}$.

Como esperado, a AMPH induziu hiperlocomoção nos animais Ncs-1 $^{+/+}$ ($p \leq 0,05$) (Figura 55 A). De forma semelhante, porém com menor intensidade, a AMPH também induziu hiperlocomoção nos animais Ncs-1 $^{-/+}$ ($p \leq 0,05$) (Figura 55 B). Entretanto, nenhum efeito sobre a locomoção foi observado quando o mesmo tratamento com AMPH foi realizado em animais Ncs-1 $^{-/-}$ (Figura 55 C). Estes dados sugerem que a hiperlocomoção induzida pela AMPH é dependente da expressão do Ncs-1, considerando as condições estabelecidas por este estudo.

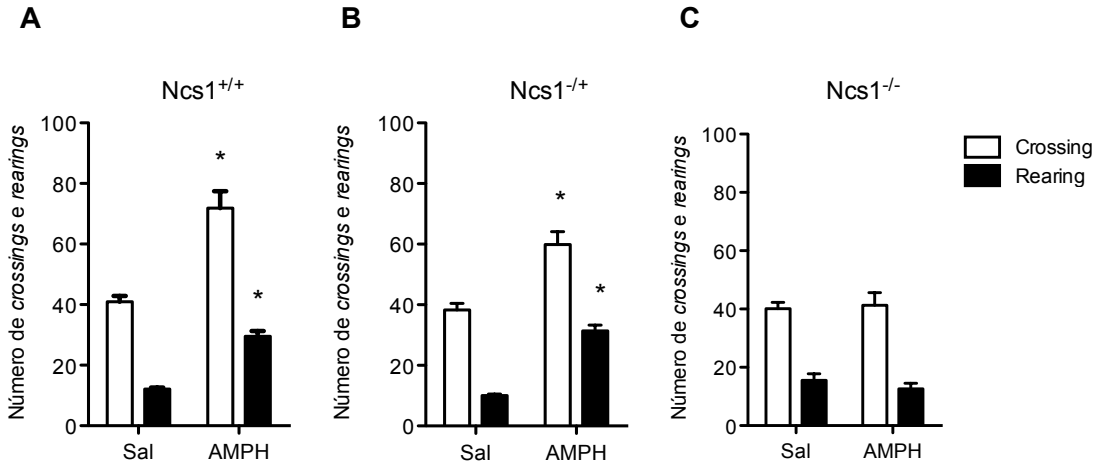


Figura 55.Ausência de Ncs-1 em animais Ncs-1 $^{-/-}$ abole a hiperlocomoção induzida pela anfetamina. (A) Animais selvagens (Ncs-1$^{+/+}$), (B) heterozigotos (Ncs-1$^{-/+}$) ou nocautes para Ncs-1 (Ncs-1$^{-/-}$) foram administrados i.p. com uma dose de solução salina 0,9% (Sal) ou 3 mg/kg de d-anfetamina (AMPH) e, após 1 h, a atividade locomotora (*crossings* e *rearings*) foi avaliada durante 5 minutos através do teste do *open field*. Cada grupo experimental foi composto por 10 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$ (t teste).

4.2.3 Impacto da ausência de Ncs-1 sobre os parâmetros antioxidantes e metabolismo energético cerebral

Resultados não publicados, originados no Laboratório de Neurociência da UFMG, mostraram que animais Ncs-$1^{-/-}$ apesar de não portarem distúrbios motores e no comportamento social, são caracterizados por fenótipos associados com sintomas depressivos e ansiosos. Dentre as teorias relacionadas com as alterações comportamentais observadas, hipotetizou-se que a estes animais deficientes de Ncs-1 poderiam apresentar alterações nos parâmetros antioxidantes e no metabolismo energético cerebral. Esta idéia é sustentada em diversas observações que têm relacionado o desbalanço da maquinaria metabólica e antioxidante cerebral como uma das principais modificações metabólicas encontradas em pacientes portadores de doenças psiquiátricas (BITANIHIRWE; WOO, 2011; CHE *et al.*, 2010; MANJI, HUSSEINI K; QUIROZ, JORGE A; *et al.*, 2003). Além disso, o Ncs-1 já foi reportado proteger neurônios do dano neuronal induzido por substâncias oxidantes (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006).

Para indiretamente avaliar o impacto do Ncs-1 nessas funções, quatro parâmetros medidores da capacidade antioxidante cerebral foram determinados por este estudo. A saber, atividade de catalase (CAT), atividade de superóxido dismutase (SOD), nível de peroxidação de lipídios através dos níveis de malondialdeído (MDA) e nível de carbonilação de proteínas. Igualmente, o metabolismo energético cerebral foi avaliado através da determinação da atividade de quatro complexos mitocondriais (Complexos I, II, II-III e IV), além das atividades de succinato desidrogenase (SDH) e caseína quinase (CK). Todas as análises foram realizadas a partir de homogeneizados cerebrais do córtex pré frontal (CPF), cerebelo (CER), hipocampo (HIP), estriado (EST) e córtex total (CTX) originados de animais portadores dos genótipos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) e Ncs-$1^{-/-}$ (KO).

Dentre as regiões cerebrais avaliadas nos animais selvagens, a atividade de CAT foi cerca de 2 vezes maior no cerebelo. Se comparada aos valores encontrados em animais Ncs-1 WT, a atividade de CAT foi estatisticamente menor em todas as regiões cerebrais dos animais Ncs-1 HT (CPF: 0,0045 x 0,0017; CER: 0,0102 x 0,0057; HIP: 0,0031 x 0,0017; EST: 0,0034 x 0,0011; CTX: 0,0055 x 0,0016; WT x Ncs-1 HT, em μmol de H_2O_2 consumido/mg tecido). De forma semelhante, a redução da atividade de CAT também foi observada no córtex frontal, estriado e córtex dos animais Ncs-1 KO. No entanto, um aumento da atividade de CAT estatisticamente significante foi detectada no hipocampo destes animais (CPF: 0,0045 x 0,0029; CER: 0,0102 x 0,0082; HIP: 0,0031 x 0,0064; EST: 0,0034 x 0,0015; CTX: 0,0055 x 0,0031; WT x Ncs-1 HT, em μmol de H_2O_2 consumido/mg tecido) (Figura 56 A).

Dentre as regiões cerebrais avaliadas, a atividade de SOD foi aproximadamente 3 vezes mais acentuada no CER, HIP e CTX levando-se em consideração apenas tecidos oriundos de animais selvagens. Com exceção do CTX de animais Ncs-1 KO, atividade de SOD foi estatisticamente menor em todas as regiões cerebrais examinadas dos animais Ncs-1 HT e KO se comparados com os níveis detectados em camundongos selvagens (CPF: 2,7 x 10^{-5} vs. 1,1 x 10^{-5} vs. 1,6 x 10^{-5}; CER: 8,7 x 10^{-5} vs. 2,6 x 10^{-5} vs. 5,1 x 10^{-5}; HIP: 6,4 x 10^{-5} vs. 1,8 x 10^{-5} vs. 2,5 x 10^{-5}; EST: 2,2 x 10^{-5} vs. 0,6 x 10^{-5} vs. 0,9 x 10^{-5}; CTX: 6,2 x 10^{-5} vs. 2,7 x 10^{-5} vs. 4,4 x 10^{-5}; WT vs. Ncs-1 HT vs. Ncs-1 KO, em unidades de SOD/mg de proteína) (Figura 56 B).

A mensuração de equivalentes de MDA mostrou níveis mais acentuados no EST se comparado às outras áreas cerebrais analisadas em animais selvagens. Quando compararam-se os níveis detectados no cérebro de camundongos Ncs-1 HT com estes valores de referência, observaram-se que o CPF e CTX apresentaram níveis elevados de MDA, entretanto reduzida quantidade no HIP também foi encontrada (CPF: 0,0025 x 0,0342; CER: 0,0077 x 0,0197; HIP: 0,016 x 0,0071; EST: 0,0379 x 0,0191; CTX: 0,0043 x 0,0092; WT x

Ncs-1 HT, em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína). A única alteração nos níveis de equivalentes MDA observada em animais Ncs-1 KO foi uma redução estatisticamente significante no estriado (CPF: 0,0025 x 0,0126; CER: 0,0077 x 0,0088; HIP: 0,016 x 0,0181; EST: 0,0379 x 0,0127; CTX: 0,0043 x 0,0061; WT x Ncs-1 KO, em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteína) (Figura 56 C).

Em animais selvagens, o nível de carbonilação de proteínas foi maior no estriado se comparado às outras regiões cerebrais analisadas. Além de revelar um aumento da quantidade de proteínas carboniladas no hipocampo, a análise em tecidos de animais Ncs-1 HT também detectou uma discreta redução no CPF, CER e EST quando estes valores foram comparados com os encontrados nos animais selvagens (CPF: 0,581 x 0,244; CER: 0,805 x 0,153; HIP: 0,423 x 1,718; EST: 1,512 x 0,826; CTX: 0,201 x 0,300; WT x Ncs-1 HT, em nmol/g de proteína). Em animais Ncs-1 KO, o nível de proteínas carboniladas foi menor no EST e maior no CTX (CPF: 0,581 x 0,545; CER: 0,805 x 0,544; HIP: 0,423 x 0,195; EST: 1,512 x 0,317; CTX: 0,201 x 0,545; WT x Ncs-1 KO, em nmol/g de proteína) (Figura 56 D).

De forma geral, a atividade do complexo I mitocondrial apresentou-se homogeneamente distribuída entre os tecido cerebrais estudados em camundongos selvagens, a exceção do CTX onde esta foi aproximadamente 40% menor. Uma discreta redução da atividade do complexo I mitocondrial foi observada quando homogeneizados do CPF, CER e EST de animais Ncs-1 HT foram comparados com os cobaias selvagens. (CPF: 1.024 x 776; CER: 1.074 x 733; HIP: 793 x 773; EST: 862 x 612 ; CTX: 459 x 353; WT x Ncs-1 HT, em nmol/minutos.mg de proteína). Um nível de redução semelhante da atividade do complexo I mitocondrial também foi observado em animais Ncs-1 KO, porém, no CPF, CER e HIP. (CPF: 1.024 x 627 ; CER: 1.074 x 796; HIP: 793 x 559; EST: 862 x 758; CTX: 459 x 342; WT x Ncs-1 KO, em nmol/minutos.mg de proteína) (Figura 57 A).

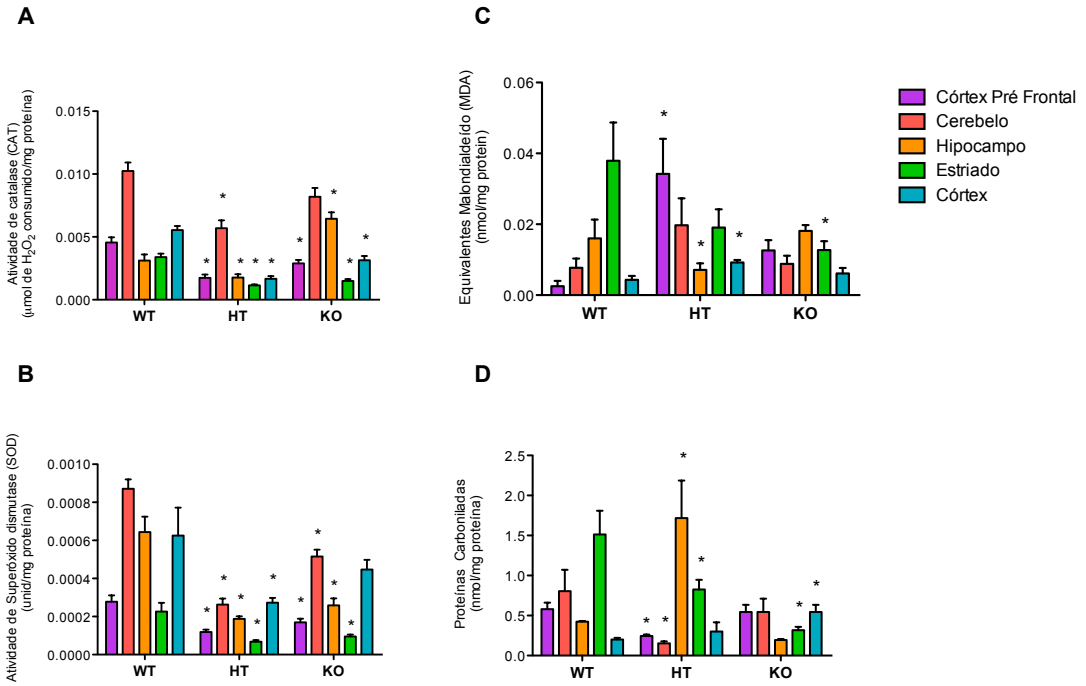


Figura 56.Impacto da ausência de Ncs-1 sobre parâmetros antioxidantes cerebrais. A atividade de (A) catalase (CAT), (B) superóxido dismutase (SOD), (C) nível de peroxidação de lipídios através formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nível de (D) carbonilação de proteínas foram avaliados a partir de homogeneizados cerebrais do córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex total originados de camundongos C57 B/L portadores dos genótipos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) e Ncs-$1^{-/-}$ (KO). Cada grupo experimental foi composto por 5 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. O resultado estatístico indica a comparação entre os grupos HT ou KO com o WT. * $p < 0,05$ (*one way* ANOVA).

A atividade do complexo II mitocondrial mostrou-se maior no CPF e EST dentre as regiões cerebrais analisadas em animais selvagens. Com exceção da diminuição observada no estriado de camundongos Ncs-1 KO, nenhuma outra alteração da atividade do complexo II mitocondrial foi estatisticamente significante quando os valores detectados nos homogeneizados cerebrais de animais Ncs-1 HT e KO foram comparados com os do grupo experimental Ncs-1 WT. (CPF: 2,63 vs. 3,26 vs. 1,64; CER: 1,6 vs. 1,42 vs. 1,21; HIP: 1,25

vs. 1,64 vs. 1,77; EST: 3,34 vs. 3,04 vs. 2,07; CTX: 1,05 vs. 1,08 vs. 1,42; WT vs. Ncs-1 HT vs. Ncs-1 KO, em nmol/minutos.mg de proteína) (Figura 57 B).

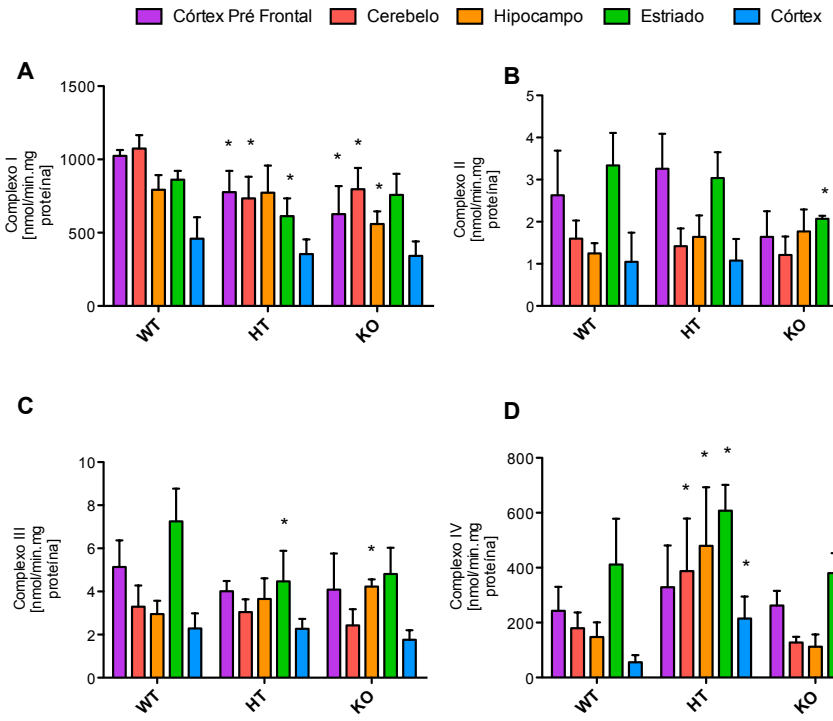


Figura 57.Impacto da ausência de Ncs-1 sobre a atividade de complexos mitocondriais no cérebro de camundongos. A atividade dos complexos mitocondriais (A) I (B), II (C) III e (D) IV foi avaliada a partir de homogeneizados cerebrais do córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex total originados de camundongos C57 B/L portadores dos genótipos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) e Ncs-$1^{-/-}$ (KO). Cada grupo experimental foi composto por 5 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. O resultado estatístico indica a comparação entre os grupos HT ou KO com o WT. * $p < 0,05$ (*one way* ANOVA).

A atividade do complexo II-III mitocondrial foi maior no estriado, considerando-se as outras áreas cerebrais estudadas em animais selvagens. A análise comparativa da atividade do complexo II-III mitocondrial entre os animais modificados geneticamente e a linhagem

selvagem revelou uma diminuição da atividade no estriado de animais Ncs-1 HT e, em contrapartida, um aumento no hipocampo dos representantes Ncs-1 KO (CPF: 5,14 vs. 4,01 vs. 4,09; CER: 3,3 vs. 3,05 vs. 2,43; HIP: 2,95 vs. 3,65 vs. 4,23; EST: 7,25 vs. 4,47 vs. 4,81; CTX: 2,29 vs. 2,29 vs. 1,76; WT vs. Ncs-1 HT vs. Ncs-1 KO, em nmol/minutos.mg de proteína) (Figura 57 C).

A mensuração da atividade do complexo IV mitocondrial não revelou diferenças marcantes entre os níveis observados nas cinco regiões cerebrais analisadas em cobaias selvagens, a exceção de uma leve redução dos valores no CTX. Utilizando estes valores como referência, nenhuma alteração na atividade do complexo IV mitocondrial foi detectada nas mesmas regiões cerebrais analisadas em animais Ncs-1 KO. No entanto, um significativo aumento da atividade do complexo IV mitocondrial foi observado no CER, HIP, EST e CTX de animais Ncs-1 HT (CPF: 243 vs. 329 vs. 262; CER: 179 vs. 387 vs. 127; HIP: 147 vs. 479 vs. 112; EST: 411 vs. 607 vs. 380; CTX: 55 vs. 215 vs. 153; WT vs. Ncs-1 HT vs. Ncs-1 KO, em nmol/minutos.mg de proteína) (Figura 57 D).

Em animais selvagens, o nível da atividade de SDH foi cerca de 2 vezes maior no EST se comparado com os valores detectados nas outras regiões investigadas. Na análise comparativa entre as linhagens, a atividade de succinato desidrogenase mostrou-se significantemente alterada apenas no CPF de ambos os grupos experimentais formados por camundongos Ncs-1 HT ou KO. Os animais Ncs-1 HT foram encontrados possuir níveis levemente aumentados. Em contrapartida, um nível reduzido foi detectado nesta mesma região em camundongos Ncs-1 KO (CPF: 6,7 vs. 8,32 vs. 4,23; CER: 5,35 vs. 4,34 vs. 3,72; HIP: 4,18 vs. 5,5 vs. 5,7; EST: 13,64 vs. 11,27 vs. 6,81; CTX: 2,02 vs. 2,33 vs. 2,17; WT vs. Ncs-1 HT vs. Ncs-1 KO, em nmol/minutos.mg de proteína) (Figura 58 A).

De acordo com as análises bioquímicas deste estudo, a atividade de CK cerebral é maior no CPF e EST de camundongos selvagens se os níveis obtidos são comparados com os valores do CER, HIP e CTX. Os animais Ncs-1 HT apresentaram um significativo aumento da atividade de creatina quinase no CER se comparado com os valores observados nos animais selvagens. Já nos Ncs-1 KO, uma redução da atividade de CK foi detectada no EST (CPF: 6,05 vs. 4,02 vs. 2,47; CER: 2,32 vs. 3,67 vs. 2,51; HIP: 2,47 vs. 3,25 vs. 2,70; EST: 5,99 vs. 6,28 vs. 2,66; CTX: 2,19 vs. 2,69 vs. 1,26; WT vs. Ncs-1 HT vs. Ncs-1 KO, em unidades/mg de proteína) (Figura 58 B).

Estes resultados indicam que tanto o perfil dos parâmetros antioxidantes quanto o metabolismo energético cerebral são alterados pela deleção homozigótica ou dizigótica de Ncs-1.

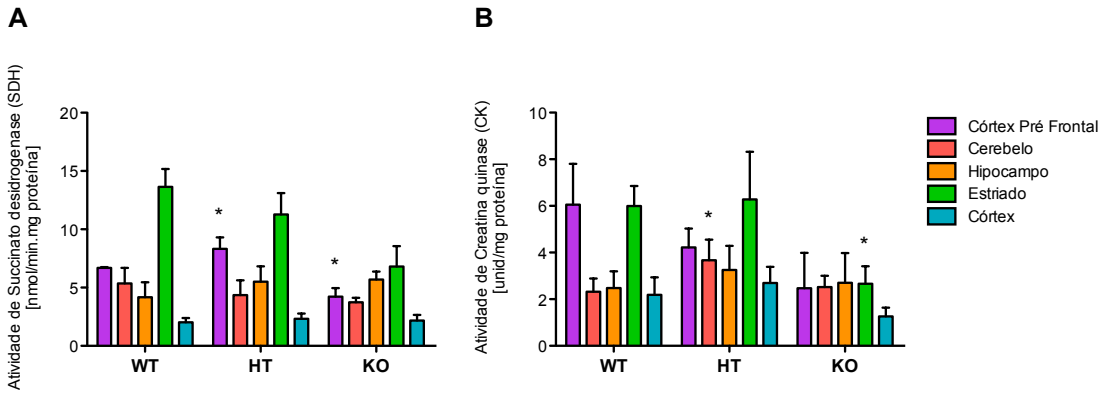


Figura 58. Impacto da ausência de Ncs-1 sobre a atividade de SDH e CK no cérebro de camundongos. A atividade de (A) succinato desidrogenase (SDH) e (B) caseína quinase (CK) foi avaliada a partir de homogeneizados cerebrais do córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, estriado e córtex total originados de camundongos C57 B/L portadores dos genótipos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) e Ncs-$1^{-/-}$ (KO). Cada grupo experimental foi composto por 5 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. O resultado estatístico indica a comparação entre os grupos HT ou KO com o WT. * $p < 0,05$ (*one way* ANOVA).

4.2.4 Efeito do tratamento com VPA sobre parâmetros antioxidantes em animais deficiente de Ncs-1

Através de diversos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, este estudo e muitos outros têm sugerido um efeito neuroprotetor de fármacos estabilizadores do humor, particularmente o VPA (ATMACA, 2009; FENG, H.-L. *et al.*, 2008; KIM, A. J. *et al.*, 2005b; PLANT, K. E. *et al.*, 2009). Dentre as teorias empregadas para explicar esta observação, muitos estudos têm relacionado a indução da maquinaria celular antioxidante como uma importante modulação farmacológica relacionada com a ação protetora do VPA. O fato de que Ncs-1 é reportado apresentar função neuroprotetora, aliado a descoberta da indução da expressão do Ncs-1 pelo VPA *in vitro* e *in vivo* motivaram o estudo a avaliar a possibilidade

de que Ncs-1 possa ser um dos alvos do fármaco para mediação dos efeitos protetores. Interessantemente, a ausência de Ncs-1 em animais geneticamente modificados acarretou em diferentes perfis em parâmetros antioxidantes e metabólicos cerebrais. Baseado nestas evidências, o objetivo do próximo experimento foi avaliar se a indução da defesa antioxidante pelo VPA é modificada pela ausência de Ncs-1.

Para tal, foi realizado um tratamento crônico (21 dias) com ácido valpróico (i.p.; 250 mg/kg/dia) ou Sal (i.p.; 0,9% NaCl) em camundongos portadores dos genótipos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) e Ncs-$1^{-/-}$ (KO). Em seguida, a análise dos níveis de peroxidação de lipídios (PL) e carbonilação de proteínas (CP) foi realizada a partir de homogeneizados cerebrais do córtex pré frontal, cerebelo, hipocampo e estriado.

A análise no córtex pré frontal revelou que o tratamento crônico com VPA foi efetivo em reduzir a PL (Sal: 0,06; VPA: 0,006; $p < 0,01$) e CP (Sal: 0,54; VPA: 0,14; $p < 0,05$) em animais selvagens. Em animais Ncs-1 HT, apesar do VPA também ter diminuído a CP (Sal: 0,236; VPA: 0,083; $p < 0,05$), a PL foi aumentada pelo tratamento (Sal: 0,001; VPA: 0,011; $p < 0,05$). O único efeito significativo do tratamento com VPA observado em animais Ncs-1 KO foi um aumento da PL (Sal:0,004; VPA: 0,011;$p < 0,05$) (Figura 59 A).

Embora o tratamento crônico com VPA não tenha alterado os níveis de PL no hipocampo, um aumento da CP foi observado (Sal: 0,097; VPA: 0,176; $p < 0,05$) nesta região. Este mesmo tratamento não alterou os níveis de CP em animais Ncs-1 HT e KO, no entanto, foi eficiente em diminuir os níveis de PL no hipocampo em ambos os grupos (HT Sal: 0,009; HT VPA: 0,0006; KO Sal: 0,001; KO VPA:0,0006 ; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 59 B).

Nenhuma alteração nos níveis de CP foi observada no estriado de camundongos tratados cronicamente com VPA. No entanto, os níveis de PL estiveram aumentados no grupo tratado (Sal: 0,001; VPA: 0,003; $p < 0,05$). Embora o tratamento com VPA tenha diminuído

os níveis de CP e PL em camundongos Ncs-1 HT (CP Sal: 0,010; CP VPA: 0,003; PL Sal: 0,126; PL VPA: 0,04; $p < 0,05$ para ambos), nenhuma alteração foi observada no estriado de camundongos Ncs-1 KO (Figura 59 C).

O tratamento com VPA reduziu os níveis de PL no cerebelo de todos os grupos analisados ($p < 0,05$ para todas as análises). Já a CP só esteve reduzida nos animais Ncs-1 HT (Figura 59 D).

Juntos, estes resultados mostram que a ausência de Ncs-1 altera o efeito do tratamento com VPA sobre a peroxidação de lipídeos e carbonilação de proteínas cerebrais em camundongos.

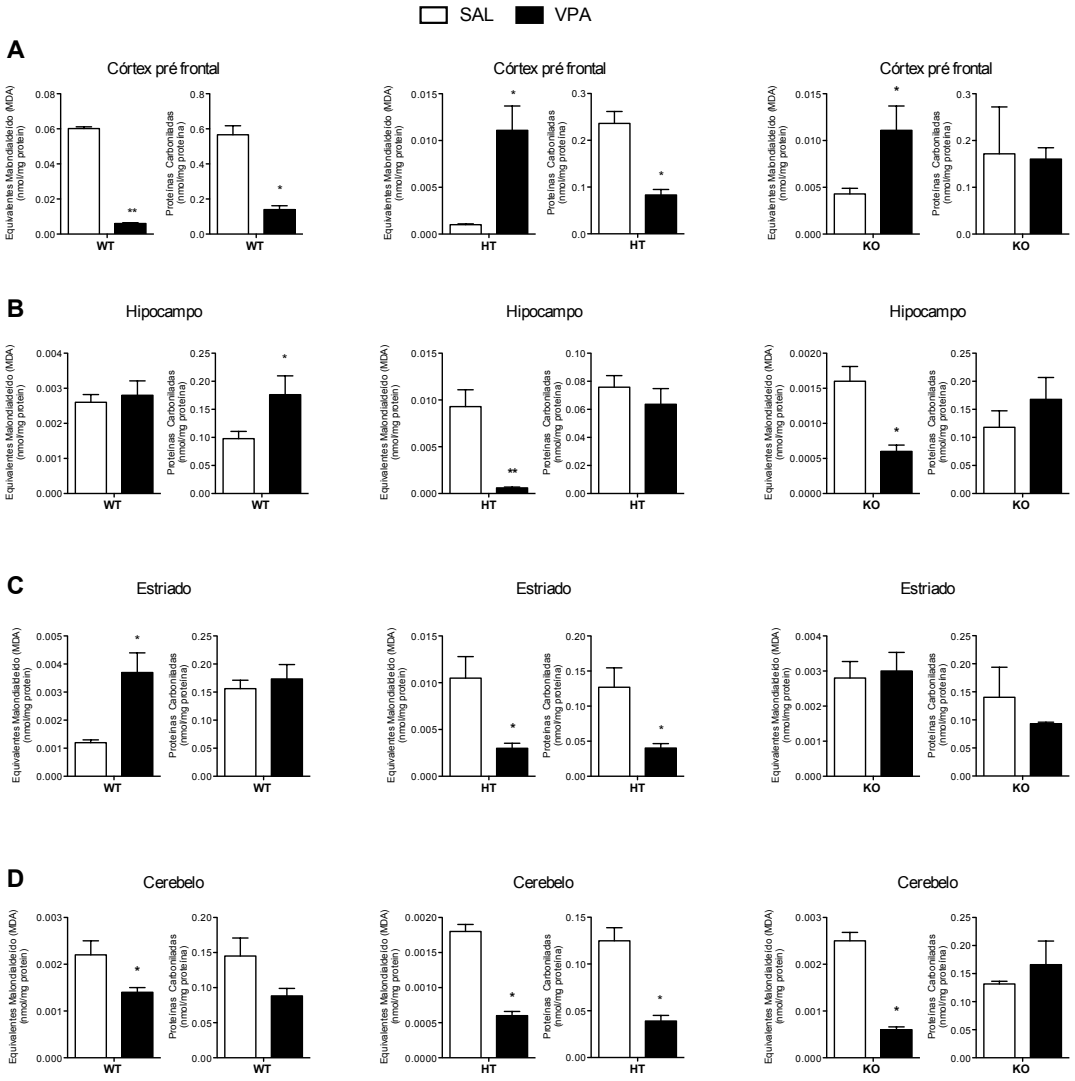


Figura 59. Efeito do tratamento com valproato sobre a peroxidação de lipídeos e carbonilação de proteínas cerebrais em animais deficientes de Ncs-1. O tratamento crônico com VPA (i.p.; 250 mg/kg/dia) ou Sal (i.p.; 0,9% NaCl) por 21 dias foi realizado em camundongos C57 B/L portadores dos genótipos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) e Ncs-$1^{-/-}$ (KO). Após o tratamento, os níveis de peroxidação de lipídios através formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de carbonilação de proteínas foram avaliados a partir de homogeneizados cerebrais do (A) córtex-pré frontal, (B) hipocampo, (C) estriado e (D) cerebelo. Cada grupo experimental foi composto por 5 animais. Os resultados nos gráficos representam a média ± SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t teste).

4.2.5 Efeito do tratamento com VPA sobre a memória de reconhecimento de objetos em animais Ncs-1 HT e KO

Os resultados anteriores mostraram que a ausência de Ncs-1 em animais geneticamente modificados acarretou em diferentes magnitudes do efeito do tratamento crônico com VPA sobre o estado oxidante cerebral. Além desta abordagem bioquímica do impacto da ausência de Ncs-1 sobre os efeitos do VPA *in vivo*, o estudo desta vez buscou avaliar uma similar associação, porém da perspectiva comportamental. Diversas evidências têm reportado um efeito positivo do tratamento com VPA sobre a cognição (BREDY; BARAD, 2008; QING *et al.*, 2008). Baseado neste pressuposto, o próximo passo do estudo foi avaliar se um efeito positivo do tratamento crônico com VPA sobre o desempenho no teste de reconhecimento de objetos é visto e, se é afetado pela deficiência de Ncs-1 em camundongos.

Camundongos Ncs-$1^{+/+}$ (WT), Ncs-$1^{-/+}$ (HT) ou Ncs-$1^{-/-}$ (KO) foram tratados cronicamente por 21 dias com ácido valpróico (i.p.; 250 mg/kg/dia) ou Sal (i.p.; 0,9% NaCl). No último dia de tratamento, o teste de reconhecimento de objetos foi aplicado para avaliação da memória de longa duração dos grupos experimentados. Durante a realização do teste comportamental, a capacidade exploratória foi simultaneamente avaliada através do *open field* e nenhuma alteração locomotora estatisticamente significante foi detectada entre os grupos experimentados (dados não mostrados). Os animais selvagens sem tratamento, de maneira geral, obtiveram um melhor desempenho nas sessões de teste se comparado as sessões de treino ($p < 0,05$) considerando apenas o teste de memória de reconhecimento de objetos. Este resultado valida o paradigma do teste e é computado como índice de recognição. Quanto maior o índice de recognição, melhor a performance no teste. O tratamento empregado com VPA não melhorou a performance dos camundongos WT nem HT no teste de reconhecimento

de objetos uma vez que nenhuma diferença estatisticamente significante do índice de recognição entre os grupos não-tratados e tratados foi observada (Figura 60 A e B). Interessantemente, o experimento detectou que os animais Ncs-1 KO são deficientes em executar este teste já que, atipicamente, o desempenho na fase de testes não foi superior ao da fase de treino no grupo não tratado. Possivelmente, este dado revela que a ausência de Ncs-1 nestes animais está associada com um déficit cognitivo para reconhecer objetos, o qual não é revertido pelo tratamento crônico com VPA (Figura 60 C).

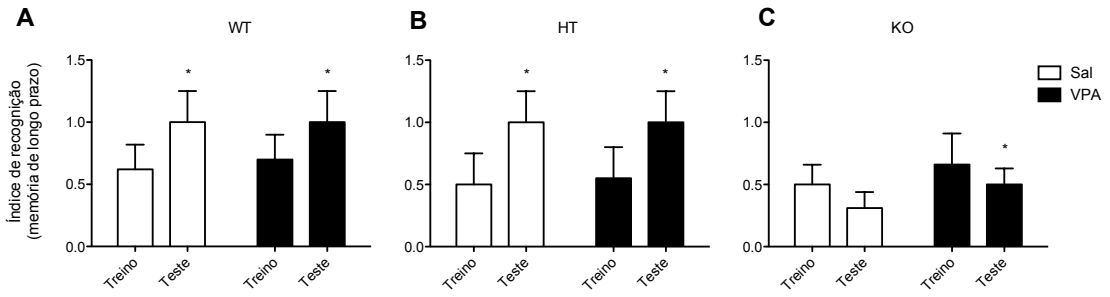


Figura 60. Efeito do tratamento crônico com valproato sobre a memória de reconhecimento de objetos de longa de duração em animais Ncs-1 WT, HT e KO. Camundongos (A) Ncs-$1^{+/+}$ (WT), (B) Ncs-$1^{-/+}$ (HT) ou (C) Ncs-$1^{-/-}$ (KO) foram tratados cronicamente com Sal (i.p.; 0,9% NaCl) ou VPA por 21 dias (i.p.; 250 mg/kg/dia). No último dia de tratamento, os testes de atividade exploratória e de reconhecimento de objetos para avaliação da memória de longa duração foram aplicados. Na sessão de treino os camundongos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e a exploração de cada um deles foi computada. Após 24 horas, na fase de testes, os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por 5 min para avaliar a retenção da memória de longa duração. Cada grupo experimental foi composto por 12 animais. Os dados (média ± SEM) são apresentados como índice de recognição. *$p < 0,05$ (Wilcoxon).

4.2.6 Longevidade e resistência ao estresse oxidativo induzido pelo paraquat em cepas de *C. elegans* nocaute de Ncs-1.

Apesar de existirem alguma evidências mostrando que a superexpressão de Ncs-1 causa proteção neuronal ou que sua ausência causa um desequilíbrio na maquinaria antioxidante celular e metabolismo energético, até o momento, não existe nenhum estudo que tenha avaliado o impacto da ausência de Ncs-1 na longevidade e sobrevivência animal em modelos experimentais de estresse oxidativo. Baseando-se nestas evidências, a hipótese levantada por este estudo é de que animais deficientes de Ncs-1 possam ser mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Para testá-la, foi empregado um modelo experimental de indução do estresse oxidativo pela exposição de cepas do nematódeo *C. elegans* selvagens (*N2*) ou nocautes para Ncs-1 (*XA406*) ao paraquat. Este herbicida é reportado aumentar os níveis de radicais livres no organismo, que associada à depleção dos sistemas antioxidantes do organismo causam danos teciduais irreversíveis e morte (MCCORMACK *et al.*, 2005). Tanto a longevidade quanto o desenvolvimento larval de *C. elegans* podem ser alterados pelo desbalanço oxidativo induzido por diversos compostos (MUNOZ, 2003; ZHOU, K. I. *et al.*, 2011).

O primeiro parâmetro avaliado pelo estudo foi o impacto do paraquat na longevidade das cepas *N2* e *XA406*. Para tal, os animais na fase L1 foram cultivados em placas com meio NGM semeadas com *E. coli* (OP50) e, assim que chegaram no fim da fase L4, os animais foram transferidos para um novo meio de cultivo contendo paraquat na concentração de 2,4 mM, ou PBS. Os vermes foram contados diariamente até que não mais restasse nenhum exemplar vivo. Nestas condições, nenhuma diferença de longevidade entre as cepas *N2* e *XA406* foram observadas entre os grupos expostos ao PBS (*N2*: 18 ± 1,4 dias; *XA406*: 18 ± 2,1 dias; $p = 0,123$) (Figura 61). Como esperado, uma significativa redução na longevidade

dos vermes da cepa *N2* expostos ao paraquat foi observada (PBS: 18 ± 1,4 dias; PQ: 7 ± 3,1 dias; p < 0,0001) (Figura 61). De forma semelhante, o paraquat também reduziu a longevidade da cepa *XA406* (PBS: 18 ± 2,1 dias; PQ: 8 ± 2,1 dias; p < 0,0001) e esta razão de redução longevidade não foi significativamente diferente da encontrada no grupo N2 (Figura 61).

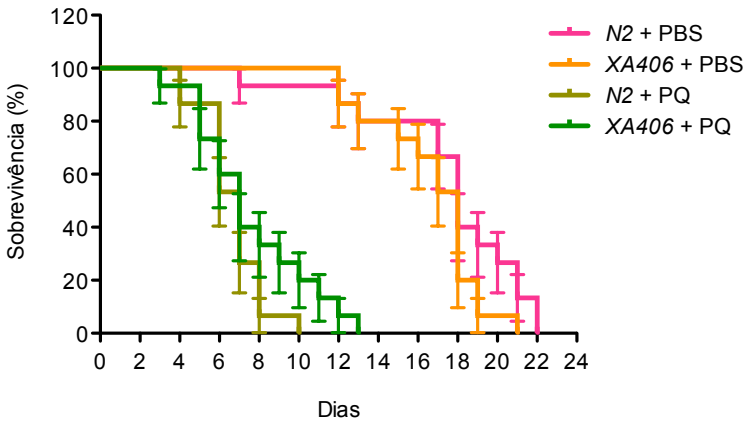


Figura 61. Impacto do paraquat na longevidade das cepas de *C. elegans N2* e *XA406*. Os animais na fase L1 foram cultivados em placas com meio NGM semeadas com *E. coli* (OP50) e, assim que chegaram ao fim da fase L4, entre 20 e 25 vermes foram transferidos para uma nova placa com meio de cultivo contendo paraquat na concentração de 2,4 mM ou PBS (6 placas por experimento). Os vermes foram contados diariamente até que não mais restasse nenhum exemplar vivo. Durante o período de ovoposição, os animais foram transferidos diariamente para um nova placa com NGM semeadas com *E. coli* (OP50) de modo a evitar mistura entre as gerações. Morte foi classificada como ausência de movimento e falha completa de reflexo após gentis "cutucadas" com uma haste de platina. Placas eventualmente contaminadas ao longo dos dias foram excluídas das análises. *N2*: cepa selvagem; *XA406*: cepa nocaute de Ncs-1. Os dados (média ± SEM) são apresentados como porcentagem média de sobrevivência. A análise estatística foi realizada pelo teste log-rank (Mantel-Cox).

Um outro parâmetro avaliado pelo estudo foi o efeito do paraquat sobre o desenvolvimento larval das cepas *N2* e *XA406*. Neste experimento, os vermes sincronizados na fase L1 foram transferidos para placas de meio de cultivo NGM semeadas com *E. coli* (OP50) contendo paraquat nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 e 2,4 mM ou PBS. Nestas condições, os animais foram examinados diariamente e classificados como adultos viáveis (aqueles que chegaram à fase adulta em no máximo 10 dias com ovoposição), com atraso no desenvolvimento (aqueles que não chegaram a fase adulta, mesmo após 10 dias) ou decapitados.

Todas as cepas expostas ao PBS tiveram desenvolvimento normal e tornaram-se adultos viáveis dentro do tempo estipulado (Figura 62 A). No entanto, a medida que os animais foram expostos às concentrações maiores de paraquat, a porcentagem de animais com desenvolvimento atrasado ou decapitados foi-se aumentando (Figura 62 B e C). Apenas considerando a cepa selvagem (*N2*), por exemplo, a concentração de 0,4 mM de paraquat atrasou o desenvolvimento de cerca de 15% dos animais como também matou outros 15%. Já a concentração de 1,2 mM aumentou a porcentagem de vermes com desenvolvimento atrasado para 40% e mortalidade para 60%. Outro dado interessante é que esta cepa não foi capaz de chegar a fase adulta em concentrações de paraquat iguais ou superiores a 0,8 mM. Resultados similares também puderam ser observados nos experimentos que envolveram as cepas *XA406,* a exceção da menor taxa de mortalidade e maior porcentagem de animais com desenvolvimento atrasado na concentração testada de 0,8 mM de paraquat (Figura 62 B e C).

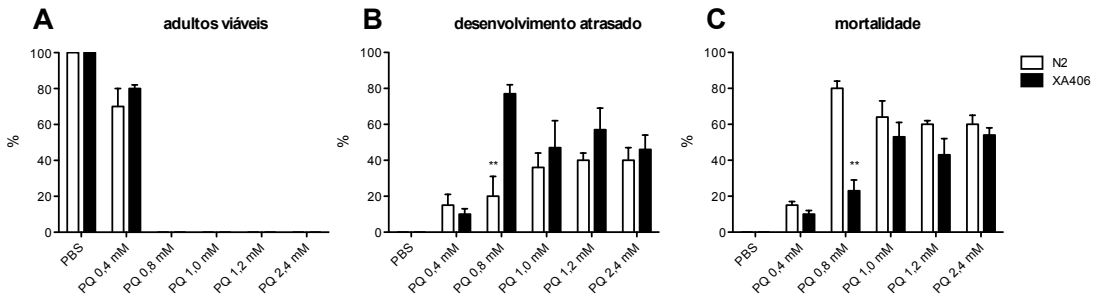


Figura 62.Impacto do paraquat sobre o desenvolvimento larval das cepas de *C. elegans N2* e *XA406*. Aproximadamente 15 vermes sincronizados na fase L1 foram transferidos para placas de meio de cultivo NGM semeadas com *E. coli* (OP50) contendo paraquat nas concentrações de 0,4; 0,8; 1,0; 1,2 e 2,4 mM ou PBS (4 experimentos em duplicata para cada condição). Nestas condições, os animais foram examinados diariamente e classificados como adultos viáveis (aqueles que chegaram a fase adulta em no máximo 10 dias com ovoposição), com atraso no desenvolvimento (aqueles que não chegaram a fase adulta, mesmo após 10 dias) ou decapitados. *N2*: cepa selvagem; *XA406*: cepa nocaute de Ncs-1. Os dados (média ± SEM) são apresentados como porcentagem média relativa ao controle experimental (PBS). **$p < 0,01$ (t teste).

5 DISCUSSÃO

5.1 Estabilizadores do humor induzem alterações na expressão de Ncs-1

Em células PC12, o estudou mostrou que o tratamento *in vitro* com os fármacos Li, VPA e LTG induziram os níveis da expressão de Ncs-1 (Figuras 27-39). Apesar de não existir um consenso na literatura médica, as concentrações utilizadas neste tratamento visaram cobrir os intervalos de concentração descritas e associadas com o efeito terapêutico em humanos (Li: 0,5-1,5 mM; VPA: 0,625-2,5 mM; LTG: 10-100 μM e CBZ: 10-50 μM). Para alguns experimentos, uma concentração que representou superdosagem também foi utilizada. Para Li, as três concentrações testadas (0,5; 1,0 e 1,5 mM) foram eficazes em induzir a expressão de Ncs-1 após cerca de 6 h. Para VPA, apenas a menor concentração teve o mesmo efeito, no entanto, mais cedo, em 3 h de tratamento. Apenas a concentração de 100 μM de LTG foi capaz de induzir a expressão de Ncs-1, contudo após 24 h de tratamento. Não é surpreendente a observação das diferentes cinéticas em que estes fármacos modularam a expressão de Ncs-1, se considerarmos as diferentes estruturas moleculares destes compostos. Por exemplo, o Li é um íon da classe dos metais alcalinos, o VPA é um ácido graxo de cadeia curta e a LTG um derivado da feniltriazina. Em contrapartida, o resultado mostrando que compostos de estruturas não relacionadas podem ter um alvo farmacológico comum, o Ncs-1, é um importante dado que necessita ser profundamente investigado.

Embora os FEHs sejam empregados clinicamente para tratar sintomas similares, até o momento, poucos mecanismos de ação farmacológica em comum ao Li, VPA e LTG, como a inibição de Gsk3, têm sido descritos (BEAULIEU *et al.*, 2009; GOULD, TODD D *et al.*, 2004). Este estudo traz a tona a questão se estes fármacos estariam agindo por vias celulares de mesma natureza para induzir a expressão de Ncs-1, ou até mesmo, alcançar seus efeitos clínicos. Mesmo se evidências contundentes mostrarem que estes compostos podem ter vias farmacológicas comuns, ainda não se poderá descartar que a enorme variabilidade de alvos

farmacológicos modulados por estes medicamentos, podem, juntos influenciar para mais ou para menos no efeito clínico comum final (Tabela 1). Este fato poderia explicar as diferentes aplicações e cuidados clínicos do emprego dos estabilizadores do humor.

Apesar das três concentrações representativas do intervalo terapêutico do Li terem sido capazes de induzir a expressão de Ncs-1, apenas o modelo experimental de superdosagem com LTG teve este mesmo efeito, se considerado um intervalo terapêutico de 11 a 56 μM para este fármaco (DEVULDER, 2006). O resultado de que o VPA na concentração de 0,625 mM, mas não nas concentrações de 1,25 e 2,5 mM, pôde induzir a expressão de Ncs-1 merece uma atenção especial. A Associação Americana de Psiquiatria (*APA, American Psychiatric Association*) recomenda a manutenção da concentração plasmática de VPA no intervalo entre 50 e 125 μg/mL para tratamento de mania aguda, hipomania ou eutimia, por exemplo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). Uma concentração plasmática de VPA entre 50 e 125 μg/mL corresponde ao intervalo de 0,346 mM a 0,866 mM. É justamente neste intervalo que a concentração de 0,625 mM se encontra, ao contrário das concentrações de 1,25 e 2,5 mM. Por outro lado, existem indícios de que concentrações plasmáticas de VPA superiores a 450 μg/mL (3,1 mM) podem causar toxicidade (SPILLER *et al.*, 2000). Interessantemente, este estudo detectou uma redução da expressão de Ncs-1 em células tratadas em superdosagem com 2,5 mM de VPA. O efeito específico das baixas concentrações de VPA sobre a expressão de Ncs-1 pode ser explicado a partir de observações mostrando que, quando em altas concentrações, este composto atinge múltiplos alvos que modificam padrões de respostas mais sensíveis (KOSTROUCHOVÁ e KOSTROUCH, 2007).

Diversas evidências tem apontado que o tratamento de pacientes bipolares com carbamazepina não é convincente visto a sua reduzida eficácia terapêutica se comparada com Li e VPA (ROICK *et al.*, 2001). Diferente dos outros três fármacos testados, não observou-se

nenhum efeito da carbamazepina sobre a expressão de Ncs-1, apesar das concentrações experimentadas (10 e 50 μM) estarem no intervalo terapêutico reportado (4-12 mg/mL ou 16,9-50,7 mM) (VUCIĆEVIĆ *et al.*, 2007).

A expressão de Ncs-1 é induzida pela axotomia de neurônios motores do gânglio da raiz dorsal de ratos (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006). Esta observação levou os autores do estudo a hipotetizarem que o Ncs-1 poderia ter alguma função sobre os mecanismos de sobrevivência celular. Como o presente estudo detectou que os fármacos Li, VPA e LTG puderam induzir em PC12, foi levantada a hipótese de que a indução dos níveis da proteína estaria relacionada a uma hipotética toxicidade mediada pelos fármacos testados. Contudo, nenhum efeito negativo sobre a viabilidade celular foi detectada quando as células PC12 foram expostas a superdosagem com estes fármacos estabilizadores do humor testados (Figuras 31 e 33). Esta ausência de toxicidade celular nas concentrações experimentadas, possivelmente, refuta uma hipotética inespecificidade pela qual estes compostos estariam induzindo os níveis de Ncs-1. Em vista disso, sugeriu-se que poderia existir um mecanismo farmacológico específico e relacionado com indução da expressão do Ncs-1 por fármacos estabilizadores do humor.

Mas qual é o significado biológico da indução de Ncs-1 pelos fármacos testados em PC12? A superexpressão de Ncs-1 em células PC12 está associada a uma maior resistência a morte induzida pelo aumento do estresse oxidativo (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006). Os autores sugeriram que altos níveis intracelulares de Ncs-1 poderia ativar vias antiapoptóticas, pelas quais a sobrevivência celular seria reforçada contra estímulos tóxicos, como após exposição celular ao H_2O_2 (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006). Se por um lado existe o indício de que Ncs-1 pode contribuir para a sobrevivência neuronal, por outro, diversas evidências também têm mostrado efeitos neuroprotetores de fármacos estabilizadores do humor (CHUANG, DE-MAW, 2005). Por exemplo, Li e VPA aumentam a longevidade e

reduzem déficits neurológicos em um modelo experimental de esclerose lateral amiotrófica (FENG, H.-L. *et al.*, 2008). Neste estudo, também foi mostrado a capacidade em que o pré-tratamento com Li, VPA ou carbamazepina tem em aumentar a viabilidade celular em um modelo experimental de morte induzida pelo estresse oxidativo (Figura 33). Apesar da contundente capacidade neuroprotetora dos estabilizadores do humor, os mecanismos moleculares relacionados com este efeito biológicos ainda não estão bem esclarecidos (RAPOPORT *et al.*, 2009; SCHLOESSER *et al.*, 2012). Posto que as concentrações empregadas, além de aumentarem a viabilidade celular também induziram a expressão de Ncs-1, a princípio, é permitido levantar a hipótese de que a indução da expressão de Ncs-1 por estes medicamentos poderia ser uma das modificações bioquímicas (induzidas farmacologicamente) associada com um melhor condicionamento celular diante de estímulos nocivos.

Todavia, este estudo descarta a hipótese de que possa existir uma correlação linear e positiva entre a expressão de Ncs-1 e proteção celular pois as maiores concentrações dos medicamentos que determinaram as maiores porcentagens de viabilidade celular, contudo, sem alterar a expressão de Ncs-1. É importante ressaltar que existem diversos mecanismos moleculares associados com a sobrevivência celular, os quais podem ser manifestados de forma independente (BALLIF; BLENIS, 2001). Esta observação é coerente no que se diz respeito a complexa rede de sinalização molecular que regula os processos de morte e sobrevivência celular. Sendo assim, é de extrema valia investigar quais são os processos biológicos de defesa celular sensíveis a atuação do Ncs-1. Especificamente, o impacto da indução de Ncs-1 por estabilizadores do humor na sobrevivência celular deve ser melhor compreendido, por exemplo, através de modelos experimentais expostos aos fármacos tratado, contudo, deficientes de Ncs-1.

A observação de que os fármacos estabilizadores do humor induzem a expressão de Ncs-1 em PC12, embora interessante, possui pouco significado para associações entre o tratamento psiquiátrico e doenças mentais devido a simplicidade deste modelo experimental em face da complexa estrutura do sistema nervoso central. Sendo assim, um tratamento *in vivo* foi conduzido em camundongos com a finalidade de avaliar o efeito dos medicamentos sobre a expressão cerebral desta proteína (Figura 34). Salienta-se que os regimes de tratamento crônico com estabilizadores do humor empregados por este estudos são reportados ter eficácia antidepressiva e ansiolítica e, nessas condições, quaisquer alterações na expressão de Ncs-1 poderia refletir o "estado bioquímico" diante da situação "terapêutica" (BEAULIEU *et al.*, 2004; HERZOG *et al.*, 2008; LI, N. *et al.*, 2010; RALPH-WILLIAMS *et al.*, 2003). Como observado em PC12, o tratamento crônico com Li e VPA também induziu a expressão de Ncs-1 cerebral. No mínimo, os resultados deste experimento revelaram duas significantes observações a cerca da indução de Ncs-1.

Primeiramente, a indução da expressão de Ncs-1 foi observada no córtex frontal mas não no estriado (discutido adiante). Segundo, tanto para Li quanto para VPA, o tratamento crônico mas não o agudo, foi capaz de causar significativo aumento da expressão de Ncs-1 (Figuras 34 e 35). Esta observação pode estar relacionada com diversas evidências mostrando que o efeito terapêuticos das medicações psiquiátricas é apenas alcançado através do tratamento crônico (DUMAN, R S *et al.*, 1997; MALBERG *et al.*, 2000). Esta evidência clínica está de acordo com a teoria de que as medicações psiquiátricas induzem modificações celulares que, em longo prazo, contribui para o efeito terapêutico (ou adverso) (JACOBS *et al.*, 2000). Em virtude disso, a compreensão de como e em quais condições o tratamento psicofarmacológico modifica relevantes alvos moleculares é um grande passo para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas novas, seguras e mais eficazes em psiquiatria (WILKINSON, 2005)

Com o fim de caracterizar mais profundamente a ação farmacológica dos estabilizadores do humor sobre Ncs-1, avaliou-se a expressão genética do gene *NCS-1* em células PC12 ou córtex frontal de camundongos cronicamente tratados com Li, VPA ou LTG (apenas em PC12). Os resultados do qPCR mostraram que apenas o tratamento com VPA, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foi capaz de elevar os níveis de RNAm de Ncs-1 nas condições indicadas (Figura 36). Se por um lado o aumento dos níveis de RNAm de Ncs-1 após tratamento com VPA pode possivelmente explicar o aumento dos níveis da proteína no córtex frontal de camundongos tratados cronicamente com o mesmo medicamento, por outro, não correlaciona-se com o aumento visto *in vitro*. Em células PC12, o aumento da expressão de Ncs-1 induzido pelo VPA não foi detectado após 24 h de tratamento embora altos níveis de RNAm tenha sido observado. Diferente do VPA, o tratamento crônico com Li não alterou os níveis de RNAm de Ncs-1. Pelo menos, esta observação sugere duas hipótese: Li não age via expressão genética do gene *NCS-1* para elevar a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos ou células PC12; ou hipotéticas modulações do gene *NCS-1* pelo Li possa ocorrer na fase inicial do tratamento e, por este motivo, não pôde ser detectado no dia 15. De qualquer forma, estes dados mostram que apesar de obterem efeitos semelhantes sobre os níveis protéicos de Ncs-1 no córtex frontal e PC12, Li e VPA diferentemente agem no gene *NCS-1*. Sendo assim, é provável que tais compostos induzam Ncs-1 através de diferentes vias de sinalização celular.

Possivelmente, a indução da expressão de Ncs-1 pode englobar uma sistemática rede de fatores biológicos que são modificados pelo Li e VPA. Do ponto de vista molecular, alguns autores já até levantaram a hipótese de que a patogênese de muitas doenças psiquiátricas poderia ser reduzida a "variações normais de expressão gênica" e que uma intervenção terapêutica de sucesso visa a corrigir as "oscilações patogênicas" (HARRISON, P J; WEINBERGER, 2005; KIM, S. *et al.*, 2012). De fato, vários estudos independentes têm

demonstrado a alteração (*downregulation* ou *upregulation*) da expressão de genes envolvidos na maquinaria sináptica cerebral de pacientes psiquiátricos (ENGLISH, J. A. *et al.*, 2011; OWEN *et al.*, 2005). Estas evidências criaram o conceito do marcador biológico ou biomarcadores. Por exemplo, uma proteína com expressão ou estado alterados que se correlaciona com o risco ou a progressão de uma doença, ou indicador de resposta terapêutica (SINGH, I.; ROSE, 2009). Um estudo publicado em 2009 utilizando amostras do projeto *Gene Expression Omnibus* (GEO), indo de encontro com esta teoria, revelou como é complexa a rede de relações globais entre as variações farmacogênomicas e doenças (HU; AGARWAL, 2009). Particularmente em psiquiatria, significativas diferenças no transcriptoma cerebral relacionadas com alterações ou mau-funcionamento da comunicação sináptica foram associadas com as manifestações clínicas de várias condições (JOHNSTON-WILSON *et al.*, 2000; OWEN *et al.*, 2005; PENNINGTON, K *et al.*, 2008; VOINEAGU *et al.*, 2011).

Em 2003 um grupo de pesquisa sediado em Baltimore (Maryland, EUA) descobriu que amostras do córtex cerebral dorsolateral de pacientes esquizofrênicos e bipolares do *Stanley Foundation Neuropathology Consortium* apresentavam um aumento de aproximadamente 50% da expressão de Ncs-1 (KOH *et al.*, 2003). Esta evidência colocou o Ncs-1 no centro das atenções já que no ano anterior o estudo de Kabbani e colaboradores tinha identificado o Ncs-1 como sendo uma proteína que regulava a dessensibilização de receptores dopaminérgicos do tipo D2R, que por suas vez, é estreitamente associado com a patologia de doenças psiquiátricas (KABBANI *et al.*, 2002). Contudo, o estudo não pôde conceituar se o aumento observado da expressão de Ncs-1 poderia relacionar-se com o "desencadeamento" da manifestação clínica ou seria um mecanismo de "compensação biológica" face ao estabelecimento da condição psiquiátrica. Tal dicotomia da relevância funcional dos níveis cerebrais de Ncs-1, apesar de ainda não ser bem compreendida, ganhou

novos capítulos através dos estudos de simulação terapêutica com estimulação eletroconvulsiva e tratamento farmacológico. A indução da expressão de Ncs-1 já foi associada ao tratamento com metilfenidato e estimulação eletroconvulsiva em ratos (ROSA *et al.*, 2007; SOUZA, R. P. *et al.*, 2008). No entanto, nenhum efeito na expressão de Ncs-1 foi reportado após tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos (SOUZA, BRUNO R *et al.*, 2008). Estas evidência revelaram que específicas alternativas terapêuticas em psiquiatria têm a capacidade de modular a expressão de Ncs-1.

Presumidamente, a relevância de um biomarcador torna-se ainda mais significativa quando seus valores patológicos alterados são corrigidos através da intervenção terapêutica (KRAEMER *et al.*, 2002). Entretanto, até o momento, nenhum estudo tem investigado a dinâmica de como a expressão de Ncs-1 em um modelo patológico pode ser oscilado através do tratamento de recuperação. Com esta intenção, este trabalho apresentou um modelo animal de mania induzida por AMPH, caracterizado por um comportamento hiperlocomotor e estereotipado, que tem sido estreitamente utilizado para estudar mania (Figura 53) (SEONG *et al.*, 2002; TAKAO *et al.*, 2007). Após analisar a expressão de Ncs-1 em diversas áreas cerebrais, interessantemente, uma redução da expressão de Ncs-1 foi restritamente observada no córtex pré frontal. Esta redução da expressão de Ncs-1 foi corrigida através do tratamento de recuperação com VPA (Figura 54). Este resultado tende a reforçar a idéia de que o aumento da expressão do Ncs-1 esteja relacionado com os benefícios clínicos do tratamento psiquiátrico. Indo de encontro com esta hipótese, até onde se sabe, a literatura biomédica indica que expressão de Ncs-1 favorece as funções neurais. Por exemplo, favorecendo a plasticidade sináptica (AMICI *et al.*, 2009; HUI *et al.*, 2007; IKETANI *et al.*, 2009), neurotransmissão (CHEN, X. L. *et al.*, 2001; GROMADA *et al.*, 2005; GUIMARÃES, M. *et al.*, 2009; KAPP-BARNEA *et al.*, 2006; ZHENG, Q. *et al.*, 2005), neurodesenvolvimento

(BLASIOLE *et al.*, 2005), sobrevivência (BENBOW *et al.*, 2011; NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006) e ganho cognitivo (GOMEZ, M. *et al.*, 2001; SAAB *et al.*, 2009).

5.2 Mecanismos de ação relacionados com a indução da expressão de Ncs-1

Muitas pesquisas em farmacogenômica psiquiátrica têm sido guiadas pela assertiva de que expressão de genes e níveis de proteínas alterados que causam doenças são os alvos mais prováveis para a ação farmacológica e efeito terapêutico de medicamentos psiquiátricos (SIM; INGELMAN-SUNDBERG, 2011). Presumivelmente, a busca de um maior entendimento da ação farmacológica exercida por medicamentos estabilizadores do humor em vias intracelulares de comunicação foi responsável pela identificação dos mais promissores mecanismos de ação terapêuticos desta classe de compostos. Considerando esta estratégia de investigação, as próximas questões do estudos visaram justamente compreender o papel de selecionadas vias de sinalização intracelular alvos na "transmissão farmacológica" dos efeitos mediados por Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1.

5.2.1 Inibição da acetilação de histonas

Em 2001 foi descoberto um novo mecanismo de ação para uma medicação antiga: o VPA é um inibidor da histona deacetilase (HDAC – sigla do inglês). (PHIEL *et al.*, 2001).. A acetilação da histona está ligada à atividade transcricional, enquanto a deacetilação está ligada a inativação da transcrição gênica. Sendo assim, o VPA agindo como um inibidor de HDAC I, estimula a transcrição de genes epigeneticamente regulados por esta classe de histonas (ROSENBERG, 2007). Já que os resultados deste estudo mostraram que a expressão do gene

NCS-1 é induzida pelo VPA, foram realizados tratamentos em camundongos e em células PC12 com compostos IHDAC específicos com a finalidade de avaliar se o mecanismo de inibição de HDAC estaria relacionado com os efeitos positivos do VPA sobre a expressão de Ncs-1 (Figura 37).

Embora o regime de tratamento empregado seja reportado ter efeitos comportamentais em roedores, nenhuma alteração da expressão de Ncs-1 no córtex frontal foi observada em camundongos tratados cronicamente com MS275 (LIN, H. *et al.*, 2012; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2011). Em células PC12, ao contrário, observou-se que o tratamento com SAHA induziu a expressão de Ncs-1 dependente da concentração e do tempo. A divergência entre estes resultados pode ser atribuída a, pelo menos, três fatores. Primeiro no que diz a respeito às diferenças farmacológicas entre MS275 e SAHA. Enquanto MS275 é um inibidor de HDAC I, o SAHA possui um maior espectro de inibição uma vez que inibe as classes I e II de HDAC (MARKS; DOKMANOVIC, 2005). Desconsiderando as diferenças biológicas dos modelos experimentais testados, pode ser atribuído que a inibição de HDAC II – ou HDAC I e HDAC II, simultaneamente – seja fundamental para a indução de Ncs-1. No entanto, a inibição de HDAC II exercida pelo VPA não é significante (GRAYSON *et al.*, 2010). Sendo assim, o mecanismo de indução através da inibição de SAHA poderia ser independente e não relacionado a um mecanismo de ação do VPA sobre histonas. Segundo, em relação aos modelos experimentais empregados. Como os IHDACs regulam mecanismos epigenéticos, os resultados aplicados em modelos experimentais com diferentes genomas (rato e camundongo, neste caso) podem ser sensivelmente alterados. Por último, mesmo se for desconsiderada a divergência genômica, diferentes respostas podem ser esperadas a partir de tecidos com diferente origem embriológica. Por exemplo, o tratamento crônico com VPA aumentou Ncs-1 no córtex frontal mas não no estriado de camundongos.

A desregulação e a atividade aberrante de HAT e HDAC têm sido implicadas em profundos efeitos sistema nervoso central, como profundamente revisado recentemente por Mehler (MEHLER, 2008; SCHROEDER *et al.*, 2012). Muitos estudos sugerem que mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar e, principalmente, nos mecanismos de ação dos estabilizadores de humor (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2011; MENKE *et al.*, 2012; PEEDICAYIL, 2011; RICCIO, 2010). Por exemplo, a ação do VPA sobre HDAC tem sido reportada regular a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, proliferação e estabilidade sinápticas, que por sua vez, compensam a sinalização aberrante associada a fisiopatologia de doenças psiquiátricas (ATMACA, 2009; BOSETTI *et al.*, 2005; ROSENBERG, 2007). No entanto, é válido ressaltar que a ação do VPA sobre histonas, possivelmente, não é um mecanismo de ação fundamental para o tratamento do transtorno bipolar. Por exemplo, a valpromida, um composto similar ao VPA em que o grupo carboxila é substituído por uma amida, têm sido reportado ter eficácia clínica (BIALER, 1991; CALABRESE *et al.*, 2007). Em contrapartida, este fármaco não possui ação sobre HDAC e nem causa defeitos no desenvolvimento do tubo neural como o VPA (LAMPEN *et al.*, 1999; LÖSCHER; NAU, 1985; NAU *et al.*, 1991; PHIEL *et al.*, 2001; RADATZ *et al.*, 1998). Sendo assim, em virtude da complexidade do mecanismo de ação terapêutica do VPA, a indução do gene *NCS-1* por este medicamento merece uma maior e mais profunda elucidação. Por exemplo, comparando-se o efeito do tratamento do valproato e valpromide sobre os níveis de Ncs-1.

5.2.2 Inibição de Gsk3

A Gsk3 é capaz de fosforilar uma extensa gama de proteínas metabólicas, sinalizadoras e estruturais, além de fatores de transcrição gênica. Dentre os efeitos fisiológicos decorrentes, por exemplo, a Gsk3β foi diretamente associada à desestabilização da conformação dos microtúbulos, plasticidade sináptica e indução da atividade de proteínas que promovem a morte neuronal (BEAULIEU *et al.*, 2009; COHEN, PHILIP; FRAME, S, 2001; MAO *et al.*, 2009). A forma ativa de Gsk3β (desfosforilada na Ser9) provoca eventos que acarretam a desestabilização neuronal e, por conseguinte, parte da patologia de doenças psiquiátricas tem sido relacionada com um aumento na atividade desta proteína (BEAULIEU *et al.*, 2009; KAYTOR, 2002). O interesse do estudo em investigar o papel da Gsk3 na mediação dos efeitos dos estabilizadores do humor sobre a expressão de Ncs-1 surgiu a partir de dados publicados mostrando que estes medicamentos diminuem a atividade de Gsk3β em concentrações terapêuticas (BEAULIEU *et al.*, 2009). De acordo, este estudo observou que os níveis de fosforilação de Gsk3β no resíduo Ser9 (p-Ser9), um medidor do seu estado funcional, também foi aumentado após o tratamento com estabilizadores do humor tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Figura 38). O diferencial desta observação foi que a inibição de Gsk3β se deu nas mesmas condições em que os tratamentos com Li ou VPA induziram na expressão de Ncs-1 (Figuras 27-29). Este resultado sugeriu uma relação entre inibição de Gsk3β e aumento da expressão de Ncs-1.

Em 2008 foram publicados resultados reportando que se o Li perder seu efeito inibitório sobre Gsk3β em animais deficientes de formação do complexo βarr2/PP2A/Akt, a eficácia ansiolítica e antidepressiva do fármaco também é perdida (BEAULIEU; MARION; *et al.*, 2008b). Esses achados, além de revelar um interessante mecanismo de ação pelo qual o Li age em D2R, βarr2, PP2A e Akt para exercer seus efeitos inibitórios sobre Gsk3β, adiciona

mais uma evidência que suporta esta proteína como um importante alvo do tratamento com estabilizadores do humor. A importância da via D2R-βarr2-PP2A-Akt-Gsk3β na indução farmacológica de Ncs-1, portanto, foi avaliada em virtude de sua significância terapêutica.

Para tal, foi realizado um novo tratamento crônico com Li, VPA e LTG em camundongos nocautes para βarr2 e D2R. Nestas condições, a expressão de Ncs-1 foi mensurada exclusivamente no córtex frontal, região associada com os efeitos positivos do tratamento sobre a expressão de Ncs-1. O emprego dos animais βarr2 e D2R para estudo pôde revelar o impacto dos medicamentos estabilizadores do humor sobre a expressão de Ncs-1 na ausência de efeito sobre Gsk3β. Isso ocorre em vista do efeito inibitório do tratamento sobre Gsk3β ser dependente do complexo de sinalização formado por βarr2/PP2A/Akt (BEAULIEU; MARION; *et al.*, 2008b). Interessantemente, nenhum efeito do tratamento com Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1 em animais nocautes para βarr2 e D2R foi encontrado (Figura 40). Este resultado significantemente diverge dos achados em animais selvagens, no qual a expressão de Ncs-1 foi aumentada pelo mesmo regime terapêutico (Figura 34). Juntos, estes dados sugerem que o Li e VPA dependem da ação farmacológica sobre D2R-βarr2-PP2A-Akt-Gsk3β para sortir seus efeitos terapêuticos ou modular a expressão de Ncs-1.

A perda de efeito farmacológico do Li e VPA sobre a expressão de Ncs-1 nestes animais modificados geneticamente pode ser atribuída a ausência de inibição da atividade de Gsk3β. Esta idéia ganha ainda mais suporte através dos resultados deste estudo mostrando que a específica inibição de Gsk3, através do tratamento com TDZD, por si só, é responsável pelo aumento da expressão de Ncs-1 *in vitro* (proteína e RNAm em PC12 e HEK293) e *in vivo*[*] (proteína no córtex frontal de camundongos) (Figura 41). Na tentativa de reproduzir resultados inversos do efeito de Gsk3 sobre a expressão de Ncs-1, células HEK 293 foram transfectadas com a isoforma humana da Gsk3β. Células HEK 293 foram escolhidas para este experimento em virtude da sequência promotora clonada no plasmídeo Myc-Gsk3β.pcDNA3

não ter mostrado atividade em células PC12 (dados não mostrado). A mudança para células HEK 293 não é significante já que o TDZD também induziu Ncs-1 nestas células (Figura 45). Embora os resultados deste experimento não tenha encontrado alteração dos níveis de proteína, a superexpressão de Gsk3β causou uma significativa diminuição da expressão do gene *NCS-1* (Figura 47). Esta divergência pode estar associada a diversos fatores. Primeiro, a proteína Ncs-1 pode ter um longa meia-vida nestas células ao ponto de que a redução dos níveis de RNAm não tenha um significante impacto em 48 horas após transfecção. Segundo, pelo fato de existirem duas isoformas humanas de Ncs-1 (sequências de acesso no NCBI NP_001122298.1 e NP_055101.2). Os primers utilizados no qPCR foram desenhados para detectar RNAm da isoforma NP_001122298.1, porém o anticorpo utilizado no western blot é imunorreativo para ambas as proteínas.

A diminuição da expressão cerebral de Ncs-1 observada após os tratamento crônico com LTG em animais selvagens foi revertida em animais βarr2, nos quais o tratamento aumentou a expressão de Ncs-1 (Figuras 34 e 40). A explicação para este resultado é desconhecida baseado nos mecanismos de ação propostos para a LTG até o momento. O mecanismo de ação mais conhecido para este fármaco é a inibição de canais de sódios dependente de voltagem, pelo qual é acreditado prevenir a liberação de neurotransmissores excitatórios como acetilcolina (HELEN, 1992; SCHLOESSER *et al.*, 2012). Também já foram propostos, com menor significância, outros mecanismos sobre canais de cálcio e potássio, além da sinalização mediada por receptores GABAérgicos tipo A (KETTER *et al.*, 2003).

Se por um lado a diminuição de Ncs-1 pode estar associada a prevenção da excitação neuronal pela LTG, por outro, poderia ser esperado que o VPA ou CBZ, anticonvulsivantes que também bloqueiam canais de sódio ou Ca^{2+}, alcançasse um efeito semelhante. Porém, o VPA aumenta a expressão de Ncs-1. Desta forma, um modelo que proponha a redução de

Ncs-1 via bloqueio de canais de canais iônico parece não adequar-se. Até mesmo a ação anticonvulsivante da LTG não adequa-se totalmente ao bloqueio destes canais. Por exemplo, a LTG é eficaz para tratar crises epilépticas tônico-clônicas parciais ou generalizada e de ausência. Se este efeito terapêutico fosse atribuído a ação em canais de sódio, tanto a fenitoína quanto a carbamazepina também seriam eficazes para todas estes condições. No entanto, estes fármacos não são eficazes para tratar crises de ausência (COULTER, 1997). Em contrapartida, evidências mostrando que LTG, assim como Li e VPA, inibe Gsk3 pode ser o ponto de apoio para explicar os seus diferentes benefícios clínicos em comparação com os outros anticonvulsivantes (BEAULIEU; MARION; *et al.*, 2008b). A carbamazepina, por exemplo, é reportada não ter ação sobre Gsk3 (WILLIAMS, R. S. B. *et al.*, 2002). Esta perda de efeito sobre Gsk3 pode estar associada com a ausência de efeitos da carbamazepina sobre a expressão de Ncs-1 em PC12 (Figura 30), embora a LTG, apesar de inibir Gsk3, tenha modulado diferentemente a expressão de Ncs-1 de acordo com o modelo experimental.

A compreensão de como a inibição de Gsk3 induz a expressão de Ncs-1 merece ser estudada mais profundamente. As duas isoformas de Gsk3, Gsk3α e Gsk3β, são inibidas indistintamente pelo TDZD (COHEN, PHILIP; GOEDERT, 2004). Logo, este estudo avaliou o efeito da diminuição ou ausência, especificamente, de cada uma destas isoformas com a finalidade de testar a significância biológica de cada uma delas sobre a expressão de Ncs-1 (Figuras 42 e 44). Os resultados mostraram que a expressão de Ncs-1 não está alterada no cérebros de animais $Gsk3\alpha^{-/-}$, $Gsk3\beta^{+/-}$ ou $Gsk3\beta^{Flox/Flox,\ CamKII\text{-}Cre+}$, um modelo experimental com expressão reduzida de Gsk3β especificamente no prosencéfalo (LATAPY *et al.*, 2012). Juntos, estes dados sugerem que a inibição mútua das isoformas Gsk3α e Gsk3β são necessárias para ocorrer a indução dos níveis de Ncs-1. No entanto, também não é descartado que mecanismos biológicos compensatórios durante o neurodesenvolvimento dos animais modificados geneticamente possam restaurar possíveis flutuações nos níveis de Ncs-1.

A inibição de Gsk3 resulta em alterações em múltiplas vias de sinalização, pelas quais ocorrem mudanças adaptativas capazes de regular a função cerebral. Juntos, estes resultados evidenciam que o Ncs-1 é mais um alvo molecular modulado por Gsk3 e sugere que outros estudos possam avaliar a função de Ncs-1 nos mecanismos celulares regulados por Gsk3.

5.2.3 Inibição de Erk

Assim como Gsk3, a via das MAPKs também é implicada na mediação dos efeitos terapêuticos de diversas classes de fármacos psiquiátricos (BALLIF; BLENIS, 2001; KIM, E. K.; CHOI, E.-J., 2010; YASUDA *et al.*, 2011). Além disso, vários estudos tem reportado a habilidade como esta via de sinalização regula a expressão gênica via fatores de transcrição (JOHNSON; LAPADAT, 2002; SU, B.; KARIN, 1996). As experimentações iniciais realizadas por este estudo mostraram que o tratamento crônico com VPA a 25 mg/kg (Figura 34), mas não a 10 mg/kg (dados não mostrados), induziu a expressão de Ncs-1 no córtex frontal de camundongos. Interessantemente, dados em publicação do nosso grupo de pesquisa mostraram que embora o tratamento crônico com ambas as doses de VPA possuam efeitos antidepressivos e ansiolítico, apenas a dose de 25 mg/kg causa a redução dos níveis de pErk1/2.

Com a finalidade de avaliar se a redução dos níveis de pErk1/2 poderia estar relacionada com o aumento dos níveis de Ncs-1, como visto no tratamento crônico com VPA a 25 mg/kg, foi realizada a administração *in vitro* e *in vivo* de compostos farmacológicos que diminuem os níveis pErk1/2. Para fins de comparação com dados literários, o composto U0126 foi empregado para tratar células PC12 devido ao maior volume de estudos que tem utilizado este inibidor. O estudo optou pelo tratamento com SL327 para o tratamento *in vivo*

pois fez-se necessário utilizar um fármaco que pudesse ser permeável a barreira hematoencefálica. Nestas condições, os resultados revelaram que o U0126 foi capaz de induzir os níveis protéicos e de RNAm de Ncs-1 em células PC12. Resultado semelhante foi encontrado a partir das análises no córtex frontal de camundongos tratados com SL327.

Interessantemente, das duas doses utilizadas do inibidor SL327 (50 mg/kg ou 75 mg/kg), apenas aquela que eficientemente diminuiu os níveis de pErk1/2 no córtex frontal, foi capaz de induzir a expressão de Ncs-1 local. Por exemplo, a redução dos níveis de pErk1/2 no estriado por ambas as doses de 50 mg/kg ou 75 mg/kg não apresentou algum efeito sobre Ncs-1. O resultado que mostra o efeito da inibição das MAPKs sobre a expressão de Ncs-1 especificamente no córtex frontal não é isolado. Os tratamentos com Li, VPA e TDZD também revelaram a habilidade pela qual Ncs-1 é diferentemente modulado nesta área. Diversos estudos de imagem e post-mortem tem associado a desregulação de circuitos neuronais do córtex frontal com doenças psiquiátricas (DUMAN, RONALD S; VOLETI, 2012). Esta região é chave na regulação do humor devido a extensas ligações com circuitos corticais e subcorticais envolvidos no processamento emocional como amígdala, corpos mamilares e tálamo. A diminuição da ativação dos lobos pré-frontais em vários tipos de tarefas é a alteração funcional mais reportada no TAB (BLUMBERG *et al.*, 1999, 2003; TOWNSEND *et al.*, 2012). Um conjunto de evidências tem reportado particularidades bioquímicas de subpopulações neuronais que visam explicar as diferentes observações clínicas originadas de disfunções nesta região cerebral (BENEYTO *et al.*, 2011; MIDDLETON *et al.*, 2002; MIRNICS, KÁROLY *et al.*, 2000; URANOVA *et al.*, 2004). Desta forma, a expressão e interação de fatores associados com a indução de Ncs-1 pelos fármacos investigados poderia não estar presente em outras regiões cerebrais, tal como o estriado. Este dado suporta os diferentes efeitos de fármacos psiquiátricos observados sobre a estrutura e função sináptica de acordo com a área cerebral estudada (BATEUP *et al.*, 2008;

LOBO *et al.*, 2010). Interessantemente, Chen e colaboradores mostraram que a expressão de Ncs-1 é cerca de seis ou 100 vezes maior no córtex cerebral que em outras regiões cerebrais e medula espinhal, respectivamente (CHEN, C. *et al.*, 2002). Juntas, assas evidência sugerem que Ncs-1 desempenha alguma função específica ou majoritária nesta região, que por sua vez, pode ser modulada farmacologicamente.

5.3 Regulação da expressão genética do gene *NCS-1* pelos inibidores TDZD e U0126

O TDZD e o U0126 induziram simultaneamente os níveis de RNAm e proteína de Ncs-1 (Figuras 45 e 49). A rápida indução dos níveis de RNAm de *NCS-1* em aproximadamente 30 minutos que antecedeu o aumento dos níveis protéicos (1 h) sugeriram que ambos os compostos poderiam depender da ação sobre a expressão do gene *NCS-1* para aumentar os níveis da proteína Ncs-1. Logo, TDZD e U0126 dependeriam da síntese de proteínas para que o efeito indutor na expressão de Ncs-1 fosse detectada. O tratamento com TDZD e U0126 foi replicado e nenhuma indução dos níveis da proteína Ncs-1 foi observada em células pré-tratadas com CHX para o bloqueio da síntese de novas proteínas (Figuras 46 e 48). Este resultado sugere que a ação primária da inibição de Gsk3 ou MAPK, que permite o aumento dos níveis da proteína Ncs-1, seria dependente da expressão genética.

Possivelmente, a inibição destas vias de sinalização permite a ação de fatores de transcrição na região promotora do gene *NCS-1* e, consequentemente, o aumento dos níveis protéicos. Por exemplo, diversos estudos têm associado a inibição de Gsk3 com o aumento da atividade transcricional de genes relacionados com melhor prognóstico terapêutico em psiquiatria (FRELAND; BEAULIEU, 2012; GÖTSCHEL *et al.*, 2008; KIM, S. D. *et al.*, 2007). A análise da sequência genética localizada -2.100 pb 5' *upstream* ao TSS do NCS-1

identificou 60 potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição alvos das vias de Gsk3 e MAPK (levando em consideração 80% de homologia entre os motivos e com 95% de confiança estatística determinada pelo software NSITE/*SoftBerry*) (Figura 20).

Para testar a hipótese de que o promotor do gene *NCS-1* poderia ser regulado pela inibição de Gsk3 e Erk, um sistema de gene repórter para Ncs-1 foi desenvolvido. Três insertos candidatos a promotor originados do gene *NCS-1* humano foram clonados *upstream* ao gene da luciferase no vetor pGL4.10 (pGL4.10-NCS1.2005, pGL4.10-NCS1.1048 ou pGL4.10-NCS1.588). Após 48 h da transfecção, nenhum dos plasmídeos foi capaz de induzir a atividade de luciferase em HEK 293 expostas por 1 h ao TDZD, U0126 ou DMSO (Figura 52). A ineficiência destas sequências de, isoladamente, regular a expressão genética nestas células pode ser discutida a partir de diferentes hipóteses. Primeiramente, a regulação do gene *NCS-1* pode envolver a participação de outras regiões genômicas. Segundo, mesmo que estas sequências, isoladamente, tenham alguma função regulatória, os efeitos podem ser diferentemente detectados em diferentes tecidos. Isso decorre em virtude do sucesso da expressão de genes depender da integração entre vias de sinalização, fatores de transcrição, proteínas acessórias e sítios de ligação na região promotora, os quais são heterogeneamente distribuídos e regulados em diferentes tipos celulares (KAERN *et al.*, 2005; LEIN *et al.*, 2007; VOLFSON *et al.*, 2006). Por exemplo, o U0126 induziu a expressão do gene *NCS-1* em PC12, mas não em HEK 293.

Com o intuito de avaliar a atividade dos plasmídeos em outro tipo celular, a atividade basal de luciferase foi mensurada a partir de lisados de células PC12 transfectadas por 48 h. Interessantemente, o pGL4.10-NCS1.2005 induziu a atividade de luciferase em PC12 cerca de 4 vezes a mais que o background de células transfectadas com pGL4.10. Embora não seja claro se este leve aumento tenha algum um significado biológico, o efeito pronunciado poderia ser atribuído, por exemplo, ao fato da maior “semelhança neuronal” de células PC12

se comparadas às HEK 293 (BEAL, M F, 2001). É possível que a atividade de luciferase nestas células possa ser aumentada farmacologicamente, através da indução com TDZD, U0126, Li ou VPA por exemplo. Juntos, estes resultados sugerem uma maior investigação do potencial regulatório da região promotora clonada do *NCS-1* em outros modelos experimentais ou condições biológicas, além da caracterização molecular da indução da expressão genética de Ncs-1 através da inibição de Gsk3 ou MAPKs. No entanto, este experimento possui uma importante limitação técnica já que o sequenciamento genético dos insertos isolados por PCR ainda não foi realizado. Em contrapartida, como a amplificação dos insertos menores foram feitas a partir do maior, a probabilidade de clonagem de insertos errados é menor.

5.4 Impacto da deleção de Ncs-1 *in vivo*

Até o momento, a caracterização da deleção de Ncs-1 em modelos animais foi realizada em apenas cinco estudos utilizando quatro diferentes modelos animais. O primeiro, realizado em 2001, demonstrou que *C. elegans* nocaute de Ncs-1 apresentou déficits de memória associativa e aprendizado, os quais foram recuperados através da injeção da forma WT de Ncs-1 em interneurônios AIY (GOMEZ, M. *et al.*, 2001). Deleção de Ncs-1 na espécie de fungo *Aspergillus fumigatus* tornou a espécie menos resistente aos antifúngicos voriconazol, itraconazol e anfotericina (MOTA JÚNIOR *et al.*, 2008). Em *Drosophila sp*., a deleção de Ncs-1 causou defeitos na locomoção das larvas, transmissão sináptica, entrada de Ca^{2+} e diferenciação neuronal (DASON *et al.*, 2009). Recentemente, Nakamura e colaboradores mostraram que a deleção de Ncs-1 em camundongos causou diminuição da sobrevivência e alterações cardíacas possivelmente devido a desregulação dos sinais de cálcio em IP3Rs, CaMKII e calcineurina (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2011).

De maneira geral, estes estudos revelam significantes consequências negativas da deleção de Ncs-1. Mas a evidência mais consistente ligando a deleção de Ncs-1 com doenças psiquiátricas são de nosso grupo, a qual mostra que os animais Ncs-$1^{-/-}$ são caracterizados por alterações fenotípicas semelhantes a ansiedade, depressão e déficit de memória (dados não publicados). No intuito de investigar as alterações farmacológicas e bioquímicas que podem estar associadas com disfunções comportamentais de animais Ncs-$1^{-/-}$, aqui, a resposta comportamental ao tratamento com AMPH, o estresse oxidativo e metabolismo energético foram avaliados. Além disso, o efeito do tratamento do VPA sobre o estresse oxidativo e memória também foram investigados em animais Ncs-$1^{-/-}$.

De forma surpreendente, nossos resultados mostraram que animais Ncs-$1^{-/-}$ são resistentes a hiperlocomoção induzida pela AMPH (Figura 55). De forma similar, muitos estudos tem reportado que o antagonismo ou deleção de D2R causa menor sensibilidade ao efeitos psicoestimulatório de anfetaminas, por exemplo (BAST *et al.*, 2002; GLICKSTEIN; SCHMAUSS, 2004). Por outro lado, embora não exista inibidor de GRKs e nocaute de GRK2 seja letal, animais GRK6 KO apresentam hipersensibilidade a anfetaminas (GAINETDINOV *et al.*, 2003). Como, teoricamente, a deleção de Ncs-1 facilita a internalização de D2R devido a maior desinibição de GRK2 (Figura 17) (KABBANI *et al.*, 2002), a maior ou mais rápida dessensibilização de D2R em animais Ncs-$1^{-/-}$ pode explicar os resultados observados. Apesar de estar associado com o sistema dopaminérgico do ponto de vista molecular, este resultado é o primeiro a demonstrar experimentalmente o impacto de Ncs-1 sobre uma resposta comportamental dopaminérgica. Desta forma, pode ser um interessante ponto de partida para entender o porquê das alterações comportamentais em animais Ncs-1 KO.

A análise do estresse oxidativo em animais Ncs-$1^{-/-}$ ou Ncs-$1^{-/+}$ revelou diferentes níveis de PL, CP ou atividade de CAT, SOD em cinco distintas regiões cerebrais se comparados aos achado no animal Ncs-$1^{+/+}$ (Figuras 56-58). De maneira geral, embora a

deleção de Ncs-1 tenha diminuído a atividade de CAT ou SOD (Figura 56 A e B), não pareceu evidente que a expressão de Ncs-1 esteja diretamente correlacionada com todos dados obtidos em todas as áreas estudadas. Por exemplo, a atividade de CAT no HIP foi reduzida nos animais Ncs-$1^{-/+}$, os quais possuem 50% de expressão de Ncs-1, porém aumentada em animais Ncs-$1^{-/-}$ que não possui expressão da proteína (Figura 56 A). Este exemplo se repetiu para os outros parâmetros analisados, refletindo que as consequências da deleção de Ncs-1 variam drasticamente de acordo com as regiões cerebrais analisadas. Do ponto de vista molecular, estes dados podem estar associados com as diversas funções associadas com o Ncs-1, as quais também podem variar significativamente entre os circuitos cerebrais. Importante salientar que mesmo que a ausência de Ncs-1 aumente uma função antioxidante, isso não pode ser, necessariamente, traduzido em uma modificação benéfica para a célula. O aumento poder ser, por exemplo, uma resposta subjacente ao aumento de radicais livres (o que seria uma disfunção) (BITANIHIRWE; WOO, 2011). Desta forma, os dados devem ser interpretados com cautela e é sugerida a avaliação direta da produção de radicais livres para uma melhor compreensão da associação entre estresse oxidativo e Ncs-1.

Embora nossos dados não tenham esclarecido profundamente o impacto da deleção de Ncs-1 sobre o estresse oxidativo, ficou evidente que a deleção genética acarretou no desequilíbrio oxidativo em vista dos diferentes valores detectados entre os animais modificados geneticamente e selvagens. Esta observação nos levou a investigar o metabolismo energético destes animais através da função mitocondrial e atividade de SDH e CK, uma vez que disfunções nestes sistemas energéticos estão diretamente associados com aumento de processos oxidativos (HENCHCLIFFE; BEAL, M FLINT, 2008; PRABAKARAN *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2008). A análise do impacto da deleção de Ncs-1 sobre a atividade metabólica variou consideravelmente entre o tipo de complexo mitocondrial/enzima e área cerebral estudada (Figura 57 e 58). Por exemplo, a atividade do

complexo I foi menor, os complexo II, II-III, SDH e CK pouco foram influenciados e o complexo IV esteve aumentado em animais HT. Com exceção da atividade do complexo IV em animais HT, a deleção de Ncs-1 não influenciou nos níveis dos parâmetros investigados no CTX. Pelo contrário, o EST foi a região mais sensível às alterações.

Diversos estudos têm relacionado o desbalanço da maquinaria metabólica e antioxidante cerebral como uma das principais modificações metabólicas encontradas em pacientes portadores de doenças psiquiátricas (BITANIHIRWE; WOO, 2011; CHE *et al.*, 2010; MANJI, HUSSEINI K; QUIROZ, JORGE A; *et al.*, 2003). Embora o Ncs-1 já tenha sido reportado proteger o dano neuronal induzido por substâncias oxidantes (NAKAMURA, TOMOE Y *et al.*, 2006), ainda não está claro como Ncs-1 pode funcionalmente modificar a capacidade antioxidante cerebral. Desta forma, os dados apresentados aqui adicionam mais evidências do quanto seria útil uma investigação mais aprofundada da relação entre Ncs-1, estresse oxidativo e metabolismo cerebral.

No mesmo sentido, ainda é desconhecido os mecanismos moleculares responsáveis pelas ações antioxidante do VPA (JORNADA *et al.*, 2011; ZHANG, ZHENZHEN *et al.*, 2012). Aqui, nós partimos da perspectiva de que Ncs-1 seria um alvo molecular mediador das ações antioxidantes do VPA e, sendo assim, o efeito farmacológico do VPA sobre a PL e CP seria diferente entre animais Ncs-$1^{+/+}$, Ncs-$1^{-/+}$ e Ncs-$1^{-/-}$. Porém, e geral, nós não observamos uma significante diminuição da oxidação de lipídios e carbonilação de proteínas no cérebro de animais tratados com VPA (Figura 59 A-D). Pelo contrário, em algumas áreas cerebrais este parâmetros estiveram aumentado, o que reflete uma diminuição da defesa antioxidante. A diminuição dos níveis de PL e CB após tratamento com VPA só foi detectada no CPF e, interessantemente, este mesmo efeito não foi observado em animais Ncs-$1^{-/+}$ ou Ncs-$1^{-/-}$ (Figura 59 A). Considerando este dado isoladamente, este resultado sugere que a deleção de Ncs-1 influencia no efeito farmacológico do VPA sobre estes parâmetros antioxidantes no

CPF. Esta observação ganha mais relevância pelo fato de que é nesta região, CPF, que o VPA induziu expressão de Ncs-1. Os resultados deste experimento indicam, portanto, que o efeito do VPA sobre a PL e CP varia significantemente de acordo com a região cerebral estudada e não está ligado, necessariamente, com o aumento do poder antioxidante local.

Nossos experimentos revelaram que animais Ncs-$1^{-/-}$ possuem deficiência na execução do teste de reconhecimento de memória e está de acordo com prévias observações de nosso grupo de pesquisa (Figura 60). Esta disfunção cognitiva causada pela deleção de Ncs-1 pode se associar com resultados publicados recentemente. Saab e colaboradores, usando um estratégia diferente da nossa, mostraram que a superexpressão de Ncs-1 no giro denteado hipocampal causou ganhos cognitivos em camundongos, incluindo memória. O tratamento crônico com VPA (250 mg/kg/dia) foi ineficaz em aumentar a memória de longo prazo de reconhecimento de objetos em camundongos WT ou recuperar o déficit em animais KO como reportado em outros modelos experimentais (BREDY; BARAD, 2008; QING *et al.*, 2008). É possível que os efeitos do tratamento com VPA sobre a cognição sejam limitados para tipos específicos de modelos experimentais. Sendo assim, este estudo não pôde reproduzir um modelo comportamental influenciado pelo tratamento com VPA para investigar o impacto da deleção de Ncs-1.

A caracterização da deleção de Ncs-1 em modelos animais revela diversos déficits em funções chaves de sobrevivência celular. Aqui, pela primeira vez, o impacto da deleção de Ncs-1 sobre a longevidade foi investigado. Para esta finalidade, nós empregamos a cepa de *C. elegans XA406*, a qual é nocaute de Ncs-1. Para criar um ambiente de adversidade e maximar nossas observações, grupos experimentais expostos ao oxidante paraquat (PQ) também foram incluídos. Nenhuma diferença significativa foi observada quando a longevidade dos vermes adultos mutantes foi comparada com aquela de adultos selvagens, mesmo na presença do PQ (Figura 61). Estes resultados indicam que se Ncs-1 desempenha funções antioxidantes e

mantêm a sobrevivência celular, a ausência de expressão da proteína não é significante ao ponto de influenciar a viabilidade de *C. elegans* adultos. Embora exista um publicação mostrando que o tratamento com VPA aumenta a longevidade em *C. elegans* (EVASON *et al.*, 2008), nós não conseguimos reproduzir este resultados (dados não mostrados). Em nossas experimentações, até mesmo uma concentração de VPA 10X mais diluída que a reportada por Evason e colaboradores causou uma inibição irreversível da ovoposição de vermes adultos. Este efeito contribuiu para a morte prematura dos vermes devido a eclosão de larvas *in utero* (dados não mostrados).

Nós detectamos uma menor mortalidade de *C. elegans XA406* quando larvas em L1 foram expostas a 0,8 mM de PQ por 10 dias (Figura 62). Este achado foi atribuído ao aumento de larvas com desenvolvimento atrasado. É possível que nestas condições, o grupo *XA406* tenha uma maior facilidade de entrar na forma de *dauer*, a qual é mais resistente a estímulos nocivos. Interessantemente, em *C. elegans*, sabe-se que um limitado aumento do nível do estresse oxidativo está associado com uma maior longevidade e viabilidade dos vermes (ZHOU, K. I. *et al.*, 2011). Desta forma, se a nossa hipótese inicial de que a ausência de Ncs-1 aumenta o estresse oxidativo se confirmar, nós não descartamos que, nestes animais, a ausência de Ncs-1 possa trazer algum benefício. O fato disso não ter se consumado sobre a longevidade não descarta a hipótese. Como as larvas em L1 se adaptam melhor ao ambiente comparado aos vermes adultos, o impacto da ausência de Ncs-1 seria mais evidente nos vermes em desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

Apesar das doenças psiquiátricas, tal como o transtorno afetivo bipolar, estarem entre as mais comuns e debilitantes doenças humanas, pouco têm se avançado e ainda é considerável o índice de ineficácia e efeitos colaterais dos medicamentos empregados para tratar estas condições. (DUMAN, RONALD S; VOLETI, 2012). Para mover-se a um novo patamar científico, no qual os complexos mecanismos fisiopatológicos de doenças mentais e a farmacologia dos medicamentos estejam mais próximos de serem compreendidos, faz-se necessário que marcadores biológicos sejam interrogados e diretamente monitorados no diagnóstico e até no tratamento dessas doenças. Esse conceito tem contribuído para que o volume de estudos abordando o tema tenha aumentado exponencialmente.

Neste trabalho, nós mostramos pela primeira vez que a expressão do sensor neuronal de cálcio tipo 1 (Ncs-1) é induzida pelo tratamento com lítio e valproato em células PC12 e no córtex frontal de camundongos. Interessantemente, este mesmo efeito foi abolido quando o tratamento foi repetido em camundongos nocautes para βArr2 e D2R. Este dado nos levou a estudar a participação de vias intracelulares de transdução de sinais no efeito desses medicamentos sobre Ncs-1. A inibição das vias de sinalização de Gsk3 e Erk, as quais são alvos em comum do lítio e valproato, induziu a expressão o gene *NCS-1*, e pelo contrário, a superexpressão de Gsk3β *in vitro* reduziu os níveis de RNAm deste gene. A ação sobre o gene *NCS-1* mediada pela inibição de Gsk3 ou Erk mostrou-se fundamental para a elevação dos níveis intracelulares da proteína Ncs-1 pois a inibição da tradução impediu tal aumento observado. Com a finalidade de estudar a regulação da expressão do gene *NCS-1* por Gsk3 e Erk, três sequências candidatas a promotor foram clonadas em um sistema de gene repórter, porém, nenhuma atividade significante dessas sequências foi detectada em células HEK transfectadas. Até o momento, poucos alvos moleculares em comum que estejam relacionados com a ação farmacológica dos fármacos estabilizadores do humor (FEHs) foram identificados. Juntos, estes resultados apontam a proteína multifuncional Ncs-1 como o mais

novo alvo molecular regulado por lítio e valproato e sugere que a ação farmacológica destes medicamentos sobre Ncs-1 seja dependente da ação nas importantes vias de sinalização de Gsk3 e MAPKs.

A deleção de Ncs-1 *in vivo* pode causar um significativo impacto biológico e, possivelmente, terapêutico. Nossos resultados mostraram que animais nocautes de Ncs-1 são caracterizados por alterações no estresse oxidativo e metabolismo energético cerebral, déficit de memória de reconhecimento de objetos e não respondem a hiperlocomoção induzida por anfetamina. Interessantemente, nós reproduzimos um modelo experimental de mania aguda induzida por anfetamina e detectamos uma significante redução de Ncs-1 especificamente no córtex frontal que pôde ser normalizado através do tratamento com valproato para remissão da hiperlocomoção. Estes dados suportam dados publicados na última década que sugerem que o Ncs-1 pode ser um potencial biomarcador em psiquiatria. Portanto, a investigação da regulação farmacológica do Ncs-1 é de interesse devido ao crescente número de doenças neuropsiquiátricas associadas com a desregulação de vias intracelulares de sinalização de cálcio e dopamina.

Estes resultados inéditos, além de prover novos conhecimentos neurobiológicos do papel regulatório central das vias de Gsk3 e MAPKs, abrem uma janela para novas explorações que investiguem a participação do Ncs-1 na mediação dos efeitos terapêuticos e/ou adversos do tratamento com FEHs. Desta forma, o conhecimento gerado poderá ser fundamental para a identificação de funções celulares que contribuam significativamente para o entendimento da farmacoterapia dos transtornos do humor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKENHEIL, M. Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. **Journal of affective disorders**, v. 62, n. 1-2, p. 101-11, jan 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-6, jan 1984.

ALTAMURA, A. C.; LIETTI, L.; DOBREA, C. *et al.* Mood stabilizers for patients with bipolar disorder: the state of the art. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 85-99, jan 2011.

AMBRÓSIO, A. F.; SOARES-DA-SILVA, P.; CARVALHO, C. M.; CARVALHO, A. P. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. **Neurochemical research**, v. 27, n. 1-2, p. 121-30, fev 2002.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Practice guideline for the treatment of patients with bipolar disorder (revision). **The American journal of psychiatry**, v. 159, n. 4 Suppl, p. 1-50, abr 2002.

AMES, J. B.; LIM, S. Molecular structure and target recognition of neuronal calcium sensor proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 8, p. 1205-13, ago 2012.

AMICI, M.; DOHERTY, A.; JO, J. *et al.* Neuronal calcium sensors and synaptic plasticity. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 6, p. 1359-63, dez 2009.

ARZIMANOGLOU, A.; BEN-MENACHEM, E. The evolution of antiepileptic drug development and regulation. **Epileptic disorders**, 2010.

ATMACA, M. Valproate and neuroprotective effects for bipolar disorder. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, v. 21, n. 4, p. 410-3, jan 2009.

AUBRY, J.-M.; SCHWALD, M.; BALLMANN, E.; KAREGE, F. Early effects of mood stabilizers on the Akt/GSK-3beta signaling pathway and on cell survival and proliferation. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 3, p. 419-29, ago 2009.

BAHI, N.; FRIOCOURT, G.; CARRIÉ, A. *et al.* IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 12, p. 1415-25, 15 jun 2003.

BALLENGER, J. C.; POST, R M. Carbamazepine in manic-depressive illness: a new treatment. **The American journal of psychiatry**, v. 137, n. 7, p. 782-90, jul 1980.

BALLIF, B.; BLENIS, J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. **Cell growth and differentiation**, 2001.

BARGMANN, C. I. Genetic and cellular analysis of behavior in C. elegans. **Annual review of neuroscience**, v. 16, p. 47-71, jan 1993.

BAST, T.; PEZZE, M. A.; FELDON, J. Dopamine receptor blockade in the rat medial prefrontal cortex reduces spontaneous and amphetamine-induced activity and does not affect prepulse inhibition. **Behavioural pharmacology**, v. 13, n. 8, p. 669-73, dez 2002.

BATEUP, H. S.; SVENNINGSSON, P.; KUROIWA, M. *et al.* Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 932-9, ago 2008.

BEAL, M F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 325-34, maio 2001.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 4, p. 166-72, abr 2007.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 49, n. October, p. 327-47, jan 2009.

BEAULIEU, J.-M.; MARION, S.; RODRIGUIZ, R. M. *et al.* A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 125-36, 11 jan 2008a.

BEAULIEU, J.-M.; MARION, S.; RODRIGUIZ, R. M. *et al.* A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 125-36, 11 jan 2008b.

BEAULIEU, J.-M.; SOTNIKOVA, T. D.; MARION, S. *et al.* An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 261-73, 29 jul 2005.

BEAULIEU, J.-M.; SOTNIKOVA, T. D.; YAO, W.-D. *et al.* Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5099-104, 6 abr 2004.

BEAULIEU, J.-M.; ZHANG, X.; RODRIGUIZ, R. M. *et al.* Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 4, p. 1333-8, 29 jan 2008.

BELMAKER, R. H. Bipolar disorder. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 5, p. 476-86, 29 jul 2004.

BENBOW, J. H.; DEGRAY, B.; EHRLICH, B. E. Protection of neuronal calcium sensor 1 protein in cells treated with paclitaxel. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34575-82, 7 out 2011.

BENEYTO, M.; ABBOTT, A.; HASHIMOTO, T.; LEWIS, D. A. Lamina-specific alterations in cortical GABA(A) receptor subunit expression in schizophrenia. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 21, n. 5, p. 999-1011, maio 2011.

BERGSON, C.; LEVENSON, R.; GOLDMAN-RAKIC, P. S.; LIDOW, M. S. Dopamine receptor-interacting proteins : the Ca 21 connection in dopamine signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 9, p. 486-492, 2003.

BERKELEY NATIONAL LABORATORY. **The Isotopes Project: Isotopes of Lithium**. Disponível em: <http://ie.lbl.gov/education/parent/Li_iso.htm>. Acesso em: 13 ago. 2012.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 11-21, out 2000.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. **Progress in neurobiology**, v. 79, n. 4, p. 173-89, jul 2006.

BEUTLER, A. S.; LI, S.; NICOL, R.; WALSH, M. J. Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. **Life sciences**, v. 76, n. 26, p. 3107-15, 13 maio 2005.

BIALER, M. Clinical pharmacology of valpromide. **Clinical pharmacokinetics**, 1991.

BIJUR, G. N.; JOPE, R. S. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 40, p. 37436-42, 5 out 2001.

BITANIHIRWE, B. K. Y.; WOO, T.-U. W. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 3, p. 878-93, jan 2011.

BLASIOLE, B.; KABBANI, N.; BOEHMLER, W. *et al.* Neuronal calcium sensor-1 gene ncs-1a is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. **Journal of neurobiology**, v. 64, n. 3, p. 285-97, 5 set 2005.

BLUMBERG, H. P.; LEUNG, H.-C.; SKUDLARSKI, P. *et al.* A functional magnetic resonance imaging study of bipolar disorder: state- and trait-related dysfunction in ventral prefrontal cortices. **Archives of general psychiatry**, v. 60, n. 6, p. 601-9, jun 2003.

BLUMBERG, H. P.; STERN, E.; RICKETTS, S. *et al.* Rostral and orbital prefrontal cortex dysfunction in the manic state of bipolar disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 156, n. 12, p. 1986-8, dez 1999.

BOSETTI, F.; BELL, J. M.; MANICKAM, P. Microarray analysis of rat brain gene expression after chronic administration of sodium valproate. **Brain research bulletin**, v. 65, n. 4, p. 331-8, 30 abr 2005.

BOULTON, T.; YANCOPOULOS, G.; GREGORY, J. *et al.* An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. **Science**, v. 249, n. 4964, p. 64-67, 1990.

BOWDEN, C. L.; GRUNZE, H.; MULLEN, J. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy and safety study of quetiapine or lithium as monotherapy for mania in bipolar disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 66, n. 1, p. 111-21, jan 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 7 maio 1976.

BREDY, T. W.; BARAD, M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 1, p. 39-45, jan 2008.

BURGOYNE, R. D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca2+ signalling. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 182-93, mar 2007.

BURGOYNE, R. D.; WEISS, J L. The neuronal calcium sensor family of Ca2+-binding proteins. **The Biochemical journal**, v. 353, n. Pt 1, p. 1-12, 1 jan 2001.

BURTON, B. S. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. **Am. Chem. J.**, v. 3, p. 385- 395., 1882.

CADE, J. F. J. The anticonvulsant properties of creatinine. **Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 621–623, 1947.

CADE, J. F. J. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. **Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 349–352, 1949.

CALABRESE, J. R.; BOWDEN, C. L.; SACHS, G. *et al.* A placebo-controlled 18-month trial of lamotrigine and lithium maintenance treatment in recently depressed patients with bipolar I disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 64, n. 9, p. 1013-24, set 2003.

CALABRESE, J. R.; GUELFI, J. D.; PERDRIZET-CHEVALLIER, C. Agomelatine adjunctive therapy for acute bipolar depression: preliminary open data. **Bipolar disorders**, v. 9, n. 6, p. 628-35, set 2007.

CAN, A.; BLACKWELL, R. A.; PIANTADOSI, S. C. *et al.* Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. **Genes, brain, and behavior**, v. 10, n. 4, p. 434-43, jun 2011.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309-16, 15 abr 1996.

CASU, M. A.; SANNA, A.; SPADA, G. P. *et al.* Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. **Brain research**, v. 1141, p. 15-24, 13 abr 2007.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 299-309, abr 2003.

CHE, Y.; WANG, J.-F.; SHAO, L.; YOUNG, T. Oxidative damage to RNA but not DNA in the hippocampus of patients with major mental illness. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 35, n. 5, p. 296-302, set 2010.

CHEN, C.; YU, L.; ZHANG, P. *et al.* Human neuronal calcium sensor-1 shows the highest expression level in cerebral cortex. **Neuroscience letters**, v. 319, n. 2, p. 67-70, 15 fev 2002.

CHEN, G; HUANG, L. D.; JIANG, Y. M.; MANJI, H K. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. **Journal of neurochemistry**, v. 72, n. 3, p. 1327-30, mar 1999.

CHEN, GUANG; MANJI, HUSSEINI K. The extracellular signal-regulated kinase pathway: an emerging promising target for mood stabilizers. **Current opinion in psychiatry**, p. 313-323, 2006.

CHEN, X. L.; ZHONG, Z. G.; YOKOYAMA, S. *et al.* Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. **The Journal of physiology**, v. 532, n. Pt 3, p. 649-59, 1 maio 2001.

CHETCUTI, A.; ADAMS, L. J.; MITCHELL, P. B.; SCHOFIELD, P. R. Altered gene expression in mice treated with the mood stabilizer sodium valproate. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 9, n. 3, p. 267-76, jun 2006.

CHIN, P. C.; MAJDZADEH, N.; D'MELLO, S. R. Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. **Brain research. Molecular brain research**, v. 137, n. 1-2, p. 193-201, 13 jun 2005.

CHUANG, DE-MAW. The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1053, p. 195-204, ago 2005.

COGHLAN, M. P.; CULBERT, A. A.; CROSS, D. A. *et al.* Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. **Chemistry & biology**, v. 7, n. 10, p. 793-803, out 2000.

COHEN, PHILIP. The hormonal control of glycogen metabolism in mammalian muscle by multivalent phosphorylation. **Biochemical Society transactions**, v. 7, n. 3, p. 459-80, jun 1979.

COHEN, PHILIP. The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 354, n. 1382, p. 485-95, 28 fev 1999.

COHEN, PHILIP; FRAME, S. The renaissance of GSK3. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 10, p. 769-76, out 2001.

COHEN, PHILIP; GOEDERT. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 6, p. 479-87, jun 2004.

COLE, A.; FRAME, SHEELAGH; COHEN, PHILIP. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. **The Biochemical journal**, v. 377, n. Pt 1, p. 249-55, 1 jan 2004.

COULTER, D. A. Antiepileptic drug cellular mechanisms of action: where does lamotrigine fit in? **Journal of child neurology**, v. 12 Suppl 1, p. S2-9, nov 1997.

COVINGTON, H. E.; MAZE, I.; LAPLANT, Q. C. *et al.* Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 37, p. 11451-60, 16 set 2009.

CRADDOCK, N.; DAVÉ, S.; GREENING, J. Association studies of bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 3, n. 6, p. 284-98, dez 2001.

CRAWLEY, J. N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. **Neuron**, v. 57, n. 6, p. 809-18, 27 mar 2008.

CURK, T.; PETROVIC, U.; SHAULSKY, G.; ZUPAN, B. Rule-based clustering for gene promoter structure discovery. **Methods of information in medicine**, v. 48, n. 3, p. 229-35, jan 2009.

DANIEL, E. DI; MUDGE, A. W.; MAYCOX, P. R. Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH-SY5Y cells and in primary neurons. **Bipolar disorders**, v. 7, n. 1, p. 33-41, fev 2005a.

DANIEL, E. DI; MUDGE, A. W.; MAYCOX, P. R. Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH-SY5Y cells and in primary neurons. **Bipolar disorders**, v. 7, n. 1, p. 33-41, fev 2005b.

DASON, J. S.; ROMERO-POZUELO, J.; MARIN, L. *et al.* Frequenin/NCS-1 and the Ca2+-channel alpha1-subunit co-regulate synaptic transmission and nerve-terminal growth. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 22, p. 4109-21, 15 nov 2009.

DAVIES, S. P.; REDDY, H.; CAIVANO, M.; COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **The Biochemical journal**, v. 351, n. Pt 1, p. 95-105, 1 out 2000.

DEVULDER, J. The relevance of monitoring lamotrigine serum concentrations in chronic pain patients. **Acta neurologica Belgica**, v. 106, n. 1, p. 15-8, mar 2006.

DEWIRE, S. M.; AHN, S.; LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. β-Arrestins and Cell Signaling. **Annual Review of Physiology**, v. 69, n. 1, p. 483-510, mar 2007.

DIEHL, J. A.; CHENG, M.; ROUSSEL, M. F.; SHERR, C. J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. **Genes & development**, v. 12, n. 22, p. 3499-511, 15 nov 1998.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421-31, jan 1990.

DUMAN, R S; HENINGER, G. R.; NESTLER, E J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives of general psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597-606, jul 1997.

DUMAN, RONALD S; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 47-56, jan 2012.

DUNNER, D. L.; NEUMAIER, J. F. Lithium Use in Clinical Practice. **Principles of Medical Biology**, v. 14, p. 569-583, 2000.

EETHAM, S. C. C. H.; EAL, D. J. H. **Antidepressant and Anxiolytic Drugs**. [S.l: s.n.], 2000. p. 511-567

EINAT, H.; MANJI, HUSSEINI K. Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1160-71, 15 jun 2006.

EINAT, H.; YUAN, P.; GOULD, TODD D; *et al.* The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 19, p. 7311-6, 13 ago 2003.

EMAMIAN, E. S.; HALL, D.; BIRNBAUM, M. J.; KARAYIORGOU, M.; GOGOS, J. A. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. **Nature genetics**, v. 36, n. 2, p. 131-7, fev 2004.

EMBI, N.; RYLATT, D. B.; COHEN, P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 107, n. 2, p. 519-27, jun 1980.

ENGLISH, J. A.; PENNINGTON, KYLA; DUNN, MICHAEL J; COTTER, DAVID R. The neuroproteomics of schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 2, p. 163-72, 15 jan 2011.

EVASON, K.; COLLINS, J.J.; HUANG, C.; HUGHES, S.; KORNFELD, K. Valproic acid extends Caenorhabditis elegans lifespan. **Aging Cell**, v. 7, n. 3, p. 305–317, 2008.

FENG, H.-L.; LENG, Y; MA, C.-H. *et al.* Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 567-72, 26 ago 2008.

FISCHER, J. C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J. A. *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 153, n. 1, p. 23-36, 29 nov 1985.

FOUNTOULAKIS, K. N.; GONDA, X.; SIAMOULI, M.; RIHMER, Z. Psychotherapeutic intervention and suicide risk reduction in bipolar disorder: a review of the evidence. **Journal of affective disorders**, v. 113, n. 1-2, p. 21-9, fev 2009.

FOUNTOULAKIS, K. N.; VIETA, E. Treatment of bipolar disorder: a systematic review of available data and clinical perspectives. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 11, n. 7, p. 999-1029, nov 2008.

FRELAND, L.; BEAULIEU, J.-M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, n. February, p. 14, 27 jan 2012.

GAINETDINOV, R. R.; BOHN, L. M.; SOTNIKOVA, T. D. *et al.* Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. **Neuron**, v. 38, n. 2, p. 291-303, 24 abr 2003.

GEMS, D.; SUTTON, A. J.; SUNDERMEYER, M. L. *et al.* Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in Caenorhabditis elegans. **Genetics**, v. 150, n. 1, p. 129, 1998.

GERNER, R. Rational polydrug use in psychiatry. **The Western journal of medicine**, v. 155, n. 5, p. 518, nov 1991.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4-13, jul 2010.

GLICKSTEIN, S. B.; SCHMAUSS, C. Effect of methamphetamine on cognition and repetitive motor behavior of mice deficient for dopamine D2 and D3 receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1025, p. 110-8, out 2004.

GOLDSMITH, D. R.; WAGSTAFF, A. J.; IBBOTSON, T.; PERRY, C. M. Lamotrigine: a review of its use in bipolar disorder. **Drugs**, v. 63, n. 19, p. 2029-50, jan 2003.

GOMEZ, M.; CASTRO, E. DE; GUARIN, E. *et al.* Ca2+ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in C. elegans. **Neuron**, v. 30, n. 1, p. 241-8, abr 2001.

GOODWIN, G. M. Evidence-Based Guidelines for Treating Bipolar Disorder: Recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 149-173, 1 jun 2003.

GOODWIN, GUY M; MALHI, G. S. What is a mood stabilizer? **Psychological medicine**, v. 37, n. 5, p. 609-14, maio 2007.

GOULD, TODD D; CHEN, GUANG; MANJI, HUSSEINI K. Mood stabilizer psychopharmacology. **Clinical neuroscience research**, v. 2, n. 3-4, p. 193-212, dez 2002.

GOULD, TODD D; EINAT, H.; O'DONNELL, KELLEY C; *et al.* Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 10, p. 2173-83, out 2007.

GOULD, TODD D; O'DONNELL, KELLEY C; PICCHINI, A. M. *et al.* Generation and behavioral characterization of beta-catenin forebrain-specific conditional knock-out mice. **Behavioural brain research**, v. 189, n. 1, p. 117-25, 16 maio 2008.

GOULD, TODD D; QUIROZ, J A; SINGH, J; ZARATE, C A; MANJI, H K. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 8, p. 734-55, 11 ago 2004.

GRAYSON, D. R.; KUNDAKOVIC, M.; SHARMA, R. P. Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders? **Molecular pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 126-35, fev 2010.

GRIMES, C. A; JOPE, R. S. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. **Journal of neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1219-32, set 2001.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. **Journal of neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1219-32, set 2001a.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 4, p. 391-426, nov 2001b.

GROMADA, J.; BARK, CHRISTINA; SMIDT, K. *et al.* Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic beta cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase beta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 29, p. 10303-8, 19 jul 2005.

GUIMARÃES, M.; REIS, H J; GUIMARÃES, L. P. *et al.* Modulation of muscarinic signaling in PC12 cells overexpressing neuronal Ca2+ sensor-1 protein. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 55 Suppl, p. OL1138-50, jan 2009.

GURVICH, N.; BERMAN, M. G.; WITTNER, B. S. *et al.* Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition in vivo. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 9, p. 1166-8, jul 2005.

GURVICH, N.; KLEIN, PETER S. Lithium and valproic acid: parallels and contrasts in diverse signaling contexts. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 45-66, out 2002.

GÖTSCHEL, F.; KERN, C.; LANG, S. *et al.* Inhibition of GSK3 differentially modulates NF-kappaB, CREB, AP-1 and beta-catenin signaling in hepatocytes, but fails to promote TNF-alpha-induced apoptosis. **Experimental cell research**, v. 314, n. 6, p. 1351-66, 1 abr 2008.

GÖTTLICHER, M.; MINUCCI, S.; ZHU, P. *et al.* Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO journal**, v. 20, n. 24, p. 6969-78, 17 dez 2001.

HADLEY, S.; PETRY, J. J. Valerian. **American family physician**, v. 67, n. 8, p. 1755-8, 15 abr 2003.

HALL, A. C.; BRENNAN, A.; GOOLD, R. G. *et al.* Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 257-70, jun 2002.

HAO, Y.; CRESON, T.; ZHANG, L. *et al.* Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 29, p. 6590-9, 21 jul 2004.

HARRISON, P J; WEINBERGER, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 40-68; image 5, jan 2005.

HARWOOD, A. J.; AGAM, G. Search for a common mechanism of mood stabilizers. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 179-189, jul 2003.

HAYNES, L. P.; FITZGERALD, D. J.; WAREING, B. *et al.* Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin delta. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1822-32, mar 2006.

HAYNES, L. P.; THOMAS, G. M. H.; BURGOYNE, R. D. Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 7, p. 6047-54, 18 fev 2005.

HELEN, C. An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. **Epilepsy research**, 1992.

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, M FLINT. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Nature clinical practice. Neurology**, v. 4, n. 11, p. 600-9, nov 2008.

HENDRICKS, K. B.; WANG, B. Q.; SCHNIEDERS, E. A; THORNER, J. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. **Nature cell biology**, v. 1, n. 4, p. 234-41, ago 1999.

HERZOG, C. J.; MIOT, S.; MANSUY, I. M.; GIROS, B.; TZAVARA, E. T. Chronic valproate normalizes behavior in mice overexpressing calcineurin. **European journal of pharmacology**, v. 580, n. 1-2, p. 153-60, 2 fev 2008.

HILFIKER, S. Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. **Biochemical Society transactions**, v. 31, n. Pt 4, p. 828-32, ago 2003.

HIRSCHFELD, R. M. A.; KASPER, S. A review of the evidence for carbamazepine and oxcarbazepine in the treatment of bipolar disorder. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 7, n. 4, p. 507-22, dez 2004.

HOBARA, T.; UCHIDA, S.; OTSUKI, K. *et al.* Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. **Journal of psychiatric research**, v. 44, n. 5, p. 263-70, abr 2010.

HU, G.; AGARWAL, P. Human disease-drug network based on genomic expression profiles. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6536, jan 2009.

HUGHES, B. P. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 7, p. 597-603, set 1962.

HUI, K.; FEI, G.-H.; SAAB, B. J. *et al.* Neuronal calcium sensor-1 modulation of optimal calcium level for neurite outgrowth. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 24, p. 4479-89, dez 2007.

IKETANI, M.; IMAIZUMI, C.; NAKAMURA, F. *et al.* Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in nerve growth cones. **Neuroscience**, v. 161, n. 3, p. 743-52, 7 jul 2009.

ISHIZUKA, K.; KAMIYA, A.; OH, E. C. *et al.* DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 92-6, 5 maio 2011.

JACOBS, B. L.; PRAAG, H. VAN; GAGE, F. H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Molecular Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. 262-269, 28 jun 2000.

JERMAIN, D. Population pharmacokinetics of lithium. **Clinical pharmacy**, 1991.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science's STKE**, v. 298, n. 5600, p. 1911-2, 6 dez 2002.

JOHNSTON-WILSON, N. L.; SIMS, C. D.; HOFMANN, J. P. *et al.* Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. **Molecular psychiatry**, v. 5, n. 2, p. 142-9, mar 2000.

JONATHAN RYVES, W.; DALTON, E. C.; HARWOOD, A. J.; WILLIAMS, R. S. GSK-3 activity in neocortical cells is inhibited by lithium but not carbamazepine or valproic acid. **Bipolar disorders**, v. 7, n. 3, p. 260-5, jun 2005.

JOPE, R. S.; ROH, M.-S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. **Current drug targets**, v. 7, n. 11, p. 1421-34, nov 2006.

JORNADA, L. K.; VALVASSORI, S. S.; STECKERT, A. V. *et al.* Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. **Journal of psychiatric research**, v. 45, n. 2, p. 162-8, fev 2011.

JUNG, G.-A.; YOON, J.-Y.; MOON, B.-S. *et al.* Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway. **BMC cell biology**, v. 9, p. 66, jan 2008.

KABBANI, N.; NEGYESSY, L.; LIN, R.; GOLDMAN-RAKIC, P.; LEVENSON, R. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8476-86, 1 out 2002.

KAERN, M.; ELSTON, T. C.; BLAKE, W. J.; COLLINS, JAMES J. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 6, p. 451-64, jun 2005.

KAPP-BARNEA, Y.; NINIO-MANY, L.; HIRSCHBERG, K. *et al.* Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulate extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling by accelerating recycling through the endocytic recycling compartment. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 9, p. 4130-41, set 2006.

KAWA, I.; CARTER, J. D.; JOYCE, P. R. *et al.* Gender differences in bipolar disorder: age of onset, course, comorbidity, and symptom presentation. **Bipolar disorders**, v. 7, n. 2, p. 119-25, abr 2005.

KAYTOR, M. The GSK3β signaling cascade and neurodegenerative disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 3, p. 275-278, 1 jun 2002.

KETTER, T. A.; CALABRESE, J. R. Stabilization of mood from below versus above baseline in bipolar disorder: a new nomenclature. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 63, n. 2, p. 146-51, fev 2002.

KETTER, T. A.; MANJI, HUSSEINI K; POST, ROBERT M. Potential mechanisms of action of lamotrigine in the treatment of bipolar disorders. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 484-95, out 2003.

KIM, A. J.; SHI, Y.; AUSTIN, R. C.; WERSTUCK, G. H. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 1, p. 89-99, 1 jan 2005a.

KIM, A. J.; SHI, Y.; AUSTIN, R. C.; WERSTUCK, G. H. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 1, p. 89-99, 1 jan 2005b.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis …**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, abr 2010.

KIM, S.; CHO, H.; LEE, D.; WEBSTER, M. J. Association between SNPs and gene expression in multiple regions of the human brain. **Translational psychiatry**, v. 2, p. e113, 21 fev 2012.

KIM, S. D.; YANG, S.-I.; KIM, H.-C.; SHIN, C. Y.; KO, K. H. Inhibition of GSK-3beta mediates expression of MMP-9 through ERK1/2 activation and translocation of NF-kappaB in rat primary astrocyte. **Brain research**, v. 1186, p. 12-20, dez 2007.

KLEIN, P S; MELTON, D. A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 16, p. 8455-9, 6 ago 1996.

KLESSE, L.; MEYERS, K.; MARSHALL, C.; PARADA, L. Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. **Oncogene**, v. 18, n. 12, p. 2055-2068, 1999.

KOH, P. O.; UNDIE, A. S.; KABBANI, N. *et al.* Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 313-7, 7 jan 2003.

KOPNISKY, K. L.; CHALECKA-FRANASZEK, E.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; CHUANG, D-M. Chronic lithium treatment antagonizes glutamate-induced decrease of phosphorylated CREB in neurons via reducing protein phosphatase 1 and increasing MEK activities. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 425-35, jan 2003.

KOSTROUCHOVÁ, M.; KOSTROUCH, Z. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. **Folia biologica**, v. 53, n. 2, p. 37-49, jan 2007.

KOZLOVSKY, N.; AMAR, S.; BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Psychotropic drugs affect Ser9-phosphorylated GSK-3 beta protein levels in rodent frontal cortex. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 9, n. 3, p. 337-42, jun 2006.

KRAEMER, H. C.; SCHULTZ, S. K.; ARNDT, S. Biomarkers in psychiatry: methodological issues. **The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry**, v. 10, n. 6, p. 653-9, 2002.

KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. Caenorhabditis elegans: an emerging genetic model for the study of innate immunity. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 5, p. 380-90, maio 2003.

KYOSSEVA, S. V. Mitogen-activated protein kinase signaling. **International review of neurobiology**, v. 59, p. 201-20, jan 2004.

KYOSSEVA, S. V.; ELBEIN, A. D.; GRIFFIN, W. S. *et al.* Mitogen-activated protein kinases in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 5, p. 689-96, 1 set 1999.

LAMBERT, P. A.; CARRAZ, G.; BORSELLI, S.; CARBEL, S. Action neuropsychotrope d'un nouvel anti-epileplique: Le Depamide. **Ann. Med. Psychol.**, v. 1, p. 707–710, 1966.

LAMMER, E. J.; SEVER, L. E.; OAKLEY, G. P. Teratogen update: valproic acid. **Teratology**, v. 35, n. 3, p. 465-73, jun 1987.

LAMPEN, A.; SIEHLER, S.; ELLERBECK, U.; GÖTTLICHER, M.; NAU, H. New molecular bioassays for the estimation of the teratogenic potency of valproic acid derivatives in vitro: activation of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPARdelta). **Toxicology and applied pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 238-49, 1 nov 1999.

LATAPY, C.; RIOUX, V.; GUITTON, M. J.; BEAULIEU, J.-M. Selective deletion of forebrain glycogen synthase kinase 3β reveals a central role in serotonin-sensitive anxiety and social behaviour. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2460-74, 5 set 2012.

LEIN, E. S.; HAWRYLYCZ, M. J.; AO, N. *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. **Nature**, v. 445, n. 7124, p. 168-76, 11 jan 2007.

LENG, YAN; LIANG, M.-H.; REN, MING; *et al.* Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2576-88, 5 mar 2008.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 346-57, jan 1994.

LI, N.; HE, X.; QI, X.; ZHANG, YU; HE, S. The mood stabilizer lamotrigine produces antidepressant behavioral effects in rats: role of brain-derived neurotrophic factor. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 24, n. 12, p. 1772-8, dez 2010.

LI, XIAOHUA; JOPE, R. S. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 11, p. 2143-54, out 2010a.

LI, XIAOHUA; JOPE, R. S. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 11, p. 2143-54, out 2010b.

LI, XIAOHUA; ROSBOROUGH, K. M.; FRIEDMAN, A. B.; ZHU, W.; ROTH, K. A. Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 10, n. 1, p. 7-19, fev 2007.

LI, XIAOHUA; ZHU, W.; ROH, M.-S. *et al.* In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1426-31, ago 2004.

LIN, H.; GENG, X.; DANG, W. *et al.* Molecular mechanisms associated with the antidepressant effects of the class I histone deacetylase inhibitor MS-275 in the rat ventrolateral orbital cortex. **Brain research**, v. 1447, p. 119-25, 4 abr 2012.

LINGAM, R.; SCOTT, J. Treatment non-adherence in affective disorders. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 105, n. 3, p. 164-72, mar 2002.

LINT, C. VAN; EMILIANI, S.; VERDIN, E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. **Gene expression**, v. 5, n. 4-5, p. 245-53, jan 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-8, dez 2001.

LOBO, M. K.; COVINGTON, H. E.; CHAUDHURY, D. *et al.* Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6002, p. 385-90, 15 out 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, nov 1951.

LU, Q.; HUTCHINS, A. E.; DOYLE, C. M.; LUNDBLAD, J. R.; KWOK, R. P. S. Acetylation of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) by CREB-binding protein enhances CREB-dependent transcription. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15727-34, 2 maio 2003.

LÖSCHER, W.; NAU, H. Pharmacological evaluation of various metabolites and analogues of valproic acid. Anticonvulsant and toxic potencies in mice. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 5, p. 427-35, maio 1985.

MACHADO-VIEIRA, R.; IBRAHIM, L.; ZARATE, CARLOS A. Histone deacetylases and mood disorders: epigenetic programming in gene-environment interactions. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 699-704, dez 2011.

MACHADO-VIEIRA, R.; MANJI, HUSSEINI K; ZARATE, CARLOS A. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. **Bipolar disorders**, v. 11 Suppl 2, p. 92-109, jun 2009.

MAI, L.; JOPE, R. S.; LI, XIAOHUA. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. **Journal of neurochemistry**, v. 82, n. 1, p. 75-83, jul 2002.

MALBERG, J. E.; EISCH, A. J.; NESTLER, ERIC J.; DUMAN, RONALD S. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 24, p. 9104-9110, 15 dez 2000.

MALHI, G. S. The impact of lithium on bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 11 Suppl 2, n. 2, p. 1-3, jun 2009.

MALHI, G. S.; ADAMS, D.; BERK, M. Medicating mood with maintenance in mind: bipolar depression pharmacotherapy. **Bipolar disorders**, v. 11 Suppl 2, p. 55-76, jun 2009.

MALHI, G. S.; ADAMS, D.; CAHILL, C. M.; DODD, S.; BERK, M. The management of individuals with bipolar disorder: a review of the evidence and its integration into clinical practice. **Drugs**, v. 69, n. 15, p. 2063-101, 22 out 2009.

MANJI, HUSSEINI K; GOTTESMAN, I. I.; GOULD, TODD D. Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2003, n. 207, p. pe49, 4 nov 2003.

MANJI, HUSSEINI K; QUIROZ, JORGE A; PAYNE, J. L. *et al.* The underlying neurobiology of bipolar disorder. **World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 2, n. 3, p. 136-46, out 2003.

MAO, Y.; GE, X.; FRANK, C. L. *et al.* Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 1017-31, 20 mar 2009.

MARCUS, S. C.; OLFSON, M.; PINCUS, H. A.; ZARIN, D. A.; KUPFER, D. J. Therapeutic drug monitoring of mood stabilizers in Medicaid patients with bipolar disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 156, n. 7, p. 1014-8, jul 1999.

MARKS, P. A; DOKMANOVIC, M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 14, n. 12, p. 1497-511, dez 2005.

MARMOL, F. Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 32, n. 8, p. 1761-71, 12 dez 2008.

MARTINEZ, A.; ALONSO, M.; CASTRO, ANA. First Non-ATP Competitive Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors : Thiadiazolidinones (TDZD) as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer ' s Disease. **Chart**, v. 3, p. 1292-1299, 2002.

MCCORMACK, A. L.; ATIENZA, J. G.; JOHNSTON, L. C. *et al.* Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 4, p. 1030-7, maio 2005.

MCFERRAN, B. W.; GRAHAM, M. E.; BURGOYNE, R. D. Neuronal Ca2+ sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22768-72, 28 ago 1998.

MCGOWAN, P. O.; SASAKI, A.; D'ALESSIO, A. C. *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342-8, mar 2009.

MEHLER, M. F. Epigenetics and the nervous system. **Annals of neurology**, v. 64, n. 6, p. 602-17, dez 2008.

MENKE, A.; KLENGEL, T.; BINDER, E. B. Epigenetics, depression and antidepressant treatment. **Current pharmaceutical design**, 6 jun 2012.

MEUNIER, H.; CARRAZ, G.; NEUNIER, Y.; EYMARD, P.; AIMARD, M. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. **Thérapie**, v. 18, p. 435-8, 1963.

MIDDLETON, F. A.; MIRNICS, KAROLY; PIERRI, J. N.; LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 2718-29, 1 abr 2002.

MIRNICS, KÁROLY; MIDDLETON, F. A.; MARQUEZ, A.; LEWIS, D. A.; LEVITT, P. Molecular Characterization of Schizophrenia Viewed by Microarray Analysis of Gene Expression in Prefrontal Cortex. **Neuron**, v. 28, n. 1, p. 53-67, out 2000.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 25 maio 1972.

MOR, A.; PHILIPS, M. R. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. **Annual review of immunology**, v. 24, p. 771-800, jan 2006.

MOTA JÚNIOR, A. O.; MALAVAZI, I.; SORIANI, F. M. *et al.* Molecular characterization of the Aspergillus fumigatus NCS-1 homologue, NcsA. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 280, n. 6, p. 483-95, dez 2008.

MULLENBROCK, S.; SHAH, J.; COOPER, G. M. Global expression analysis identified a preferentially nerve growth factor-induced transcriptional program regulated by sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AP-1 protein activation during PC12 cell dif. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 52, p. 45131-45, 30 dez 2011.

MUNOZ, M. J. Longevity and heat stress regulation in Caenorhabditis elegans. **Mechanisms of ageing and development**, v. 124, n. 1, p. 43–48, 2003.

MUÑOZ-MONTAÑO, J. R.; MORENO, F. J.; AVILA, J.; DIAZ-NIDO, J. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. **FEBS letters**, v. 411, n. 2-3, p. 183-8, 14 jul 1997.

MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B.; LEWITZKA, U. Lithium reduces pathological aggression and suicidality: a mini-review. **Neuropsychobiology**, v. 62, n. 1, p. 43-9, jan 2010.

NAKAGAWA, A.; GRUNEBAUM, M. F.; SULLIVAN, G. M. *et al.* Comorbid anxiety in bipolar disorder: does it have an independent effect on suicidality? **Bipolar disorders**, v. 10, n. 4, p. 530-8, jun 2008.

NAKAMURA, T Y; POUNTNEY, D. J.; OZAITA, A. *et al.* A role for frequenin, a Ca2+-binding protein, as a regulator of Kv4 K+-currents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12808-13, 23 out 2001.

NAKAMURA, TOMOE Y; JEROMIN, ANDREAS; MIKOSHIBA, KATSUHIKO; WAKABAYASHI, S. Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca2+ signals. **Circulation research**, v. 109, n. 5, p. 512-23, 19 ago 2011.

NAKAMURA, TOMOE Y; JEROMIN, ANDREAS; SMITH, G. *et al.* Novel role of neuronal Ca2+ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. **The Journal of cell biology**, v. 172, n. 7, p. 1081-91, 27 mar 2006.

NAU, H.; HAUCK, R. S.; EHLERS, K. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. **Pharmacology & toxicology**, v. 69, n. 5, p. 310-21, nov 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th. ed. [S.l.]: W.H. Freeman and Company, 2008. p. 1100

NIKOULINA, S. E.; CIARALDI, T. P.; MUDALIAR, S. *et al.* Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 49, n. 2, p. 263-71, fev 2000.

NOVAK, A.; DEDHAR, S. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 56, n. 5-6, p. 523-37, 30 out 1999.

NUMAKAWA, T.; SUZUKI, S.; KUMAMARU, E. *et al.* BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histology and histopathology**, v. 25, n. 2, p. 237-58, fev 2010.

OAKLEY, P. W.; WHYTE, I. M.; CARTER, G. L. Lithium toxicity: an iatrogenic problem in susceptible individuals. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 833-840, jan 2001.

OKUMA, T.; KISHIMOTO, A.; INOUE, K.; MATSUMOTO, H.; OGURA, A. Anti-manic and prophylactic effects of carbamazepine (Tegretol) on manic depressive psychosis. A preliminary report. **Folia psychiatrica et neurologica japonica**, v. 27, n. 4, p. 283-97, jan 1973.

OLAFSSON, P.; WANG, T.; LU, B. Molecular cloning and functional characterization of the Xenopus Ca(2+)-binding protein frequenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 8001-5, 15 ago 1995.

OWEN, M. J.; O'DONOVAN, M. C.; HARRISON, PAUL J. Schizophrenia: a genetic disorder of the synapse? **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 330, n. 7484, p. 158-9, 22 jan 2005.

O'BRIEN, W. T.; HARPER, A. D.; JOVÉ, F. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 30, p. 6791-8, 28 jul 2004.

O'CALLAGHAN, D. W.; HASDEMIR, B.; LEIGHTON, M.; BURGOYNE, R. D. Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca2+ sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K+ channels. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 23, p. 4833-45, 1 dez 2003.

PANDYA, S. Mood stabilizers: use, actions and prescribing rationale. **Nurse Prescribing**, v. 8, n. 10, p. 492-496, 2010.

PARDO, R.; ANDREOLOTTI, A. G.; RAMOS, B.; PICATOSTE, F.; CLARO, E. Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. **Journal of neurochemistry**, v. 87, n. 2, p. 417-26, out 2003.

PEDROSA, E.; SHAH, A.; TENORE, C. *et al.* β-catenin promoter ChIP-chip reveals potential schizophrenia and bipolar disorder gene network. **Journal of neurogenetics**, v. 24, n. 4, p. 182-93, dez 2010.

PEEDICAYIL, J. Epigenetic management of major psychosis. **Clinical epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 249-56, ago 2011.

PENNINGTON, K; BEASLEY, C. L.; DICKER, P. *et al.* Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. **Molecular psychiatry**, v. 13, n. 12, p. 1102-17, dez 2008.

PETRI, S.; KIAEI, M.; KIPIANI, K. *et al.* Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiology of disease**, v. 22, n. 1, p. 40-9, abr 2006.

PHIEL, C. J.; ZHANG, F.; HUANG, E. Y. *et al.* Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36734-41, 28 set 2001.

PLANT, K. E.; ANDERSON, E.; SIMECEK, N. *et al.* The neuroprotective action of the mood stabilizing drugs lithium chloride and sodium valproate is mediated through the up-regulation of the homeodomain protein Six1. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 235, n. 1, p. 124-34, 15 fev 2009.

PLENGE, P.; STENSGAARD, A.; JENSEN, H. 24-hour lithium concentration in human brain studied by Li-7 magnetic resonance spectroscopy. **Biological …**, 1994.

POMPILI, M.; INNAMORATI, M.; RAJA, M. *et al.* Suicide risk in depression and bipolar disorder: Do impulsiveness-aggressiveness and pharmacotherapy predict suicidal intent? **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 4, n. 1, p. 247-55, fev 2008.

PONGS, O.; LINDEMEIER, J.; ZHU, X. R. *et al.* Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the Drosophila nervous system. **Neuron**, v. 11, n. 1, p. 15-28, jul 1993.

PRABAKARAN, S.; SWATTON, J. E.; RYAN, M. M. *et al.* Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 7, p. 684-97, 643, jul 2004.

PRICKAERTS, J.; MOECHARS, D.; CRYNS, K. *et al.* Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 35, p. 9022-9, 30 ago 2006.

QING, H.; HE, G.; LY, P. T. T. *et al.* Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 12, p. 2781-9, 24 nov 2008.

RADATZ, M.; EHLERS, K.; YAGEN, B.; BIALER, M.; NAU, H. Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid. **Epilepsy research**, v. 30, n. 1, p. 41-8, mar 1998.

RALPH-WILLIAMS, R. J.; PAULUS, M. P.; ZHUANG, X.; HEN, R.; GEYER, M. A. Valproate attenuates hyperactive and perseverative behaviors in mutant mice with a dysregulated dopamine system. **Biological Psychiatry**, v. 53, n. 4, p. 352-359, fev 2003.

RAPOPORT, S. I.; BASSELIN, M.; KIM, H.-W.; RAO, J. S. Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers. **Brain research reviews**, v. 61, n. 2, p. 185-209, out 2009.

REYNOLDS, E. H.; CHANARIN, I.; MILNER, G.; MATTHEWS, D. M. Anticonvulsant therapy, folic acid and vitamin B12 metabolism and mental symptoms. **Epilepsia**, v. 7, n. 4, p. 261-70, dez 1966.

RICCIO, A. Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1330-7, nov 2010.

ROICK, C.; AHRENS, B.; BECKER, T. [Prophylactic long-term therapy of affective disorders with lithium, valproic acid and carbamazepine--effectiveness and cost-effectiveness]. **Psychiatrische Praxis**, v. 28 Suppl 1, p. S32-40, jul 2001.

ROSA, D. V. F.; SOUZA, R. P.; SOUZA, BRUNO R; *et al.* NCS-1 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. **Neurochemical research**, v. 32, n. 1, p. 81-5, jan 2007.

ROSENBERG, G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 64, n. 16, p. 2090-103, ago 2007.

RUBINFELD, B.; ALBERT, I.; PORFIRI, E. *et al.* Binding of GSK3beta to the APC-beta - Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. **Science**, v. 272, n. 5264, p. 1023-1026, 17 maio 1996.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T. *et al.* Assessment of the mitochondrial respiratory chain. **Lancet**, v. 338, n. 8758, p. 60, 6 jul 1991.

RYVES, W. J.; HARWOOD, A J. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 3, p. 720-5, 26 jan 2001.

SAAB, B. J.; GEORGIOU, J.; NATH, A. *et al.* NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. **Neuron**, v. 63, n. 5, p. 643-56, 10 set 2009.

SARNO, P. DE; LI, XIAOHUA; JOPE, R. S. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3β phosphorylation by sodium valproate and lithium. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1158-1164, dez 2002.

SCHLOESSER, R. J.; MARTINOWICH, K.; MANJI, HUSSEINI K. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 36-46, jan 2012.

SCHMIDT, D.; ELGER, C. E. What is the evidence that oxcarbazepine and carbamazepine are distinctly different antiepileptic drugs? **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 5, n. 5, p. 627-35, out 2004.

SCHROEDER, M.; HILLEMACHER, T.; BLEICH, S.; FRIELING, H. The epigenetic code in depression: implications for treatment. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 91, n. 2, p. 310-4, fev 2012.

SEONG, E.; SEASHOLTZ, A. F.; BURMEISTER, M. Mouse models for psychiatric disorders. **Trends in genetics : TIG**, v. 18, n. 12, p. 643-50, dez 2002.

SEVERUS, E.; SCHAAFF, N.; MÖLLER, H.-J. State of the art: treatment of bipolar disorders. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 3, p. 214-8, mar 2012.

SHORTER, E. The history of lithium therapy. **Bipolar disorders**, v. 11 Suppl 2, p. 4-9, jun 2009.

SIM, S. C.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenomic biomarkers: new tools in current and future drug therapy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 2, p. 72-81, fev 2011.

SIMONINI, M. V.; CAMARGO, L. M.; DONG, E. *et al.* The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1587-92, 31 jan 2006.

SINGH, I.; ROSE, N. Biomarkers in psychiatry. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 202-7, 9 jul 2009.

SIPPY, T.; CRUZ-MARTÍN, A.; JEROMIN, ANDREAS; SCHWEIZER, F. E. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 1031-8, out 2003.

SMITH, D.; BAKER, G.; DAVIES, G.; DEWEY, M.; CHADWICK, D. W. Outcomes of add-on treatment with lamotrigine in partial epilepsy. **Epilepsia**, v. 34, n. 2, p. 312-22, 1993.

SOUZA, BRUNO R; MOTTA, B. S.; ROSA, D. V. F. *et al.* DARPP-32 and NCS-1 expression is not altered in brains of rats treated with typical or atypical antipsychotics. **Neurochemical research**, v. 33, n. 3, p. 533-8, mar 2008.

SOUZA, BRUNO R; TORRES, KAREN C L; MIRANDA, DÉBORA M; *et al.* Lack of effects of typical and atypical antipsychotics in DARPP-32 and NCS-1 levels in PC12 cells overexpressing NCS-1. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 9, p. 4, jan 2010.

SOUZA, BRUNO R; TORRES, KAREN C L; MIRANDA, DÉBORA M; *et al.* Downregulation of the cAMP/PKA pathway in PC12 cells overexpressing NCS-1. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 31, n. 1, p. 135-43, jan 2011.

SOUZA, R. P.; SOARES, E. C.; ROSA, D. V. F. *et al.* Methylphenidate alters NCS-1 expression in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 53, n. 1-2, p. 12-6, jul 2008.

SPILLER, H. A.; KRENZELOK, E. P.; KLEIN-SCHWARTZ, W. *et al.* Multicenter case series of valproic acid ingestion: serum concentrations and toxicity. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 38, n. 7, p. 755-60, jan 2000.

STAMBOLIC, V.; RUEL, L.; WOODGETT, J R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. **Current biology : CB**, v. 6, n. 12, p. 1664-8, 1 dez 1996.

STOLL, A. L.; SEVERUS, W. E. Mood stabilizers: shared mechanisms of action at postsynaptic signal-transduction and kindling processes. **Harvard review of psychiatry**, v. 4, n. 2, p. 77-89, 1996.

SU, B.; KARIN, M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. **Current opinion in immunology**, v. 8, n. 3, p. 402-11, jun 1996.

SØRENSEN, K. V. Valproate: a new drug in migraine prophylaxis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 78, n. 4, p. 346-348, out 1988.

SÜDHOF, T. C.; RIZO, J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. **Neuron**, v. 17, n. 3, p. 379-88, set 1996.

TAKAO, K.; YAMASAKI, N.; MIYAKAWA, T. Impact of brain-behavior phenotypying of genetically-engineered mice on research of neuropsychiatric disorders. **Neuroscience research**, v. 58, n. 2, p. 124-32, jun 2007.

TAKEZAKI, H.; HANAOKA, M. The use of carbamazepine (Tegretol) in the control of manic-depressive psychosis and other manic depressive states. **Clinical Psychiatry**, v. 13, p. 173–183, 1971.

TAMMINGA, C. A; NEMEROFF, C. B.; BLAKELY, R. D. *et al.* Developing novel treatments for mood disorders: accelerating discovery. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 589-609, 15 set 2002.

TATEBAYASHI, Y.; HAQUE, N.; TUNG, Y.-C.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 9, p. 1653-63, 1 abr 2004.

TAYLOR, D.; PATON, C.; KAPUR, S. **Maudsley Prescribing Guidelines**. 10th. ed. London: Informa Healthcare, 2009. p. 523

TENNISON, M. B.; MILES, M. V.; POLLACK, G. M.; THORN, M. D.; DUPUIS, R. E. Valproate Metabolites and Hepatotoxicity in an Epileptic Population. **Epilepsia**, v. 29, n. 5, p. 543-547, out 1988.

TORRES, K C L; SOUZA, B R; MIRANDA, D M; *et al.* Expression of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) is decreased in leukocytes of schizophrenia and bipolar disorder patients.

Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, v. 33, n. 2, p. 229-34, 17 mar 2009.

TOWNSEND, J. D.; TORRISI, S. J.; LIEBERMAN, M. D. *et al.* Frontal-Amygdala Connectivity Alterations During Emotion Downregulation in Bipolar I Disorder. **Biological psychiatry**, 31 jul 2012.

TRINKLEIN, N. D.; ALDRED, S. J. F.; SALDANHA, A. J.; MYERS, R. M. Identification and functional analysis of human transcriptional promoters. **Genome research**, v. 13, n. 2, p. 308-12, fev 2003.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, ERIC J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355-67, maio 2007.

TSUJIMOTO, T.; JEROMIN, ANDREAS; SAITOH, N.; RODER, J. C.; TAKAHASHI, T. Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5563, p. 2276-9, 22 mar 2002.

URANOVA, N. A.; VOSTRIKOV, V. M.; ORLOVSKAYA, D. D.; RACHMANOVA, V. I. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. **Schizophrenia research**, v. 67, n. 2-3, p. 269-75, 1 abr 2004.

VASUDEV, K.; GOSWAMI, U.; KOHLI, K. Carbamazepine and valproate monotherapy: feasibility, relative safety and efficacy, and therapeutic drug monitoring in manic disorder. **Psychopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 15-23, 24 maio 2000.

VOINEAGU, I.; WANG, X.; JOHNSTON, P. *et al.* Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 380-4, 16 jun 2011.

VOLFSON, D.; MARCINIAK, J.; BLAKE, W. J. *et al.* Origins of extrinsic variability in eukaryotic gene expression. **Nature**, v. 439, n. 7078, p. 861-4, 16 fev 2006.

VUCIĆEVIĆ, K.; MILJKOVIĆ, B.; VELICKOVIĆ, R. *et al.* Population pharmacokinetic model of carbamazepine derived from routine therapeutic drug monitoring data. **Therapeutic drug monitoring**, v. 29, n. 6, p. 781-8, dez 2007.

WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2838-49, 12 abr 2004.

WEAVER, I. C. G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A. *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847-54, ago 2004.

WEEKS, M. Discovery of the Elements. In: WHITEFISH, M. (Ed.). United States: Kessinger Publishing, 2003. p. 124.

WEISLER, R. H.; CALABRESE, J. R.; BOWDEN, C. L. *et al.* Discovery and development of lamotrigine for bipolar disorder: a story of serendipity, clinical observations, risk taking, and persistence. **Journal of affective disorders**, v. 108, n. 1-2, p. 1-9, maio 2008.

WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 74, n. 10, p. 589-607, out 1996.

WILKINSON, G. R. Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. **Metabolism Clinical And Experimental**, p. 2211-2221, 2005.

WILLIAMS, R. S. B.; CHENG, L.; MUDGE, A. W.; HARWOOD, A. J. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. **Nature**, v. 417, n. 6886, p. 292-5, 16 maio 2002.

XIMENES, J. C. M. Valproic Acid, a Drug with Multiple Molecular Targets Related to Its Potential Neuroprotective Action. **Neuroscience & Medicine**, v. 03, n. 01, p. 107-123, 2012.

XU, C.; LI, P. P.; KENNEDY, J. L. *et al.* Further support for association of the mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 with bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 10, n. 1, p. 105-10, fev 2008.

YASUDA, S.; SUGIURA, H.; TANAKA, H.; TAKIGAMI, S.; YAMAGATA, K. p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, v. 11, n. 1, p. 45-59, 1 mar 2011.

YU, Z.; ONO, C.; KIM, H. B. *et al.* Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. **Bipolar disorders**, v. 13, n. 5-6, p. 486-99, ago 2011.

YUAN, P.; ZHOU, R.; WANG, Y. *et al.* Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia. **Journal of affective disorders**, v. 124, n. 1-2, p. 164-9, jul 2010.

ZANDI, P. P.; BELMONTE, P. L.; WILLOUR, V. L. *et al.* Association study of Wnt signaling pathway genes in bipolar disorder. **Archives of general psychiatry**, v. 65, n. 7, p. 785-93, jul 2008.

ZHANG, ZHENZHEN; QIN, X.; ZHAO, XINFENG; *et al.* Valproic acid regulates antioxidant enzymes and prevents ischemia/reperfusion injury in the rat retina. **Current eye research**, v. 37, n. 5, p. 429-37, maio 2012.

ZHAO, X; VÁRNAI, P.; TUYMETOVA, G. *et al.* Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 43, p. 40183-9, 26 out 2001.

ZHENG, Q.; BOBICH, J. A; VIDUGIRIENE, J. *et al.* Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. **Journal of neurochemistry**, v. 92, n. 3, p. 442-51, fev 2005.

ZHOU, K. I.; PINCUS, Z.; SLACK, F. J. Longevity and stress in Caenorhabditis elegans. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 8, p. 733, 2011.

ZHOU, Q.; DALGARD, C. L.; WYNDER, C.; DOUGHTY, M. L. Valproic acid inhibits neurosphere formation by adult subventricular cells by a lithium-sensitive mechanism. **Neuroscience letters**, v. 500, n. 3, p. 202-6, 18 ago 2011.