

Bruno Rezende de Souza

**A MODULAÇÃO DA VIA cAMP / PKA PELO
SENSOR NEURONAL DE CÁLCIO - 1 INDEPENDENTE
DE RECEPTORES DE DOPAMINA**

Belo Horizonte

2007

Bruno Rezende de Souza

**A MODULAÇÃO DA VIA cAMP / PKA PELO
SENSOR NEURONAL DE CÁLCIO - 1 INDEPENDENTE
DE RECEPTORES DE DOPAMINA**

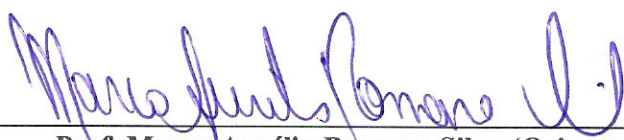
Tese de doutorado submetida ao curso de pós-graduação do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau doutor em Biologia: .Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientação: Marco Aurélio Romano-Silva

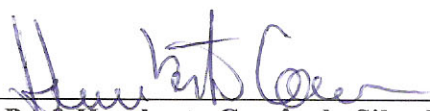
Belo Horizonte

2007

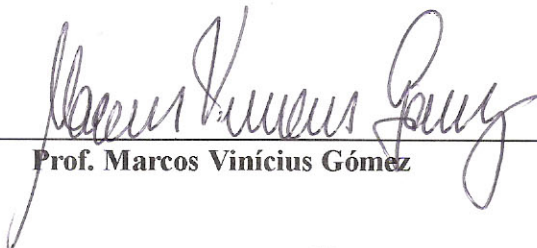
Tese defendida e aprovada, em 10 de setembro de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Marco Aurélio Romano Silva (Orientador)



Prof. Humberto Corrêa da Silva Filho



Prof. Marcos Vinícius Gómez



Prof. Rogério Arena Panizzutti



Prof. Emílio Luiz Streck

Dedico esse trabalho aos meus pais, meu irmão

e a Mone

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Marquinho, por realmente ensinar-me a fazer pesquisa. Seus conselhos, apoio e principalmente confiança foram essenciais no meu sucesso. Plagiando-o, és meu “pai científico”. Espero suprir as expectativas e ter a competência necessária para ser seu futuro colaborador

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

Aos amigos e colegas. Vossas presenças me ajudaram muito nessa jornada, tanto aumentando quanto aliviando as dificuldades diárias de uma jornada profissional. De qualquer forma, em sua própria natureza, foram estímulos para a conclusão de uma etapa.

Agradeço às amigas especiais, Anete e Karen. Admiração profissional é minimalista pra explicar meu sentimento por vocês.

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

Ao meu irmão, grande amigo e conselheiro, mesmo sendo caçula. Se irmão a gente pudesse escolher, seria o escolhido. Mantenha seu brilho.

Ao papai e à mamãe. Meu sucesso é de vocês. O apoio, educação, incentivo, carinho e atenção são incomparáveis e lhes devo muito. São meus eternos exemplos.

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

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

À vida.

"Uma vida sem questionamentos não vale a pena ser vivida"

(Sócrates)

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

(Charles Darwin)

"A maior inimiga da verdade não é a mentira, mas a convicção"

(Friedrich Nietzsche)

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

(Albert Einstein)

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

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

RESUMO

A proteína sensora neuronal de cálcio-1 (NCS-1) é a proteína evolutivamente mais antiga da superfamília das *EF-hands*, um grupo de proteínas que pode ser ligar ao cálcio. Uma de suas características é a presença da cauda miristoil N-terminal que pode se inserir em membranas lipídicas. NCS-1 apresenta diversas funções, como inibir a dessensibilização do receptor dopaminérgico D₂ e ativar PI4K. A fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc-32kDa (DARPP-32) tem um papel importante na modulação da transdução da sinalização dopaminérgica. Quando fosforilada na Treonina 34, DARPP-32 inibe a proteína fosfatase-1 (PP-1) e consequentemente modula a integração das sinalizações. Recentemente foi demonstrado que no córtex pré-frontal (CPF) de indivíduos com esquizofrenia ocorre um aumento da expressão de NCS-1 e uma redução da expressão de DARPP-32. Nesse trabalho, investigamos o papel de NCS-1 na modulação da sinalização intracelular da via AMPc/PKA. Também investigamos, em modelo *in vitro* e *in vivo*, se tratamento crônico com antipsicóticos típicos e atípicos modulam a expressão de NCS-1 e DARPP-32. Utilizamos células PC12 selvagem e superexpressando NCS-1, sendo que estas últimas apresentaram redução dos níveis de expressão de DARPP-32 e nos níveis de AMPc, pDARPP-32(Thr34) e pCREB(Ser133). Porém, as mesmas não apresentaram alteração nos níveis de expressão do receptor de dopamina D₂, Calcyon, pDARPP-32(Thr75), Akt e pAkt(Ser473). Observamos que a alteração dos níveis de pDARPP-32(Thr34) são independentes da sinalização dopaminérgica através de diversos tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos. Demonstramos que, tanto células PC12 como diferentes regiões cerebrais de ratos, tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, não apresentaram alterações nos níveis de NCS-1 e DARPP-32. Portanto, observamos que NCS-1 modula expressão de DARPP-32 e altera a sinalização da via AMPc/PKA independentemente da dopamina.

ABSTRACT

Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) is the most ancient protein of EF-hands super family which is a group of proteins that binds calcium. It was shown that NCS-1 has many functions such as its capacity of inhibiting dopamine receptor D₂ desensitization and its capacity to activate phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K). The dopamine and cAMP regulated phosphoprotein-32kDa (DARPP-32) has a central role in modulation of transduction of dopaminergic signaling. When phosphorylated at Threonine 34, DARPP-32 turns into a potent inhibitor of protein phosphatase-1 (PP-1) and consequently modulates the signaling integration. Recently it was demonstrated upregulation of NCS-1 and DARPP-32 downregulation in prefrontal (PFC) cortex of schizophrenic patients. In our study we have investigated the role of NCS-1 on cAMP/PKA intracellular signaling pathway modulation. We also investigated if chronic treatment with typical and atypical antipsychotics modulates NCS-1 and DARPP-32 expression, both *in vitro* and *in vivo* (in rat model). We used pheochromocytome PC12 wild-type cells (WT) and overexpressing NCS-1 (Clone). Our results showed that Clone PC12 cells have reduction in DARPP-32 expression, cAMP levels, pDARPP-32(Thr34) and pCREB(Ser133). However, there was no alteration in D₂, Calcyon, pDARPP-32(Thr75), Akt and pAkt(Ser473) in these same cells. WT and Clone PC12 cells were treated with specific dopaminergic agonists and antagonists and we show that alteration in pDARPP-32(Thr34) levels in Clone PC12 cells is independent of dopaminergic signaling. Also, we demonstrated that both PC12 cells and different brain regions of rats treated chronically with typical and atypical antipsychotics did not present alteration in NCS-1 and DARPP-32 expression. Therefore, we observed that NCS-1 modulates DARPP-32 expression and cAMP/PKA signaling pathway independently of dopamine.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1.1 A dopamina e sistema dopaminérgico	11
1.1.1 Síntese e liberação de dopamina	13
1.1.2 Receptores dopaminérgicos e sinalização de segundo mensageiro	15
1.1.3 Modulação de receptor	20
1.2 DARPP-32 na sinalização dopaminérgica	22
1.3 NCS-1 na modulação do receptor dopaminérgico D ₂	27
1.4 Esquizofrenia e alterações na sinalização dopaminérgica	32
OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Experimentos <i>in vitro</i>	44
3.1.1 Cultura celular	44
3.1.2 Drogas e reagentes	44
3.1.3 Procedimentos farmacológicos	45
3.2 Experimentos <i>in vivo</i>	46
3.2.1 Animais experimentais	46
3.2.2 Drogas e reagentes	46
3.2.3 Procedimentos farmacológicos	47
3.3 Dosagem de proteína	47
3.4 ELISA	47
3.5 Imunofluorescência	48

3.6	Microscopia confocal	49
3.7	Marcação de proteínas intracelulares para citometria de fluxo	49
3.8	Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo	50
3.9	Imunoblot	51
3.10	Análise dos imunoblots	52
3.11	Análise estatística	53
RESULTADOS		54
4.1	Expressão de NCS-1 em células PC12 NCS-1	55
4.2	Expressão e exposição do receptor dopaminérgico D ₂ em células PC12 superexpressando NCS-1	58
4.3	Níveis de AMPc em células PC12 superexpressando NCS-1	60
4.4	Alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 em células PC12 superexpressando NCS-1	62
4.5	Alteração nos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 superexpressando NCS-1	64
4.6	Alteração nos níveis de fosforilação de CREB na Serina 133 em células PC12 superexpressando NCS-1	66
4.7	Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina75 em células WT e Clone	68
4.8	Expressão do receptor dopaminérgico D ₁ e níveis de expressão de Calcyon em células PC12 WT e Clone	70
4.9	Níveis de expressão do receptor AMPA e fosforilação de AMPA na Serina845 em células PC12 superexpressando NCS-1	72
4.10	Níveis de expressão de Akt e fosforilação de Akt na Serina473 em células PC12 superexpressando NCS-1	74
4.11	Níveis de expressão de DARPP-32 e fosforilação de DARPP-32 na Treonina34 em células PC12 WT e Clone tratadas 5 minutos com Quinpirole	76
4.12	Níveis de expressão de DARPP-32 e fosforilação de DARPP-32 na Treonina34 em células PC12 WT e Clone tratadas com Quinpirole 1µM	78
4.13	Níveis de expressão de DARPP-32 e fosforilação de DARPP-32 na Treonina34 em células PC12 WT e Clone tratadas 5 minutos com Raclopride 5µM	80

4.14	Níveis de expressão de DARPP-32 e fosforilação de DARPP-32 na Treonina34 em células PC12 WT e Clone tratadas 10 minutos com Haloperidol 5µM	82
4.15	Níveis de expressão de DARPP-32 e fosforilação de DARPP-32 na Treonina34, em células PC12 WT submetidas à 1 hora 30 minutos de <i>starving</i> , tratadas 5 minutos com 5µM de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390	84
4.16	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em células PC12 WT e Clone tratadas com Forskolin 5µM e 10µM	87
4.17	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em células PC12 WT e Clone tratadas 14 dias com antipsicóticos típicos e atípicos	90
4.18	Controle para investigação dos níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em ratos submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias	92
4.19	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias	95
4.20	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 no <i>hippocampus</i> de ratos submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias	97
4.21	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 no <i>striatum</i> de ratos submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias	99
4.22	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 no córtex de ratos submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias	101
4.23	Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 no <i>cerebellum</i> de ratos submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias	103
	DISCUSSÃO	105
	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	LISTA DE FIGURAS	144
	LISTA DE ABREVIATURAS	147

1- INTRODUÇÃO

1.1 DOPAMINA E O SISTEMA DOPAMINÉRGICO

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

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

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

A dopamina diferentemente de outros sistemas de neurotransmissão, encontrados difusamente no sistema nervoso central, se distribui de maneira circunscrita (Glenthoj, 1995) no SNC, sendo encontrada também no sistema nervoso periférico.

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

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

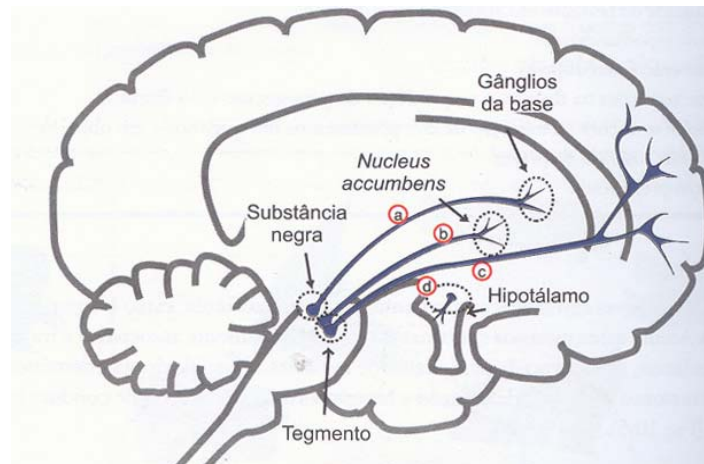


Figura 1: As quatro vias dopaminérgicas. (a) via nigroestriatal, (b) via mesolímbica, (c) via mesocortical, (d) via túbero-infundibular. (Modificado de Stahl, 2002)

1.1.1 SÍNTESE E LIBERAÇÃO DE DOPAMINA

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

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

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

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

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

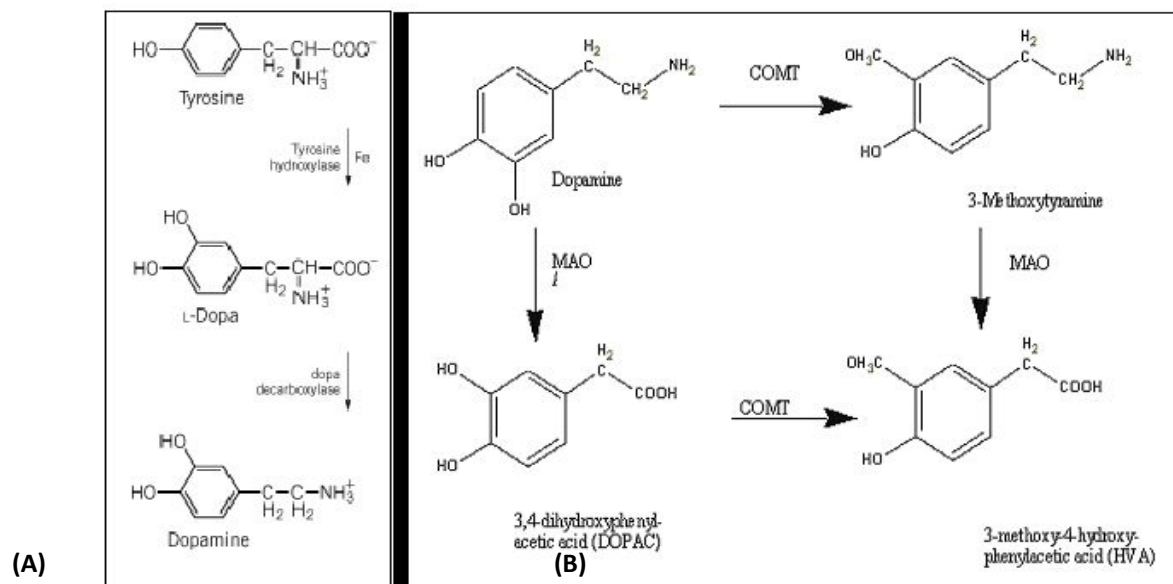


Figura 2: Vias de síntese (2A) e degradação (2B) da dopamina

1.1.2 RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS E SINALIZAÇÃO DE SEGUNDOS-MENSAGEIROS

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

em duas famílias: receptores do tipo D1 (D_1 e D_5) e receptores do tipo D2 (D_2 , D_3 e D_4) (Levant, 1997).

Os receptores dopaminérgicos pertencem à superfamília de receptores acoplados heteromericamente à proteína G (GPCR) (Civelli e *cols.*, 1993), classificados assim como receptores metabotrópicos. Os receptores dopaminérgicos também podem interagir entre si e outros receptores, formando heterodímeros com propriedades farmacológicas distintas. (Rocheville e *cols.*, 2000; Scarselli e *cols.*, 2001; Nimchinsky e *cols.*, 1997; Lee e *cols.*, 2002; Fiorentini e *cols.*, 2003; Gines e *cols.*, 2000; Franco e *cols.*, 2000; Lavine e *cols.*, 2002).

Apesar de as superfamílias de receptores dopaminérgicos serem acopladas a proteína G, G_s e G_i têm efeitos antagônicos na via de sinalização por AMPc. Os receptores do tipo D_1 são acoplados a proteína $G_{s\alpha}/G_{olf\alpha}$ (FIG 3) que ativam a adenilato ciclase (AC) resultando no aumento dos níveis intracelulares do AMPc e conseqüentemente a ativação da Proteína Quinase A (PKA) (Missale e *cols.*, 1998). Já os do tipo D_2 estão acoplados a $G_{i\alpha}/G_{o\alpha}$ gerando inativação desta enzima e redução dos níveis de AMPc (Missale e *cols.*, 1998; Vallone e *cols.*, 2000; Bentivoglio e Morelli, 2005) e conseqüentemente a diminuição da ativação de PKA (Missale e *cols.*, 1998). Também foram descritos o aumento de níveis de Ca^{2+} intracelular e ativação da cascata de sinalização da fosfolipase C (PLC)/proteína fosfatase 2B (PP-2B) (Nishi e *cols.*, 1997) através da sinalização via D_2 . PKA, quando ativada, fosforila canais de Na^+ , levando a uma diminuição do fluxo de íon Na^+ (Li e *cols.*, 1992; Cantrell e *cols.*, 1999; Smith e Goldin, 1997), e a fosfoproteína

regulada por AMPc e dopamina – peso molecular 32kDa (DARPP-32) na treonina 34 (Svenningsson, 2004), modulando assim diversas outras vias; além de estimular a fosforilação da proteína ligante de elemento em resposta ao AMPc (CREB) na serina 133, regulando assim a expressão de diversos genes (Svenningsson, 2004).

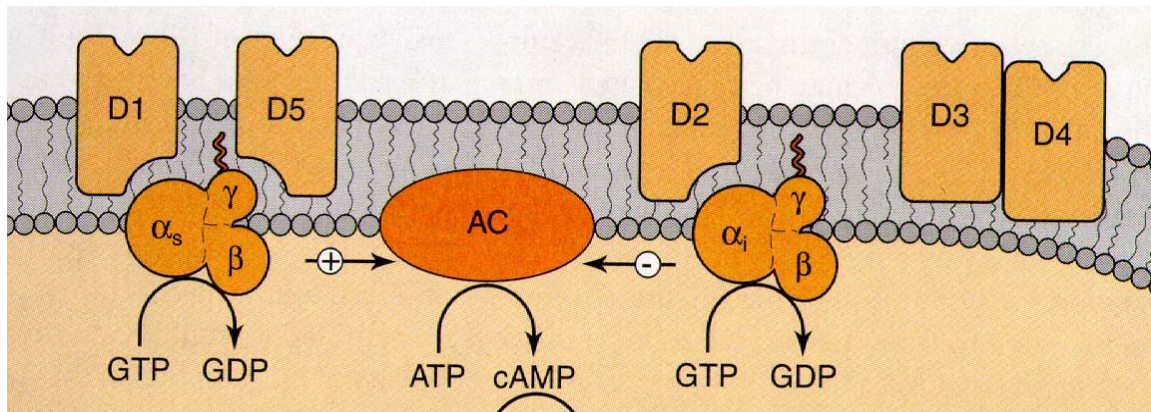


Figura 3: Modulação da adenilato ciclase (AC) mediada por receptores dopaminérgicos (GDP: guanosina difosfato, GTP: guanosina trifosfato). (Modificado de Stahl, 2002)

Além da via clássica do AMPc / PKA, recentemente foi descrito que o estímulo de receptores dopaminérgicos, especificamente D₂ e D₃, alteram a ativação da via Akt, independente de PI3K (Brami-Cherrier e *cols*, 2002; Beaulieu e *cols*, 2007). Sendo a Akt um importante mediador de efeitos fisiológicos de vários fatores de crescimento e de sobrevivência através da inibição da apoptose (Datta e *cols*, 1999), sugere-se a participação da sinalização dopaminérgica nesses eventos (Brami-Cherrier e *cols*, 2002). Nair & Sealfon (2003) demonstraram que a estimulação de D₂ por bromocriptina leva a ativação de PI3K através de c-Src e, consequentemente, a fosforilação de Akt na serina 473, inibindo a apoptose induzida por H₂O₂. Já Beaulieu e *cols* (2004) demonstraram que o estímulo prolongado de receptores D₂ levam a desfosforilação de Akt na treonina 308 sem afetar a fosforilação de Akt na

serina 473. Essa ativação de receptores D₂ leva à formação de complexos com β -arrestina 2, PP-2A e Akt, inativando Akt através da diminuição da fosforilação na treonina 308 e consequente aumento da ativação de GSK3 (FIG 4) (Beaulieu e *cols* 2004; Beaulieu e *cols*, 2005)

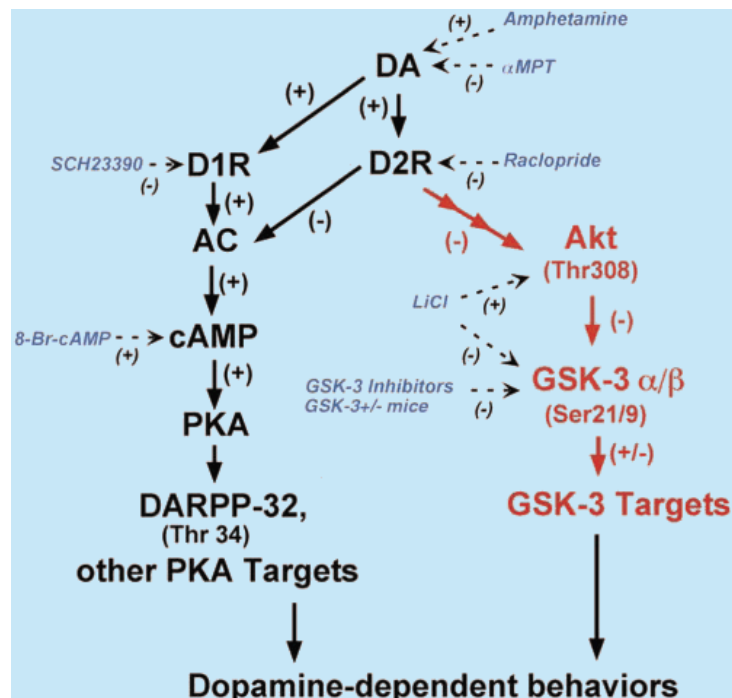


Figura 4: Efeitos da sinalização dopaminérgica tanto na via AMPc quanto na via Akt. (Retirado de Beaulieu e *cols.*, 2004)

Portanto, devido aos diferentes mecanismos de sinalização por segundos-mensageiros, esses dois subtipos de receptores, D₁ e D₂, podem ser diferenciados pelas suas propriedades farmacológicas e ações nos segundos-mensageiros intracelulares (Missale e *cols.*, 1998; Vallone e *cols.*, 2000).

Ambos os subtipos de receptores dopaminérgicos foram descritos no córtex pré-frontal (CPF) (Levey e *cols.*, 1993; Lidow e *cols.*, 1998; Meador-Woodruff e *cols.*, 1996), região cortical envolvida em transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia e transtorno bipolar (Albert e *cols.*, 2002; Lewis e *cols.*, 2005; Ogden e *cols.*, 2004).

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

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

e glia (Paspalas e Goldman-Rakic, 2004; Khan e *co/s.*, 2001; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005).

1.1.3 MODULAÇÃO DO RECEPTOR

Sabe-se que, para modulação da sinalização através de receptores metabotrópicos ocorre um mecanismo de dessensibilização e ressensibilização do receptor. O mecanismo de dessensibilização do receptor representa uma adaptação contra a super-estimulação do mesmo (Lohse, 1993; Krupnick e Benovic, 1998). A dessensibilização de receptores metabotrópicos é mediada pela fosforilação dos resíduos de serina e treonina em domínios intracelulares do receptor (Ferguson, 2001). No entanto, a fosforilação do receptor promove a ligação de arrestina e sua internalização (Krupnick e Benovic, 1998) (FIG 5), deixando-o temporariamente inapto para a ativação por neurotransmissores. O mecanismo de dessensibilização foi descrito demonstrando que, tanto quinases dependentes de segundos-mensageiros, como a proteína quinase sensível a AMPc (PKA), quanto quinase acoplado a proteína G receptor (GRK), contribuem para a dessensibilização de receptores dopaminérgicos ativados (Mason e *co/s.*, 2002). Foi observado que o receptor dopaminérgico D₂ ativado é internalizado pela co-expressão de GRK2 e GRK5 (Ito e *co/s.*, 1999; Iwata e *co/s.*, 1999). Portanto, a dessensibilização pode ser modulada pela ativação da via do AMPc, atuando assim como um *feedback* negativo.

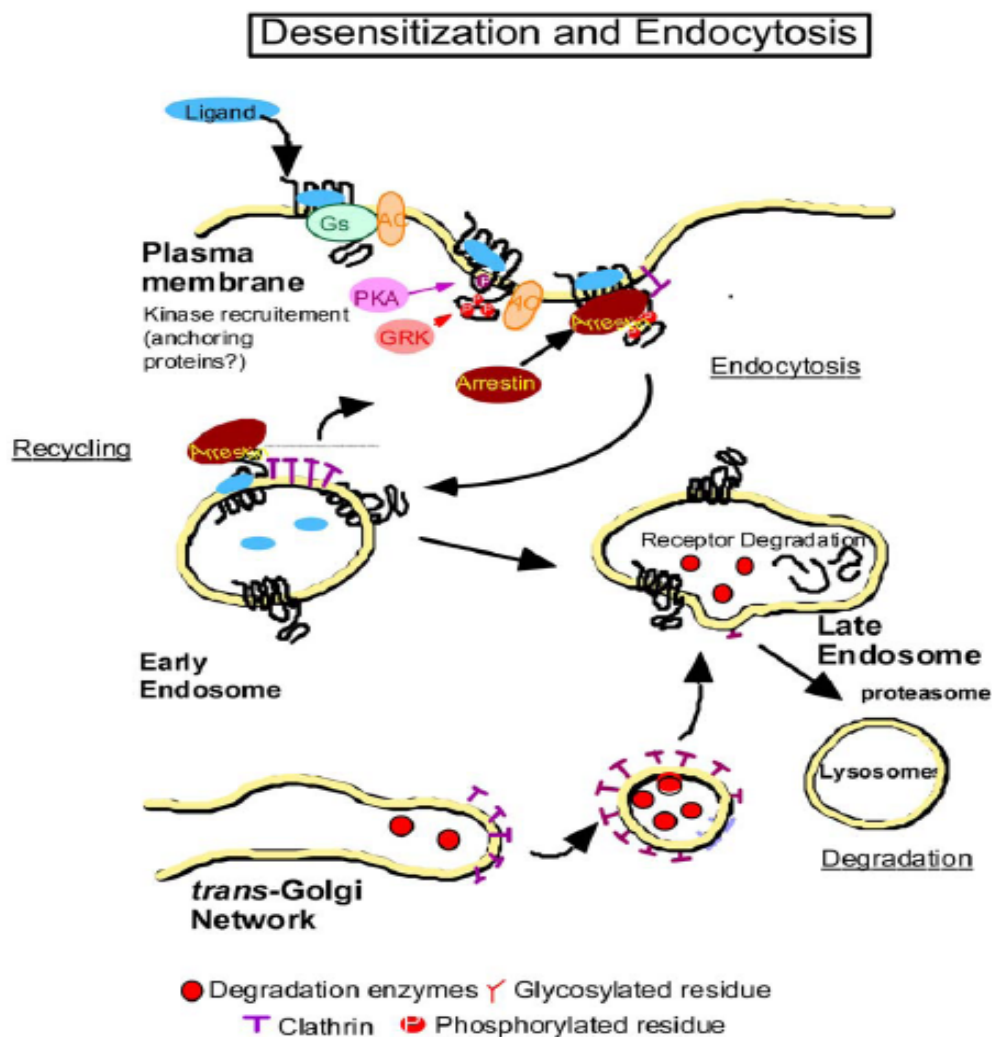


Figura 5: Mecanismo de internalização e dessensibilização de receptor metabotrópico (retirado de Callier e cols., 2003)

Sabe-se que existem certas dificuldades metodológicas para estudar os efeitos fisiológicos da ativação de D₂ no CPF, devido ao seu processo de sensibilização e dessensibilização (Maggio e cols., 1995; Kabbani e cols., 2002). Esses processos, especialmente a dessensibilização, podem potencializar ou até mesmo diminuir os efeitos de tratamentos terapêuticos (Negyessy e Goldman-Rakic, 2005). Kabbani e

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

1.2 DARPP-32 E SINALIZAÇÃO DOPAMINÉRGICA

A proteína DARPP-32 foi descoberta por S. Ivar Walaas e Dana W. Aswad (Walaas, Aswad e Greengard, 1983) e extensivamente estudada desde então. Estudos sobre os mecanismos de funcionamento da DARPP-32 têm desempenhado um papel central na compreensão da sinalização dopaminérgica e suas interações com outros neurotransmissores, drogas terapêuticas e de abuso (Self e *cols.*, 1998; Maldve e *cols.*, 2002). Sabe-se que se localiza em neurônios que possuem receptores dopaminérgicos, sendo identificada como o maior alvo dos produtos da adenilato ciclase ativada por dopamina no *striatum* (Wallas e *cols.*, 1983) (FIG 6).

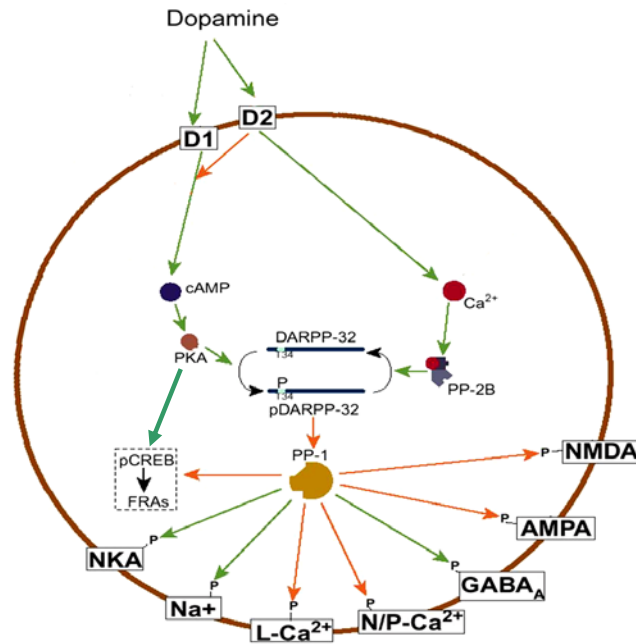


Figura 6: Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos (modificado de Greengard, 2001)

Através da ativação de adenilato ciclase e consequente aumento da disponibilidade de AMPc, ocorre ativação da PKA, que fosforila a DARPP-32 no resíduo de treonina na posição 34 (Thr34) (FIG 7), passando a atuar como potente inibidor da proteína fosfatase 1 (PP-1) (Yan e cols., 1999). Além da Thr34, essa fosfoproteína apresenta outros três sítios de fosforilação:

- treonina na posição 75 (Thr75), que ao ser fosforilada pela quinase dependente de ciclina 5 (Cdk-5) provoca inibição de PKA e conseqüentemente a diminuição da fosforilação da própria DARPP-32 na Thr34;

- serina na posição 102 (Ser102), que fosforilada pela caseína quinase 2 (CK-2) favorece a fosforilação da Thr34 pela PKA, amplificando a inibição de PP-1;
- serina na posição 137 (Ser137), fosforilada pela caseína quinase 1 (CK-1) passa a inibir a atividade da proteína fosfatase 2B (PP-2B) que desfosforila o resíduo Thr34, também amplificando a inibição de PP-1 (King e *cols.*, 1984; Girault e *cols.*, 1989; Desdouits e *cols.*, 1998; Bibb e *cols.*, 1999; Nishi e *cols.*, 1999).

A PP1, cuja atividade é modulada pela DARPP-32, é capaz de regular o estado de ativação de diversos canais iônicos, como canais de Ca^{2+} e de Na^{+} ; receptores, como GABA_A ; e o fator de regulação da transcrição gênica p-CREB (Greengard e *cols.*, 1999; Hsieh-Wilson e *cols.*, 1999).

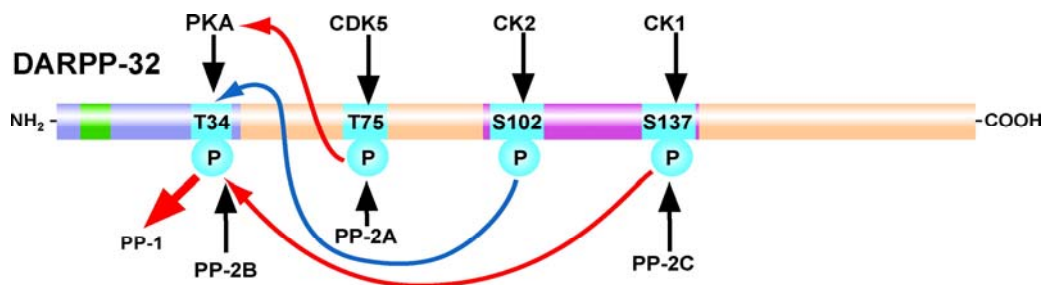


Figura 7: Sítios de fosforilação da DARPP-32 (adaptado de Svenningsson e *cols.*, 2004). Em vermelho são indicadas vias inibitórias e em azul as estimulatórias.

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

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

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

Além deste, o glutamato tem vários outros efeitos regulatórios na fosforilação da DARPP-32. Através da via mGluR1/CK1/Cdk5/pDARPP-32(Thr75), o glutamato antagoniza a sinalização PKA/fosfo-Thr34-DARPP-32. Porém, o glutamato pode

potencializar a sinalização PKA/fosfo-Thr34-DARPP-32 através de três cascatas por:

- receptores NMDA-AMPA/Ca²⁺/PP-2A/desfosforilação da DARPP-32 na Thr75;
- favorecer a formação de AMPc acoplado ao receptor A2A mediada pela ativação de receptores mGlu5;
- aumentar a fosforilação na Ser137 da DARPP-32 mediada através da ativação induzida do receptor mGlu da CK1 (Nishi e cols., 2003).

Através de estudos realizados em fatias estriatais, foi demonstrado que o GABA foi capaz de produzir um rápido aumento no estado de fosforilação da Thr34. Este efeito foi prevenido por bicuculina antagonista de receptores GABA_A. GABA potencializou significativamente o aumento na fosforilação da Thr34 da DARPP-32 produzido por forskolina, ativador de adenilato ciclase. Isto sugere que o GABA aumenta a fosforilação da Thr34 através da inibição de PP-2B (Snyder e cols., 1994).

Como se sabe, o tratamento com antagonistas de D₂ e 5HT₂, e atualmente o efeito agonista parcial de D₂, representam as terapias mais comum para esquizofrenia (Meltzer e cols., 2003; Lindgren e cols., 2003; Lieberman, 2004) e ambos os receptores sinalizam através da fosforilação de DARPP-32 em Thr34. Portanto, DARPP-32 está envolvida nas ações de uma variedade de substâncias usadas para o tratamento de vários transtornos psiquiátricos e neurológicos. Um efeito comum

das drogas antipsicóticas é agir como antagonista de receptores D_2 (Lindgren e cols., 2003). A ativação de receptores D_2 inibe a ativação de PKA e conseqüentemente o estado de fosforilação na Thr34 de DARPP-32. Portanto, reduzindo-se a inibição da ativação de PP-1, que por sua vez atua em diversos receptores e canais iônicos.

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

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

1.3 NCS-1 E MODULAÇÃO DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D_2

O processo de transdução espaço-temporal do sinal de cálcio em funções específicas intracelulares deve-se, em grande parte, à interação desse íon com

algumas proteínas conhecidas como ligantes de cálcio (“*calcium binding proteins*”) e/ou sensoras de cálcio (“*calcium sensor proteins*”), dentre elas a proteína NCS-1.

A NCS-1 é uma proteína ligante de cálcio específica de neurônios, expressa no cérebro de diferentes espécies, como demonstrado no cérebro humano (Martone e cols., 1999; Chen e cols., 2002). Pertence a uma família de proteínas do tipo “*EF-hand*” apresentando 4 sítios de ligação ao Ca^{2+} , um grupo miristoil capaz de interagir com membranas e regiões de associação com quinases e outras proteínas (Bourne e cols., 2001). Porém, NCS-1 não depende de Ca^{2+} para expor sua cauda miristoil N-terminal (O’Calaghan e cols., 2002). Localizada em terminações axonais e estruturas pré- e pós-sinápticas, sugere-se que tenha função na transmissão sináptica no córtex. (Marton e cols., 1999; Negyessy e Goldman-Rakic, 2005). Sabe-se que tanto a NCS-1 quanto sua ortóloga freqüenina encontrada em *Drosófila sp.* são capazes de (FIG 8):

- regular a exocitose de neurotransmissores e agentes secretórios (de Barri e cols., 2006);
- controlar o tráfego de proteínas celulares e modular a atividade de canais iônicos, como os canais de Ca^{2+} e os canais de K^{+} (Taverna e cols., 2007);
- modular alguns processos de plasticidade celular (Pongs e cols., 1993; Nakamura e cols., 2001; Mora e cols., 2002; Tsujimoto, 2002).
- controlar a formação de neuritos pela formação do complexo com TRP5 (Hui e cols., 2006)

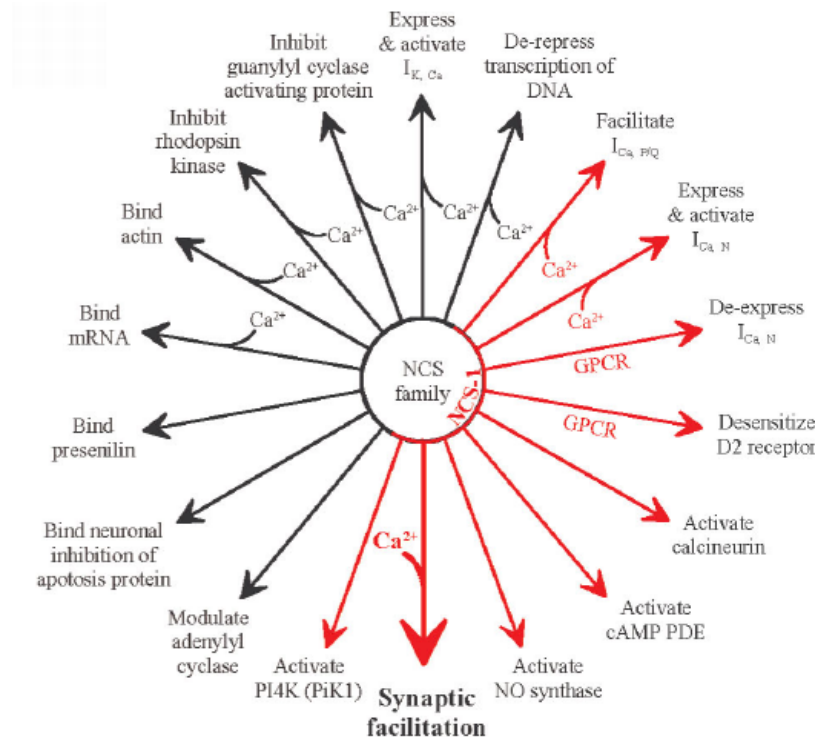


Figura 8: Funções de proteínas sensoras de cálcio. Em vermelho são indicadas funções da NCS-1 (Zucker, 2003).

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

Recentemente alguns trabalhos têm mostrado que a NCS-1 ocupa uma posição importante na regulação de diversas vias de sinalização intracelular. Esta é capaz de inibir/ativar canais de cálcio e potássio dependentes de voltagem, ativar a calcineurina e a óxido nítrico sintase, inibir a guanilato ciclase, inibir a

dessensibilização de receptores de dopamina D₂, ativar a fosfatidilinositol 4-hidroxiquinase- β do tipo III (PI4K β -III) dentre outras (Rajebhosale e *cols.*, 2003).

A dessensibilização do receptor metabotrópico, caracterizada pelo declínio da resposta a agonistas, representa um mecanismo de adaptação que protege o receptor de uma superestimulação (Lohse, 1993; Krupnick e Benovic, 1998). A dessensibilização das proteínas metabotrópicas ativadas é mediado pela fosforilação dos resíduos de serina e treonina nos domínios intracelulares dos receptores (Ferguson, 2001). Portanto, a fosforilação do receptor atua no desacoplamento do receptor com a proteína G, promovendo a ligação de arrestina e a internalização (Krupnick e Benovic, 1998). Também foi demonstrado o papel da dinamina-2 na regulação da internalização de D₂. (Kabbani e *cols.*, 2004).

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

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

Recentemente, Negyessy e Goldman-Racik (2005) compararam, em córtex pré-frontal de primatas, a localização ultraestrutural de D_2 e de NCS-1. Foi observada imunorreatividade abundante de NCS-1 em estruturas pré e pós-sinápticas, nas quais também havia colocalização com D_2 (Negyessy e Goldman-Racik, 2005). Estes dados corroboram com a idéia de um papel da NCS-1 na dessensibilização de D_2 no córtex pré-frontal, fortalecendo ainda mais a hipótese sobre a importância de NCS-1 na sinalização por D_2 .

Sabe-se que a ativação de PKA e PKC, ativações que podem ser iniciadas com a ativação de D_1 , pode levar à formação de complexos NCS-1-GRK2 e D_2 (FIG 9) (Mason e cols., 2002; Ferguson, 2001). Portanto, esse mecanismo é importante para dessensibilização de D_2 e amplificação de sua sinalização, sendo considerado um *feedback* negativo da ativação de D_1 e manutenção do equilíbrio do mecanismo de sinalização dopaminérgica.

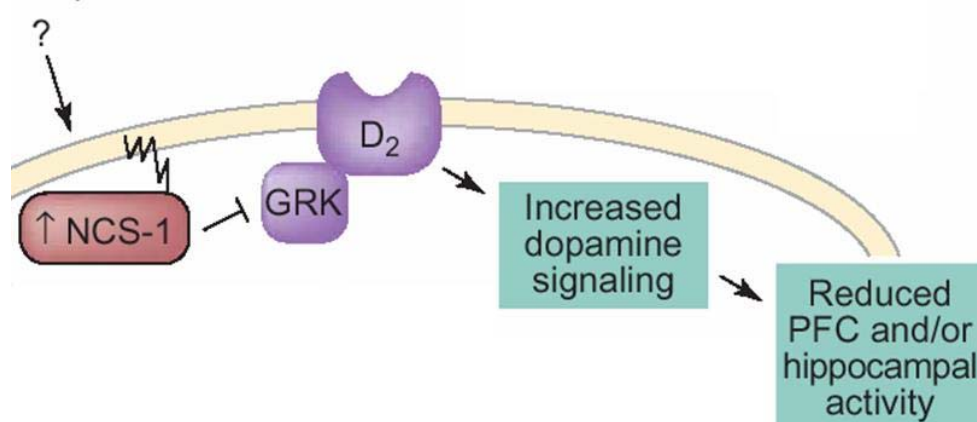


Figura 9: Modulação de GRK2/ D_2 por NCS-1(modificado de Braunewell, 2005)

Recentemente Nakamura e *cols* (2006) demonstraram que NCS-1 também atua como um importante fator de sobrevivência celular. Células superexpressando NCS-1 foram mais tolerantes à morte celular causada por diversos estressores, quando comparada a células expressando o mutante negativo (E120Q). Também foi demonstrada que a expressão de NCS-1 é aumentada em lesões induzidas de neurônios do núcleo dorsal motor. Confirmando a hipótese de que NCS-1 estaria envolvida na sobrevivência neuronal, foi demonstrado que NCS-1 medeia a neuroproteção induzida por GDNF através da via da Akt.

1.4 ESQUIZOFRENIA E SUAS ALTERAÇÕES DOPAMINÉRGICAS

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

Diversas publicações científicas vêm demonstrando a influência genética na esquizofrenia. O risco para seu desenvolvimento é diretamente proporcional à predisposição genética relacionada à susceptibilidade de genes já identificados (Gottesman, 1991 *apud* Lewis e cols., 2005). Porém, o risco conferido para cada gene demonstrou-se ser pequeno já que o grau de concordância para esquizofrenia em gêmeos homozigóticos é de cerca de 50%, o que indica que apenas o fator genético não é suficiente para o desenvolvimento da doença. Consistente com esta interpretação, vários fatores ambientais, como idade avançada do pai na concepção e uso de *Cannabis* durante a adolescência, demonstraram aumentar o risco de desenvolvimento da esquizofrenia durante a vida (Lewis e Levitt, 2002 *apud* Lewis e cols., 2005). No entanto, pode-se afirmar que, para o desenvolvimento da etiologia, é necessária uma interação entre susceptibilidade genética e fatores de risco ambientais (Lewis e cols., 2005). Assim, estudos sobre os mecanismos de funcionamento neuronal e cerebral visam elucidar as causas e efeitos dessa etiologia.

Apesar dos grandes avanços nos estudos relacionados à esquizofrenia no último século, atualmente não existem procedimentos laboratoriais, métodos de neuroimagem e testes psicológicos que auxiliem no diagnóstico de esquizofrenia (Lewis e cols., 2005). A esquizofrenia só é diagnosticada com base em síndromes clínicas. A *American Psychiatry Association* (1994) apresenta critérios para o diagnóstico, como a presença de duas ou mais das seguintes características clínicas: delírios, alucinações, pensamento desorganizado (ex: fala incoerente), comportamento catatônico e sintomas negativos. Os sintomas negativos incluem embotamento afetivo (sem expressão emocional), alogia (pobreza na fala) e

avolição (sem iniciativa para atividades). Além dessas disfunções, deve existir evidência de disfunção social e ocupacional, duração contínua por seis meses e a certeza de que as disfunções não estão atribuídas à outra desordem. No entanto, é interessante o desenvolvimento de marcadores para um diagnóstico seguro da esquizofrenia.

Indivíduos com esquizofrenia demonstram déficits cognitivos. Certos déficits cognitivos cruciais na esquizofrenia parecem refletir em alterações na representação contextual e manutenção de funções, como a memória de trabalho, que depende do córtex pré-frontal dorsolateral (CPFDL). Indivíduos com esquizofrenia tendem a ter um baixo desempenho em tarefas que exigem memória de trabalho, demonstrando redução na ativação do CPFDL (Weinberger e *cols.*, 1986 *apud* Lewis e *cols.*, 2005; Perlstein e *cols.*, 2001 *apud* Lewis e *cols.*, 2005). No entanto, avanços na pesquisa sobre os mecanismos da memória de trabalho vêm ajudando no esclarecimento do seu funcionamento anormal e de transtornos relacionados, como a esquizofrenia.

Devido à hipótese e evidências do mau funcionamento da memória de trabalho em indivíduos com esquizofrenia, estudos vêm demonstrando várias alterações no CPFDL em indivíduos com a doença (MacDonald e *cols.*, *in the press apud* Lewis e *cols.*, 2005).

Existem trabalhos demonstrando que, durante alguns episódios psicóticos, em indivíduos com esquizofrenia, existe um funcionamento anormal do CPFDL.

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

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

Porém, apesar de muitas destas alterações serem descritas do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia continua sendo, após décadas de estudo, a mais proeminente das investigações desta fisiopatologia (Bennet, 1998; Calrsson, 2001; Kasper, 2002). Sabe-se que no CPFDL são encontrados tanto receptores dopaminérgicos D₁ quanto D₂ (Levey e cols., 1993; Lidow e cols., 1998; Meador-Woodruff e cols., 1996).

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

Recentemente, experimentos realizados com amostras de cérebro de indivíduos com esquizofrenia foram relatados por diferentes grupos de pesquisa, os quais

estudaram a expressão de duas proteínas moduladoras da sinalização celular na região do CPF DL, DARPP-32 e NCS-1 (Albert e *cols.*, 2002; Ishikawa e *cols.*, 2007; Bai e *cols.*, 2003; Bergson e *cols.*, 2004).

Sabe-se que DARPP-32 é uma proteína para qual diversos sinais de segundo mensageiros convergem (Svenningsson, 2003), sugerindo assim que seu funcionamento normal seria de importância para o mecanismo de sinalização dopaminérgica. Albert e *cols* (2002) demonstraram que DARPP-32, na região CPF DL em esquizofrênicos, está significativamente reduzida quando comparado com indivíduos controles pareados. O trabalho consistiu da mensuração, tanto da quantidade de DARPP-32 quanto de outras proteínas neuronais, em amostras *post-mortem* de cérebros de indivíduos com esquizofrenia. Além disso, nesse trabalho foi demonstrado que as demais proteínas sinapsina I e subunidade alfa da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, não estavam alteradas no CPF DL de indivíduos com esquizofrenia. Já recentemente, Ishikawa e *cols* (2007) demonstraram que indivíduos tanto CPF de indivíduos esquizofrênicos quanto bipolar tem uma redução na expressão de DARPP-32 comparados com indivíduos normais. Apesar da demonstração de alterações nos níveis de expressão proteica de DARPP-32 em CPF de esquizofrênicos, os níveis de RNAm não parecem estar alterados na mesma região (Baracska e *cols*, 2006)

Li e *cols* (2006) investigaram a existência de mutações na DARPP-32 que poderiam estar relacionadas com a esquizofrenia. Porém, seus resultados foram negativos, sugerindo que a diminuição da expressão proteica de DARPP-32 no CPF não

estaria associada à nenhuma das mutações estudadas. Já Meyer-Lindenberg e *cols* (2007) demonstraram em cérebros humanos *postmortem*, a associação entre haplótipos e melhora de funções cognitivas dependentes da ativação frontoestriatal.

Além dos estudos, acima descritos, que demonstram evidências na alteração na expressão de DARPP-32, e consequentemente na sinalização de segundo mensageiros relacionado ao sistema dopaminérgico, recentemente foram publicados dois trabalhos demonstrando alteração no sistema de regulação da sinalização dopaminérgica em indivíduos com esquizofrenia. Sabe-se que NCS-1 tem um papel na modulação da sinalização dopaminérgica, regulando a liberação de neurotransmissores e aumentando a sinalização via receptores D₂, inibindo sua dessensibilização (Rajebhosale e *cols.*, 2003). No entanto, em dois trabalhos foi demonstrado um aumento significativo nos níveis de proteína e RNAm de NCS-1 e Calcyon, proteína responsável pela dessensibilização de D₁, no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, comparados com indivíduos controle, sem o diagnóstico de esquizofrenia (Bai e *cols.*, 2004; Koh e *cols.*, 2003). Koh e *cols.* descreveram um aumento maior que 50% nos níveis de NCS-1 na região CPFDL de pacientes esquizofrênicos e bipolares, comparados com controles normais. Controles para o uso de antipsicóticos e/ou estabilizadores do humor também foram feitos, o que foi confirmado por estudo dos níveis de NCS-1 em macacos submetidos a tratamento crônico com haloperidol, onde não foi observada diferença significativa com o grupo controle (Negyessy e Goldman-Rakic, 2005).

Bai e cols., além de mensurar os níveis protéicos de NCS-1 e Calcyon, investigou também os níveis de RNAm em amostras de cérebros provenientes do banco de cérebros *Brain Collection of the Mount Sinai Medical School/Bronx Veterans Administration Medical Center*. Foi demonstrado que os níveis protéicos e de RNAm de NCS-1 e Calcyon estavam aumentados no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Nesse trabalho, foi demonstrado também um aumento de RNAm de NCS-1 no córtex occipital de indivíduos com esquizofrenia, porém, sem o aumento dos níveis protéicos de NCS-1. Como todos os indivíduos com esquizofrenia estavam sob medicação de antipsicóticos, foram estudados os efeitos destes nos níveis de NCS-1 e Calcyon em cérebros de primatas não-humanos. Como já foi descrita a função de NCS-1 em amplificar a sinalização via D₂, uma via inibitória, sugere que o aumento desta proteína no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia também está associado aos seus transtornos cognitivos.

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

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

2- OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar alterações em vias de sinalização intracelular das vias do AMPc/PKA e Akt, em células PC12 que superexpressam estavelmente NCS-1 (Clone). Observar se alterações na sinalização intracelular estão envolvidas com receptores dopaminérgicos, através de tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos.

Verificar alteração na expressão de proteínas envolvidas na sinalização intracelular dopaminérgica, em ratos tratados com antipsicóticos.

Objetivos específicos

- verificar a expressão de NCS-1 em células PC12 WT e Clone;
- verificar alterações na via da sinalização intracelular por AMPc nas células PC12 Clone;
- verificar alterações na via de sinalização intracelular por Akt nas células PC12 Clone.
- verificar o papel da sinalização dopaminérgica na modulação da sinalização intracelular de células PC12 Clone
- investigar a modulação de antipsicóticos típicos e atípicos na expressão de NCS-1 e DARPP-32 *in vitro*.
- investigar a modulação de antipsicóticos típicos e atípicos na expressão de NCS-1 e DARPP-32 *in vivo*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – EXPERIMENTO *IN VITRO*

3.1.1- CULTURA CELULAR

Células PC12 (*Rat pheochromocytoma*) Selvagem (*wild type* - WT) e que superexpressam NCS-1 de rato (Clone) foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Andreas Jeromin (Division of Neuroscience, Baylor College of Medicine, Vivian Smith Building, One Baylor Plaza, Houston, Texas, USA). As células não diferenciadas foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) alta glicose (GIBCO) suplementadas com 5% de soro eqüino (ES) (GIBCO), 5% de soro fetal bovino (FSB) (GIBCO), 1% de penicilina (GIBCO) e 1% de streptomomicina (GIBCO) em frascos de 50cm³ na estufa a 37°C e 5% de CO₂, com troca de meio a cada 2 dias e passagens a cada 7 dias. Células Clone foram cultivadas em meio seletivo contendo G418 (400mg/mL - Clontech).

3.1.2- DROGAS E REAGENTES

Haloperidol (H1512), Clozapina (C6305), Risperidona (R118), R-(+)SCH-23390 (D054), (±)Quinpirole (Q111), S(-)Raclopride (R121) e Forskolin (F6886) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation. Demais reagentes eram de grau analíticos e obtidos de fontes comerciais diversas.

3.1.2- PROCEDIMENTOS FARMACOLÓGICOS

Células PC12 WT e Clone foram tratadas com ($\pm$)Quinpirole (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25 e 50 μ M) por 5 minutos e ($\pm$)Quinpirole 1 μ M por 1, 2, 5, 10, 30 minutos e 1 hora para posterior análise de fosforilação de proteína. Células PC12 WT e Clone foram tratadas com S(-)Raclopride (0,5; 1,0 e 5 μ M) por 5 minutos e Haloperidol (0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 25,0 μ M) por 10 minutos para posterior análise de fosforilação de proteína.

Células PC12 WT foram submetidas a privação (*starving*) de 1 hora e 30 minutos em meio DMEM alta glicose (GIBCO) sem soro, DMEM baixa glicose (GIBCO) sem soro e PBS 1x. Posteriormente as células foram tratadas com 5 μ M de Haloperidol, R-(+)-SCH-23390, ($\pm$)Quinpirole, S(-)Raclopride por 5 minutos para posterior análise de fosforilação de proteína.

Células PC12 WT e Clone foram tratadas com Haloperidol (1,0; 10,0 e 20 μ M), Clozapina (20 μ M) e Risperidona (20 μ M) por 14 dias, e Forskolin (5 μ M e 10 μ M) por 24, 48 e 72 horas para posterior análise de expressão proteica.

3.2- EXPERIMENTO ANIMAL

3.2.1- ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os tratamentos de animais foram realizados pelo grupo do Prof. João Quevedo (UNESC) e os cérebros congelados foram enviados por via aérea para nosso laboratório em Belo Horizonte para processamento e análise.

Ratos Wistar macho (2 meses de idade) foram obtidos da colônia do Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense em Criciúma. Os animais foram mantidos em gaiolas com comida e água disponíveis *ad libitum*, e mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 07:00h). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas para experimentação animal do *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), com a aprovação do comitê de ética local.

3.2.2 – DROGAS E REAGENTES

Água deionizada foi obtida em sistema *Milli-Q*, Millipore, Bedford, MA, USA. Haloperidol (HAL) (Haldol®) foi adquirido da Cristália Prod. Quim. e Farmacêuticos, Itapira, Brazil. Clozapina (CLO) (Leponex®) foi adquirida da Novartis Biociências AS, São Paulo, Brazil. Olanzapina (OLZ) (Zyprexa®) foi adquirida da Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil. Aripiprazole (Ari) (Abilify®) foi adquirida da Bristol-Myers Squibb, São Paulo, Brazil.

3.2.3 – PROCEDIMENTOS FARMACOLÓGICOS

Os animais receberam injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 or 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) num volume de 1,0 mL/kg por 28 dias. Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina Tween 1%. Animais controle receberam solução salina (1,0 mL/Kg). Três dias após a última injeção, os ratos foram sacrificados por decapitação e o córtex pré-frontal (CPF), o hipocampo (HP), striatum (ST), córtex (CX) e cerebellum (CB) foram removidos imediatamente.

3.3 - DOSAGEM DE PROTEÍNA

Para a quantificação protéica foi utilizado o método descrito por Bradford. Entre 1,0 e 2,0µL de extrato protéico foram adicionados a 1,0mL de solução de NaCl 0,15M e 1,0mL de reagente de Bradford (0,06% (p/v) de azul de Comassie G-250 e 3% (v/v) de ácido perclórico). Após a homogeneização, incubou-se a mistura por 2 minutos a temperatura ambiente. Foram feitas as leituras das absorbâncias no espectrofotômetro (Kinetics/ Endpoint System Analyser - Hitachi) no comprimento de onda de 595nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina bovina (1 a 10µg) foi utilizada.

3.4 - ELISA

Foram incubadas 1×10^6 células PC12 WT e Clone em 100µL de meio DMEM alta glicose descrito acima, em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por uma noite. Os níveis de

AMPC foram determinados por imunoenensaio enzimático (Biotrak, Amersham-Biosciences) sem acetilação, conforme instruções do kit. Os valores demonstrados através de unidades absolutas e foram corrigidos através da dosagem de proteínas pelo método Bradford descrito acima.

3.5 - IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para detecção de DARPP-32 e NCS-1, as células PC12 foram fixadas com metanol gelado por 20 minutos. As células fixadas foram lavadas com PBS (Na_2HPO_4 23mM, NaH_2PO_4 6,7mM, NaCl 34,2mM, pH 7,4) gelado 2 vezes por 10 minutos. Para detecção de D_2R , D_1R e TrkB, as células foram fixadas com paraformaldeído 3% por 20 minutos em temperatura ambiente. Foi feita a permeabilização com solução bloqueadora (PBS, Triton X-100 0.1%, BSA 0.5%) por 10 minutos para a detecção de DARPP-32 e NCS-1, e apenas bloqueio sem permeabilização para detecção de receptores dopaminérgicos D_2 e D_1 . Em seguida as células foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal *coelho* anti-DARPP-32 (1:200 - H-62 - Santa Cruz) e policlonal *coelho* anti-NCS-1 (1:200 - FL-190 - Santa Cruz). Em seguida as células foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente e protegidas da luz, com anticorpo Alexa Fluor 488 cabra *anti-coelho* (1:200 - Molecular Probes). Como controle de marcação específica, algumas lamínulas não foram incubadas com anticorpo primário. As imagens das células foram obtidas utilizando microscópio confocal (ver adiante).

3.6 - MICROSCOPIA CONFOCAL

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

3.7 – MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Células PC12 em cultura foram incubadas com PBS EDTA 5mM, por cinco min, e centrifugadas por 3 min a 1000g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS em placas de 96 poços. Em seguida, as PC12 foram permeabilizadas com solução de PBS contendo 0,5% de saponina, 0,1% de BSA e 2mM de azida sódica, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a permeabilização as células foram incubadas com os anticorpos primários: anticorpo policlonal coelho anti-DARPP-32 (1:20 - H-62 - Santa Cruz) e policlonal coelho anti-NCS-1 (1:30 - FL-190 - Santa Cruz). As preparações foram lavadas com solução de PBS contendo 0,5% de saponina, 0,1% de BSA e incubadas por 15 min, em temperatura ambiente e protegidas da luz, com anticorpo Alexa Fluor 488 cabra *anti-coelho* (1:200 - Molecular Probes). As preparações foram novamente lavadas com solução de PBS contendo 0,5% de saponina, 0,1% de BSA e, finalmente,

lavadas em solução de PBS contendo 2mM de azida sódica, por centrifugação a 200g, 4 °C, 10 minutos. Em seguida, as células foram fixadas com solução de PBS contendo 2% de formaldeído, para posterior aquisição FACS_{CAN} Becton & Dickison. Anticorpos Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho foram utilizados como controles.

3.8 - AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As preparações celulares marcadas com os anticorpos fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo FACS_{CAN} (Becton & Dickinson) após a coloração. Durante a aquisição dos dados foram coletados 30000 eventos. Os dados coletados foram analisados através do programa de computador *Cell Quest* (Becton & Dickinson). A primeira etapa do processo de análise consistiu na determinação da população celular de interesse. Isto foi feito baseando-se no perfil de tamanho e granulosidade das populações adquiridas. Uma vez definida a população celular de interesse procedeu-se às análises de fluorescência. Para isto, foram montados gráficos pontuais de fluorescência e a delimitação dos quadrantes foi definida a partir do posicionamento de células marcadas com os anticorpos fluorescentes, respeitando-se a definição da população celular. Definido o posicionamento dos quadrantes, o *Cell Quest* forneceu uma análise estatística dos dados, baseada na percentagem ou no número absoluto de células posicionadas nas regiões definidas e na intensidade de fluorescência média de expressão proteica.

3.9 - IMUNOBLOT

Para a preparação dos extratos celulares e de tecido para *imunoblot*, o material foi incubado com tampão de lise (20mM MOPS – pH7, 2mM EGTA, 5mM EDTA, 30mM Floreto de sódio, 40mM β -glicerofosfato – pH 7,2, 20mM Pirofosfato, 1mM Ortovanadato de sódio, 1mM Fenilmetilsulfonil fluoreto, 3mM Benzamidina, 10 μ M Leupeptina e 0,5% Nonidet P40) no gelo por 30 minutos e centrifugado a 13.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80°C. Extrato de hipocampo de rato foi utilizado como controle positivo. Em seguida, foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Quantidades iguais de proteína (50 μ g) foram preparadas para eletroforese com tampão de amostra NuPAGE LDS (Invitrogen) e 10% de β -Mercaptoetanol, fervidas a 70°C por 10 minutos e aplicadas em gel Bis-Tris NuPAGE 4-12% (Invitrogen) para eletroforese. Após eletroforese, foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond - Amersham Biosciences) e coloração com Ponceau vermelho. A eletroforese e a transferência foram realizadas conforme orientações do kit. As membranas, para análise de proteína total, foram incubadas em solução de bloqueio PBS (Na_2HPO_4 23mM, NaH_2PO_4 6,7mM, NaCl 34,2mM, pH 7,4) contendo 0,5% de Tween 20 e 5% de leite desnatado por 40 minutos. Para análise de proteínas fosforiladas, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS (Tris 20mM, NaCl 137mM, pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20 e 5% de BSA por 40 minutos. Em seguida, incubaram-se as membranas *overnight* a 4°C com anticorpo monoclonal camundongo anti-actina (1:2000 - MAB1521R - Chemicon), policlonal coelho anti-DARPP-32 (1:250 - H-62 - Santa Cruz) e policlonal coelho anti-NCS-1 (1:2000 - FL-190 - Santa Cruz),

policlonal camundongo anti-CREB (1:1000 – MAB5432 – Chemicon), policlonal cabra anti-Calcyon (1:1000 – E20 – Santa Cruz Biotechnology), monoclonal camundongo anti-Akt1(1:1000 – 05-591 – Upstate), policlonal coelho anti-AMPA (1:500 – AB1504 – Chemicon), policlonal coelho anti-D2 (1:500 – AB1558 – Chemicon), policlonal coelho anti-D1 (1:500 – AB1784P), todos diluídos em PBS Tween 0,5%. Para análise de proteínas fosforiladas, incubou-se as membranas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal coelho anti-p-CREB (1:1000 - AB3442 - Chemicon), policlonal coelho anti-pDARPP-32(Thr34) (1:1000 – AB9206 – Chemicon); policlonal coelho anti-pDARPP-32(Thr75) (1:1000 – AB9208 – Chemicon), policlonal coelho anti-pAMPA_t(Ser845) (1:1000 - AB5849 – Chemicon), policlonal coelho anti-pAkt(Ser473) (1:1000 – sc-7985-R – Santa Cruz) diluído em TBS Tween 0,1%. Após a incubação em anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário cabra anti-camundongo peroxidase-linked IgG (1:7000 - Molecular Probes), cabra anti-coelho horseradish peroxidase-linked IgG (1:15000 - Molecular Probes) ou coelho anti-cabra horseradish peroxidase-linked IgG (1:7000 - Molecular Probes) por uma hora em temperatura ambiente, sendo o anticorpo secundário das proteínas fosforiladas diluído em TBS Tween 0,1% e os demais em PBS Tween 0,5%. As membranas foram submetidas à detecção quimioluminescente conforme instruções do kit ECL Plus (Amersham Biosciences), e visualizadas através do ImageQuant.

3.10 – ANÁLISE DOS IMUNOBLOTS

Bandas imunorreativas não saturadas foram submetidas à varredura densitométrica e a quantificação pelo Scion Image Software versão Beta 4.0.2 (Scion Corporation,

National Institutes of Health, USA). Os valores obtidos para proteínas total e fosforiladas foram corrigidos pelos valores da actina.

3.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa Sigmaplot/Sigmastat 9.0 através testes *t* Student ou análise variância (ANOVA) e foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0.05$ e poder $> 0,8$.

4.1 – EXPRESSÃO DE NCS-1 EM CÉLULAS PC12 Clone

Para a caracterização e a confirmação de que células PC12 Clone estão superexpressando NCS-1, foram realizadas análises por microscopia confocal, *western blot* e citometria de fluxo.

Para a visualização da expressão da proteína NCS-1, imagens foram obtidas através da microscopia confocal. As células foram fixadas e permeabilizadas para a marcação com anticorpo anti-NCS-1 (ver Material e Métodos). Na figura 10A podemos observar um aumento na expressão de NCS-1 em células Clone (FIG 10Ab) quando comparadas à expressão de NCS-1 nas células WT (FIG 10Aa)

Para a caracterização bioquímica da expressão proteica de NCS-1, foram realizados *imunoblots*, demonstrando que os níveis de NCS-1 estão aumentados nas células Clone (FIG 10B). Análise quantitativa da expressão de NCS-1, normalizada com a expressão de actina, demonstrou que a diferença entre as células WT e Clone é significativa. A média dos níveis de NCS-1 nas células Clone é 133% maior do que o valor da média dos níveis de NCS-1 nas células WT (FIG 10C).

Também foi verificado os níveis de expressão de NCS-1 através da citometria de fluxo, onde células foram fixadas e permeabilizadas para a marcação com anti-NCS-1. Foi observado que os níveis de intensidade média de fluorescência de NCS-1 são

55% maiores nas células Clone quando comparadas as células WT (FIG 10D). Foi observado, entretanto, uma grande variação na expressão de NCS-1 nas células Clone.

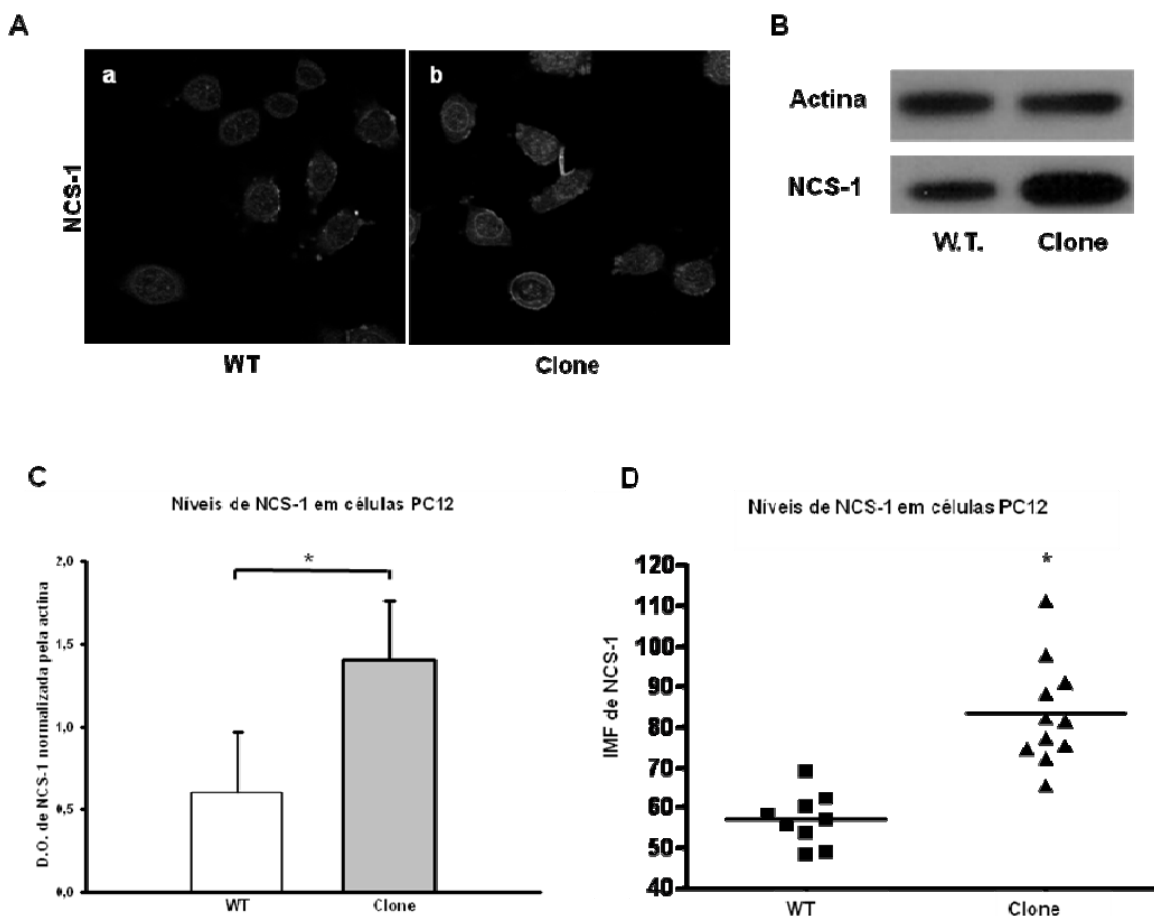


Figura 10: Níveis da expressão proteica de NCS-1 em células PC12 WT e Clone. Imagens de células PC12 WT e Clone obtidas através de microscopia confocal foram realizadas para visualização de expressão de NCS-1. Observa-se o aumento de expressão de NCS-1 em células Clone (Ab) em relação às células WT (Aa). *Imunoblot* com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise de expressão de NCS-1 (B). Quantificação da expressão das proteínas NCS-1 foi normalizada com a expressão da actina (C). Observa-se um aumento significativo de 133% de expressão de NCS-1 nas células Clone comparadas com as células WT. Análises por citometria de fluxo foram realizadas para avaliar os níveis de NCS-1 nas células PC12. Observou-se que a intensidade média de fluorescência nas células Clone foi 55% maior que em células WT (D). Os experimentos de *imunoblot* foram realizados em duplicata com n=9. O experimento de citometria de fluxo foi realizado com n=11. (* $p < 0,01$, *t-student*, média, desvio padrão)

4.2 – EXPRESSÃO E EXPOSIÇÃO DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D₂ EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

A liberação de dopamina (Greene e cols, 1976; Magyar e cols, 2004) e expressão endógena de receptor dopaminérgico D₂ (Courtney e cols, 1991; Chiasson e cols, 2006.; Wang e cols, 2006) é bem descrita em células PC12. Porém, para confirmar a existência deste receptor e verificar se ocorre alguma alteração na expressão de D₂ nas células Clone, foram realizadas análises de *imunoblot* com anticorpo específico anti-D₂. Na figura 11A podemos observar a existência de D₂. Análise quantitativa da expressão de D₂, normalizada pela expressão de actina, demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão proteica do receptor dopaminérgico D₂ entre células WT e Clone (FIG 11B).

Foi demonstrado que a inibição da internalização do receptor D₂ pela NCS-1 é dependente da estimulação por agonistas (Kabbani e cols, 2002). Verificamos se os níveis de exposição do receptor D₂ estariam alterados nas células Clone sem a estimulação por agonistas dopaminérgicos. Células PC12 WT e Clone não permeabilizadas foram marcadas com anti-D₂ e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Foi observado que não existe diferença nos níveis de exposição de D₂ entre as células WT e Clone sem a estimulação por agonistas (FIG 11C).

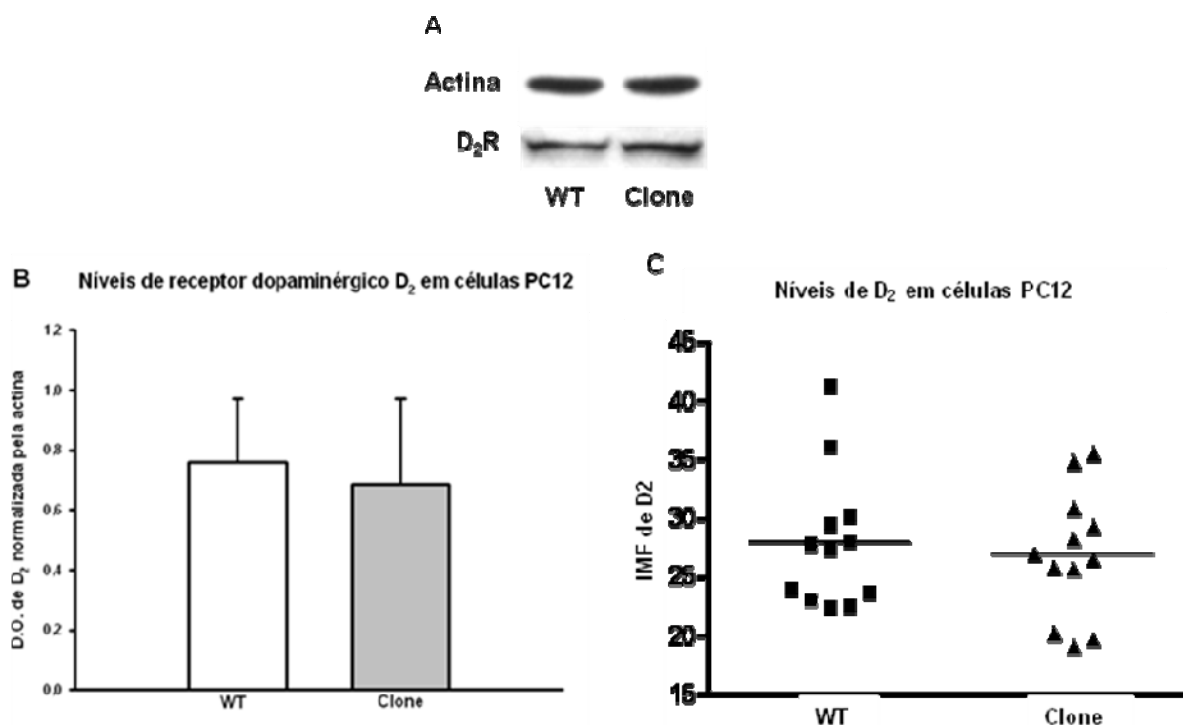


Figura 11: Níveis da expressão do receptor dopaminérgico D₂ em células PC12 WT e Clone.

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise de expressão de D₂ (A). Quantificação da expressão das proteínas D₂ foi normalizada com a expressão da actina (B). Observa-se que não existe diferença nos níveis de expressão proteica de D₂ entre as células WT e Clone. Exposição de D₂ foi analisada por citometria de fluxo em células PC12 WT e Clone não-permeabilizadas. Observa-se que não existe diferença na intensidade média de fluorescência entre células WT e Clone (C). Os experimentos de *imunoblot* foram realizados em duplicata com n=4. O experimento de citometria de fluxo foi realizado com n=11. (*t-student*; média e desvio padrão)

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

Sabe-se que NCS-1 diminui a dessensibilização do receptor D₂ quando estimulados por agonistas (Kabbani e *cols.*, 2002). Observamos que os níveis de expressão e exposição do receptor dopaminérgico D₂ não estão alterados nas células Clone sem estimulação por agonistas (FIG 12). Esses receptores são acoplados a proteína G, que inibe a atividade de Adenilato Ciclase, a formação de cAMP e conseqüentemente a ativação de PKA. Investigamos os níveis de AMPc nas células WT e Clone para avaliar se ocorrem alterações na via de sinalização cAMP/PKA em células PC12 superexpressando NCS-1. Foram realizadas análises ELISA para verificação dos níveis totais de AMPc em células PC12 WT e Clone. Os valores foram normalizados através da dosagem de proteínas. Foi observado que a média dos níveis de AMPc em células Clone é 125% menor que média de AMPc de células WT (FIG 12).

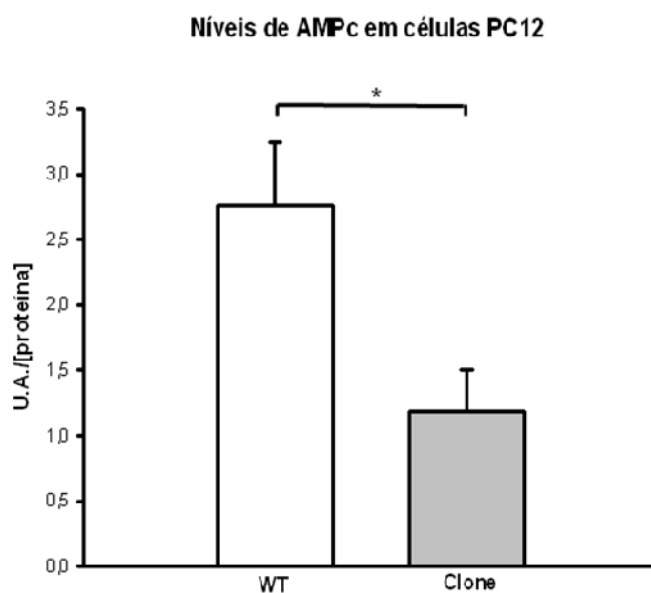


Figura 12 – Representação quantitativa dos níveis totais de AMPc em células PC12 WT e Clone.

Os níveis totais de AMPc de células WT e Clone foram mensurados através de ELISA e normalizadas através de dosagem de proteínas, demonstrando uma diminuição de 125% de AMPc nas células Clone. Todos os experimentos foram realizados em duplicata (* $p < 0,01$, *t-student*, média, desvio padrão e $n=4$).

4.4 – ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Para a visualização da expressão da proteína DARPP-32, imagens foram obtidas através da microscopia confocal. As células foram fixadas e permeabilizadas para a marcação com anticorpo anti-DARPP-32 (ver Material e Métodos). Na figura A podemos observar uma diminuição na expressão de DARPP-32 em células Clone (FIG 13Ab) quando comparadas à expressão de DARPP-32 nas células WT (FIG 13Aa).

Imunoblots foram realizados para verificar os níveis de expressão de DARPP-32, demonstrando que os níveis de DARPP-32 estão reduzidos nas células Clone (FIG 13B). Análise quantitativa da expressão de DARPP-32, normalizada com a expressão de actina, demonstrou que a diferença entre as células WT e Clone é significativa. A média dos níveis de DARPP-32 nas células Clone é 50% menor do que o valor da média dos níveis de DARPP-32 nas células WT (FIG 13C).

Também foram verificados os níveis de DARPP-32 através da citometria de fluxo, onde células foram fixadas e permeabilizadas para a marcação com anti-DARPP-32. Foi observado que os níveis de intensidade média de fluorescência são 50% menor nas células Clone quando comparadas as células WT (FIG 13D).

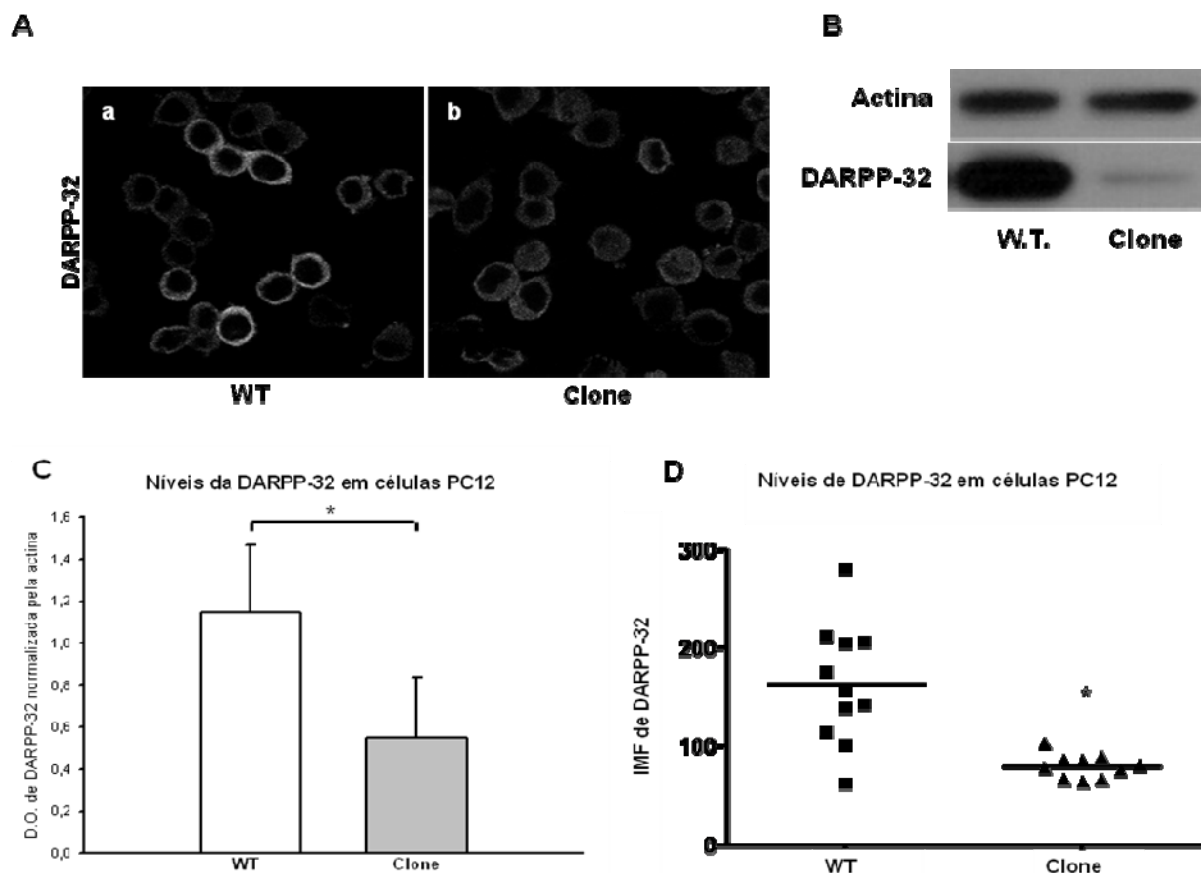


Figura 13: Diminuição dos níveis de expressão de DARPP-32 em células PC12 NCS-1.

Imagens de células PC12 WT e Clone obtidas através de microscopia confocal foram realizadas para visualização de expressão de DARPP-32. Observa-se a diminuição de expressão de DARPP-32 em células Clone (Ab) em relação às células WT (Aa). *Imunoblot* com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise de expressão de DARPP-32 (B). Quantificação da expressão das proteínas DARPP-32 foi normalizada com a expressão da actina (C). Observa-se uma diminuição significativa na expressão de DARPP-32 nas células Clone comparadas com as células WT. Análises por citometria de fluxo foram realizadas para avaliar os níveis de DARPP-32 nas células PC12. Observou-se que a intensidade média de fluorescência nas células Clone foi 50% menor que em células WT (D). Os experimentos de *Imunoblot* foram realizados em duplicata com $n=9$. O experimento de citometria de fluxo foi realizado com $n=11$. (* $p<0,01$, *t-student*, média e desvio padrão).

4.5 – ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 34 EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Sabe-se que AMPc ativa a quinase PKA (Hayes e Mayer, 1981). Após a observação de que as células Clone apresentavam menores níveis de AMPc, investigamos se os níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34, um dos sítios de fosforilação de PKA, em células Clone estariam menores que em células WT. Para verificar possíveis alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34) e consequente ativação de DARPP-32, foram realizados *imunoblots* utilizando-se anticorpos específicos anti-pDARPP-32(Thr34). Foi observado que os níveis de pDARPP-32(Thr34) estão diminuídos nas células Clone quando comparadas com células WT (FIG 14A). Análise quantitativa da fosforilação de DARPP-32 na Thr34, normalizada pela razão DARPP-32/actina, demonstrou que a diferença entre as células WT e Clone é significativa. A média dos níveis de pDARPP-32(Thr34) nas células Clone é 290% menor do que o valor da média dos níveis de NCS-1 nas células WT (FIG 14B).

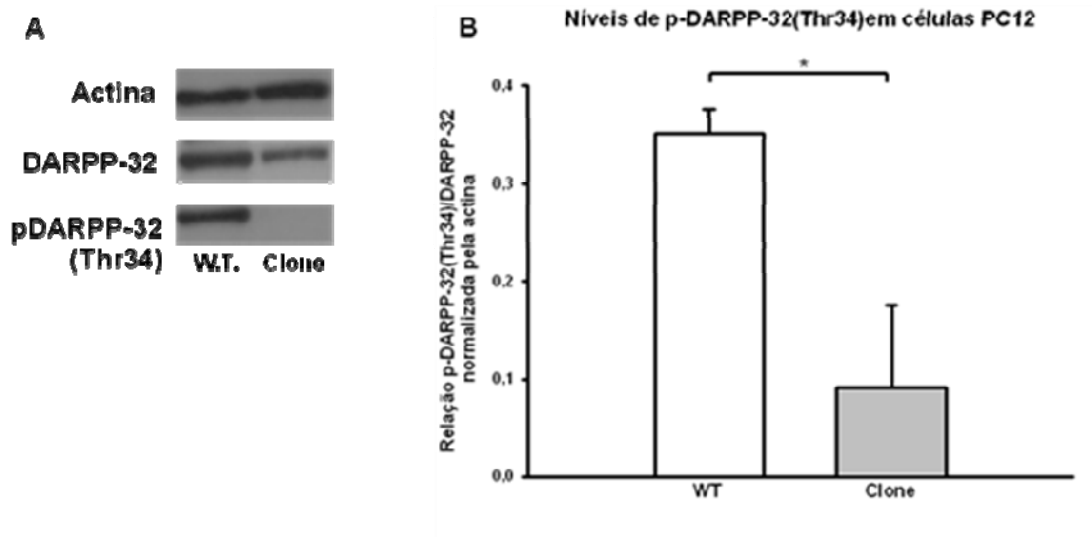


Figura 14: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone.

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de pDARPP-32(Thr34) (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32(Thr34) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina (B). Observou-se os níveis de pDARPP-32(Thr34) são 290% menor nas células Clone quando comparados com as células WT. (* $p < 0,01$; *t*-student, média e desvio padrão; N=3)

4.6 – ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE CREB NA SERINA 133 EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Outro sítio relevante de fosforilação por PKA é a Serina-133 do fator de transcrição CREB (Ofir e cols., 1991). Após a observação de que as células Clone apresentavam menores níveis de AMPc e menores níveis de pDARPP-32(Thr34), investigamos os níveis de pCREB(Ser133). Primeiramente foram verificados se os níveis de CREB total estariam alterados nas células Clone. Foram realizados *imunoblots* com anticorpo anti-CREB (FIG 15A) e, análise quantitativa da expressão de CREB, normalizada pela expressão de actina, demonstrou que não existe diferença entre as células WT e Clone (FIG 15B). Para verificar os níveis de pCREB(Ser133) nas células WT e Clone, foram realizados *imunoblots* demonstrando que células Clone têm níveis menores de pCREB(Ser133) quando comparados com células WT (FIG 15A). Análise quantitativa dos níveis de pCREB(Ser133), normalizada com a razão CREB/actina, demonstrou que a média dos níveis de pCREB(Ser133) nas células Clone é 74% menor que os níveis nas células WT (FIG 15C)

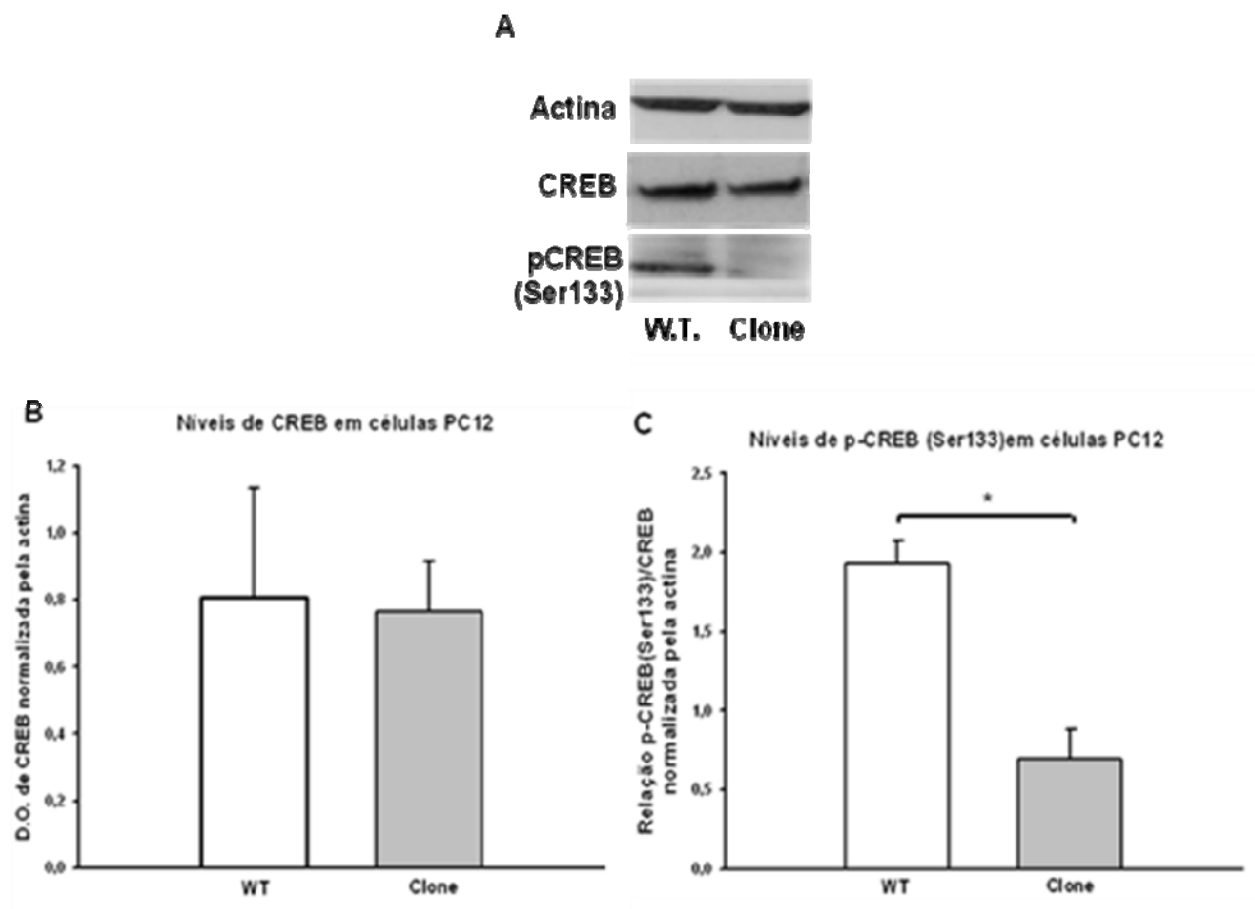


Figura 15 - Níveis de CREB e pCREB(Ser133) em células PC12 WT e Clone

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de CREB. (A). Quantificação dos níveis de CREB foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que não existe diferença nos níveis de CREB entre células WT e Clone (B). Para verificar os níveis de pCREB(Ser133) foi realizado *imunoblot* (A). Quantificação dos níveis de pCREB(Ser133) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina (C). Observou-se que os níveis de pCREB(Ser133) são 74% menor nas células Clone quando comparados com as células WT. (* $p < 0,05$, *t-student*, média, desvio padrão e $n=3$).

4.7 –NÍVEIS DE FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 75 EM CÉLULAS WT E CLONE

Foi demonstrado que os níveis de cAMP, pDARPP-32(Thr34) e pCREB(Ser133) estão reduzidos nas células Clone. Além do sítio de fosforilação na Thr34, a proteína DARPP-32 apresenta outros 3 sítios de fosforilação, sendo um destes a Thr75 que é fosforilada pela cdk5 e desfosforilada pela PP-2A. A DARPP-32, quando fosforilada na Thr75, inibe a atividade de PKA, diminuindo sua própria fosforilação na Thr34. Sabe-se que tanto NCS-1 quanto cdk5 estão envolvidos na diferenciação celular (Cheng e cols, 2001; Cheung e cols, 2007). Portanto, para verificar se a via cdk5/p35 também estaria alterada nas células Clone, verificamos se os níveis de pDARPP-32(Thr75) estariam alterados nestas células. Foram realizados *imunoblots* utilizando-se anticorpos específicos para anti-pDARPP-32(Thr75) (FIG 16A). Análise quantitativa da fosforilação de DARPP-32(Thr75), normalizada pela razão DARPP-32/actina, demonstrou que não existe diferença entre as células WT e Clone (FIG 16B).

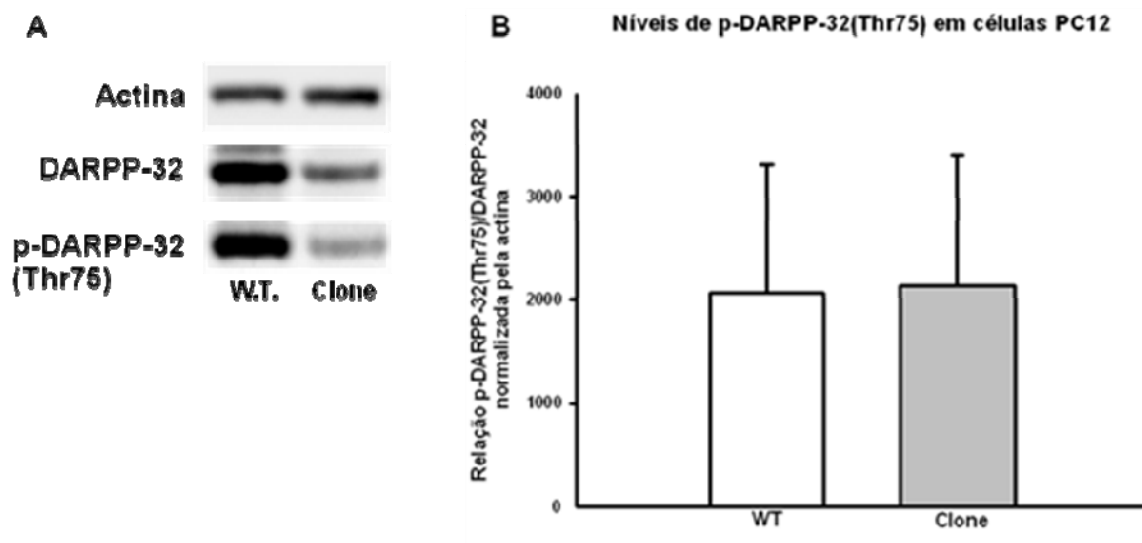


Figura 16: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 75 em células PC12 WT e Clone.

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de pDARPP-32(Thr75) (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32(Thr75) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina (B). Observou-se que não existe diferença nos níveis de pDARPP-32(Thr75) entre células Clone e células WT. ($p=0,88$; *t-student*, média e desvio padrão; $N=10$)

4.8 – EXPRESSÃO DO RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D₁ E NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE CALCYON EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE

Calcyon é uma proteína sensora de cálcio que interage com receptor dopaminérgico D₁ (Lezcano e cols., 2000) e modula seu estado de afinidade (Lidow e cols., 2001). Foi demonstrado que CPF de indivíduos com esquizofrenia e transtorno bipolar têm um aumento nos níveis de RNAm e expressão proteica de Calcyon (Koh e cols., 2003, Baracskey e cols., 2006). Portanto, para verificar a expressão endógena do receptor dopaminérgico D₁, e se existe alguma alteração nos níveis de Calcyon nas células Clone, foram realizados *imunoblots* de extratos de células WT e Clone com anticorpos anti-D₁ e anti-Calcyon (FIG 17A-B). Análise quantitativa dos níveis de Calcyon, normalizada pela expressão de actina, demonstrou que não existe diferença entre as células WT e Clone (FIG 17B).

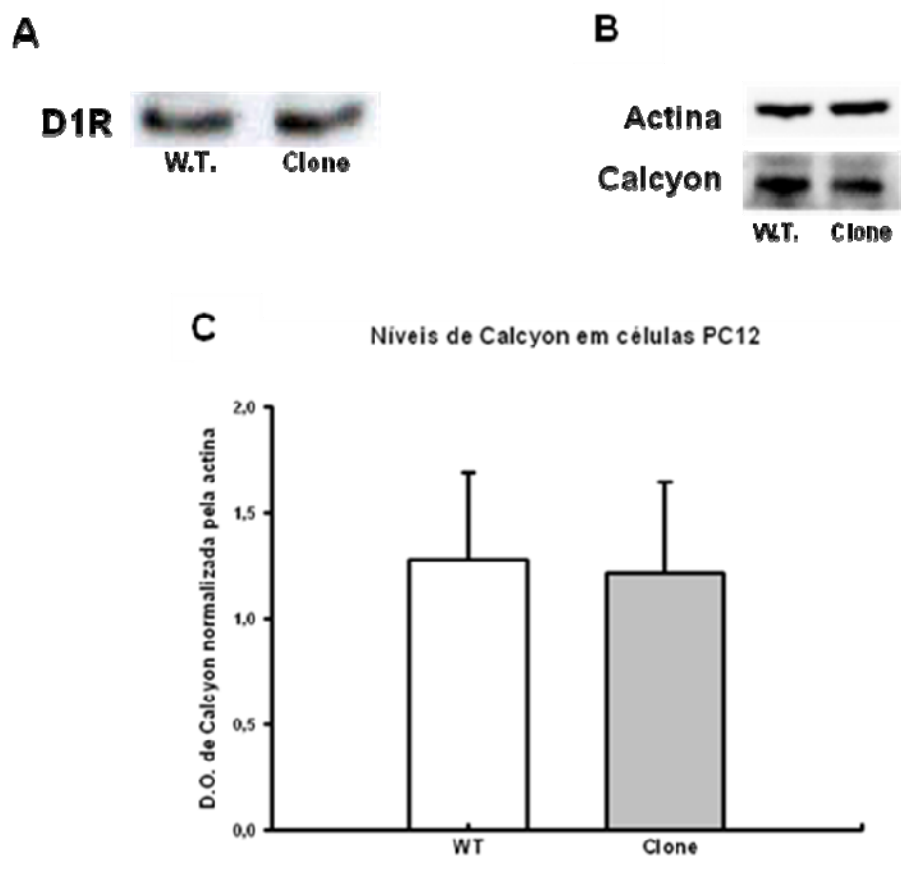


Figura 17: Níveis de Calcyon em células PC12 WT e Clone.

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de D₁ (A) e Calcyon (B). Quantificação dos níveis de Calcyon foi normalizada pela expressão de actina (C). Observou-se que não existe diferença nos níveis de Calcyon entre células Clone e células WT. ($p=0,79$; *t-student*, média e desvio padrão; N=6)

4.9 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR AMPA E FOSFORILAÇÃO DE AMPA NA SERINA 845 EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Sabe-se que pDARPP-32(Thr34), é um potente inibidor de PP-1. Um dos alvos para desfosforilação por PP-1 é a Ser845 do receptor AMPA (Greengard e cols, 2001). Após a observação de que as células Clone apresentavam menores níveis de pDARPP-32(Thr34), investigamos se os níveis de pAMPA(Ser845) também estariam alterados nas células Clone. Primeiramente foram verificados os níveis de expressão do receptor AMPA estariam alterados. Foram realizados *imunoblots* com anticorpo anti-AMPA (FIG 18A), e análise quantitativa dos resultados da expressão de AMPA, normalizada pela expressão de actina, demonstrou que não existe diferença entre as células WT e Clone (FIG 18B). Para verificar os níveis de pAMPA(Ser845) nas células WT e Clone, foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos (FIG 18A). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de pAMPA(Ser845), normalizada pela razão AMPA/actina, demonstrou existir diferença entre a média dos níveis de pAMPA(Ser845) nas células WT e Clone, porém sem diferença estatisticamente significativa (FIG 18C).

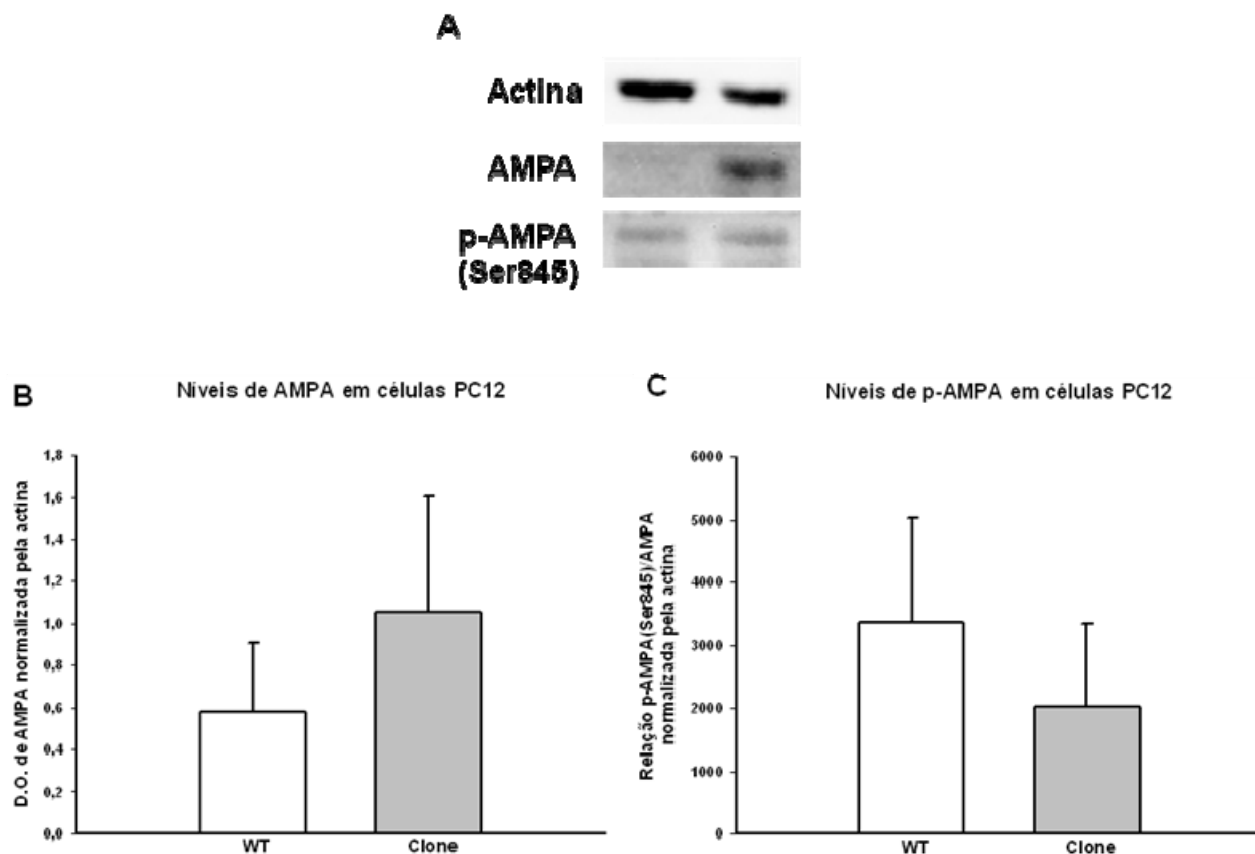


Figura 18 - Níveis de AMPA e pAMPA(Ser845) em células PC12 WT e Clone

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de AMPA. (A). Quantificação dos níveis de AMPA foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que não existe diferença nos níveis de AMPA entre células WT e Clone (B). Para verificar os níveis de pAMPA(Ser845) foi realizado *imunoblot* (A). Quantificação dos níveis de pAMPA(Ser845) foi normalizada pela razão AMPA/actina (C). Observou-se que não existe diferença nos níveis de pAMPA(Ser845) nas células Clone quando comparados com as células WT. ($p=0,22$, *t-student*, média, desvio padrão e $n=4$).

4.10 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE AKT E FOSFORILAÇÃO DE AKT NA SERINA 473 EM CÉLULAS PC12 SUPEREXPRESSANDO NCS-1

Dois trabalhos demonstraram que NCS-1 não altera a fosforilação de Akt na Ser473 (Mora e cols, 2002; Kapp-Barnea e cols 2006). Já Nakamura e cols (2006) demonstraram que NCS-1 aumenta os níveis de fosforilação de Akt em cultura primária de neurônios corticais. Nair & Sealfon (2003) também demonstraram que a estimulação de D₂ por bromocriptina leva a ativação de PI3K através de c-Src e, consequentemente, a fosforilação de Akt na Serina 473, inibindo a apoptose induzida por H₂O₂. Após a observação de alterações na sinalização da via AMPc/PKA nas células Clone, investigamos se a via mediada por Akt também estaria alterada nas mesmas. Foram realizados *imunoblots* com anticorpo anti-Akt1 (FIG 19A), e análise quantitativa de resultados da expressão de Akt1, normalizada pela expressão de actina, demonstrou que não existe diferença entre as células WT e Clone (FIG 19B). Para verificar os níveis de pAkt(Ser473) nas células WT e Clone, foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos (FIG 19A). Análise quantitativa de resultados parciais dos níveis de pAkt(Ser473), normalizada através da razão Akt/actina, demonstrou não existir diferença entre a média dos níveis de pAkt(473) nas células Clone e células WT (FIG 19C).

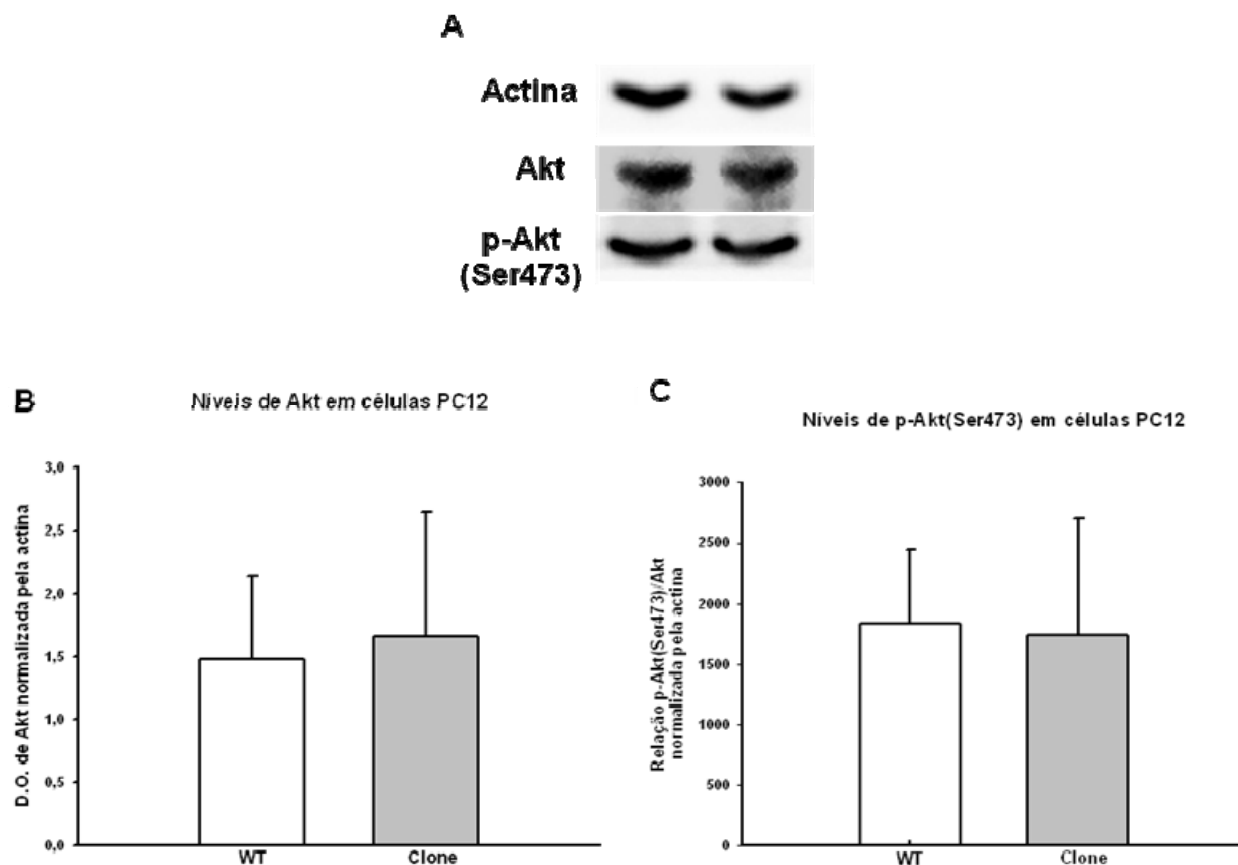


Figura 19 - Níveis de Akt e pAkt(Ser473) em células PC12 WT e Clone

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de Akt1. (A). A quantificação dos níveis de Akt foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que não existe diferença nos níveis de Akt1 entre células WT e Clone (B). Para verificar os níveis de pAkt(Ser473) foi realizado *Imunoblot* (A). Quantificação dos níveis de pAkt(Ser473) foi normalizada pela razão Akt1/actina (C). Observou-se que não existe diferença nos níveis de pAkt(473) nas células Clone quando comparados com as células WT. ($p > 0,8$, *t-student*, média, desvio padrão e $n=7$).

4.11 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 34 EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE TRATADAS 5 MINUTOS COM QUINPIROLE

NCS-1 interage com receptores dopaminérgicos D₂, inibindo sua internalização induzida por agonistas (Kabbani e cols, 2002). Apesar de observarmos uma diminuição da ativação da via AMPc/PKA, não encontramos aumento nos níveis de receptores expostos na membrana celular (FIG 11C). Porém, para investigarmos se existe diferença entre células WT e Clone, na resposta à estimulação da sinalização dopaminérgica do receptor D₂, células PC12 WT e Clone foram tratadas por 5 minutos com Quinpirole (agonista específico de D₂) nas concentrações 0,5µM, 1,0µM, 2,5µM, 5,0µM, 10,0µM, 25µM e 50,0µM. Para análise da resposta ao tratamento, foi investigado os níveis de pDARPP-32(Thr34). Foram realizados *immunoblots* com anticorpos específicos anti-DARPP-32 e anti-pDARPP-32(Thr34). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que tratamento com Quinpirole não altera a expressão de DARPP-32 (FIG 20A-B). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de pDARPP-32(Thr34) normalizada pela razão DARPP-32/Actina demonstrou ausência na alteração dos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34 (FIG 20C-D) após tratamento das células PC12 com Quinpirole por 5 minutos.

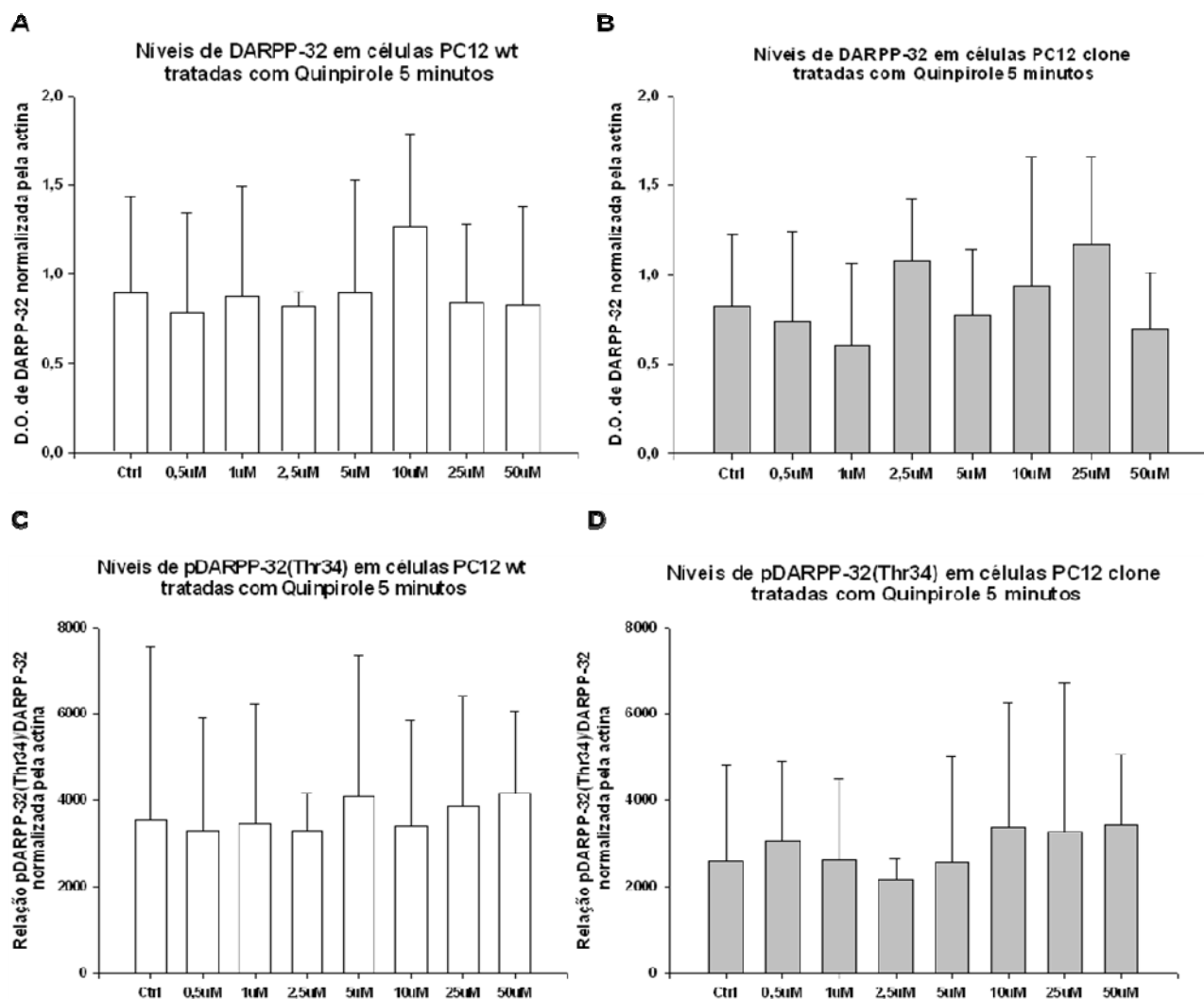


Figura 20: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas 5 minutos com diversas concentrações de Quinpirole

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de DARPP-32 e pDARPP-32(Thr34). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 após tratamento com Quinpirole em diversas concentrações, por 5 minutos (A-B). Quantificação dos níveis de pDARPP-32(Thr34) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) após tratamento com Quinpirole em diversas concentrações, por 5 minutos (C-D). ($p > 0,2$, one way ANOVA, média, desvio padrão e $n=8$).

4.12 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 34 EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE TRATADAS COM QUINPIROLE 1 μ M

Não foi observado alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34), tanto em células WT quanto em células Clone, tratadas com Quinpirole por 5 minutos em diversas concentrações (FIG 20). Para investigar a necessidade de um tempo maior para alteração da fosforilação de DARPP-32 na Thr34 com o tratamento com Quinpirole, células PC12 WT e Clone foram tratadas com Quinpirole 1 μ M por 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos e 1 hora. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-DARPP-32 e anti-pDARPP-32(Thr34). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que tratamento com Quinpirole 1 μ M por diversos períodos de tempo não altera a expressão de DARPP-32 (FIG 21A-B). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de pDARPP-32(Thr34) normalizada pela razão DARPP-32/Actina demonstrou ausência na alteração dos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34 após tratamento das células PC12 com Quinpirole 1 μ M por diversos períodos de tempo (FIG 21C-D).

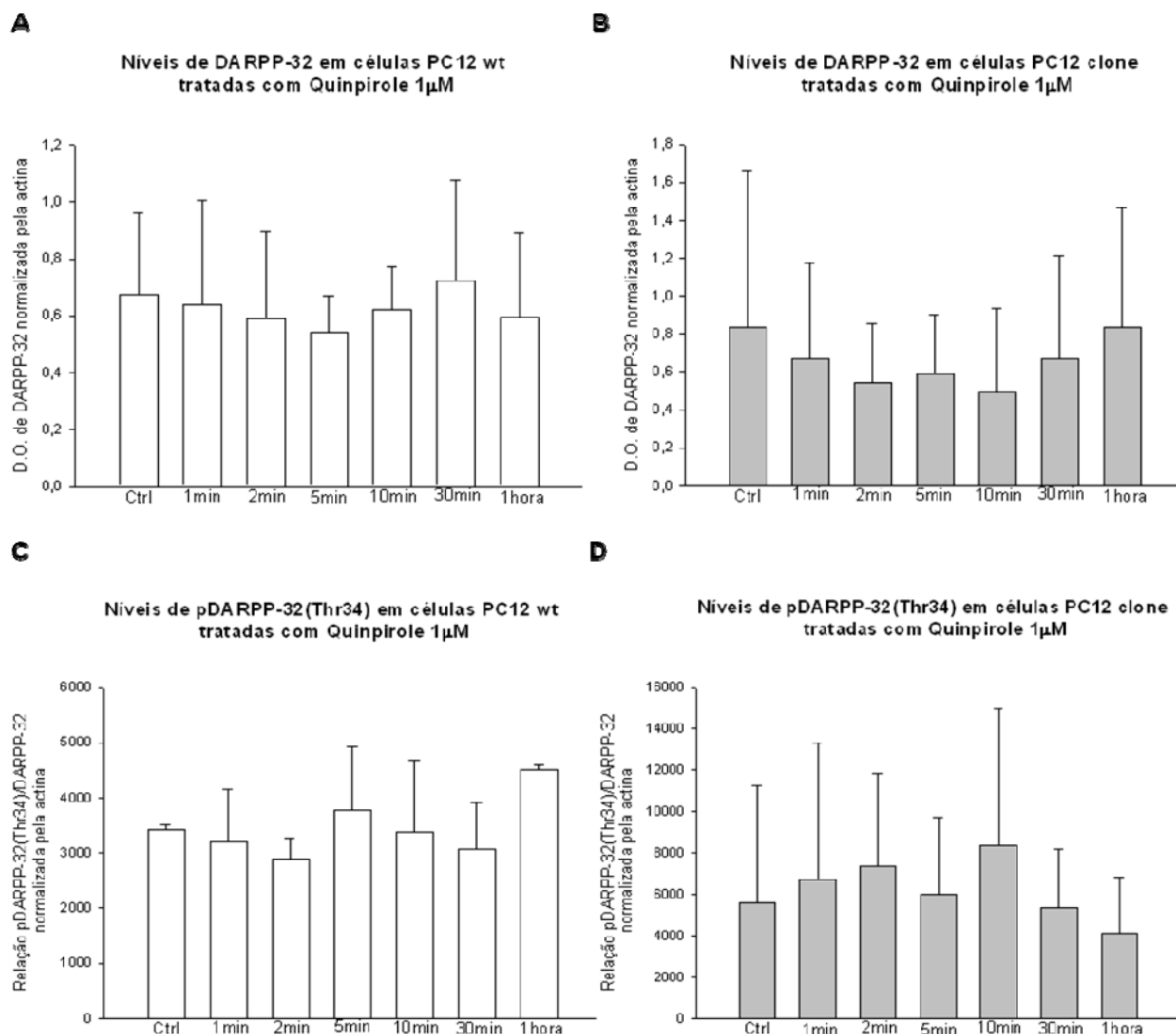


Figura 21: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas com Quinpirole 1µM por diversos períodos de tempo

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de DARPP-32 e pDARPP-32(Thr34). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 após tratamento com Quinpirole 1µM por diversos períodos de tempo (A-B). Quantificação dos níveis de pDARPP-32(Thr34) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) após tratamento com Quinpirole 1µM em diversos períodos de tempo (C-D). (média, desvio padrão e n=2).

4.13 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 34 EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE TRATADAS 5 MINUTOS COM RACLOPRIDE

Não foram observadas alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34), tanto em células WT quanto em células Clone, tratadas com Quinpirole em diversas concentrações por 5 minutos (FIG 20) e Quinpirole 1 μ M por diversos períodos de tempo (FIG 21). Para investigarmos se existe diferença entre células WT e Clone, na resposta à inibição da sinalização dopaminérgica do receptor D₂, células PC12 WT e Clone foram tratadas por 5 minutos com Raclopride (antagonista específico de D₂) 0,5 μ M, 1,0 μ M e 5 μ M. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-DARPP-32 e anti-pDARPP-32(Thr34). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que tratamento por 5 minutos com Raclopride 0,5 μ M, 1,0 μ M e 5 μ M não altera a expressão de DARPP-32 (FIG 22A-B). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de pDARPP-32(Thr34) normalizada pela razão DARPP-32/Actina demonstrou ausência na alteração dos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34 após tratamento das células PC12 por 5 minutos com Raclopride 0,5 μ M, 1,0 μ M e 5 μ M (FIG 22C-D).

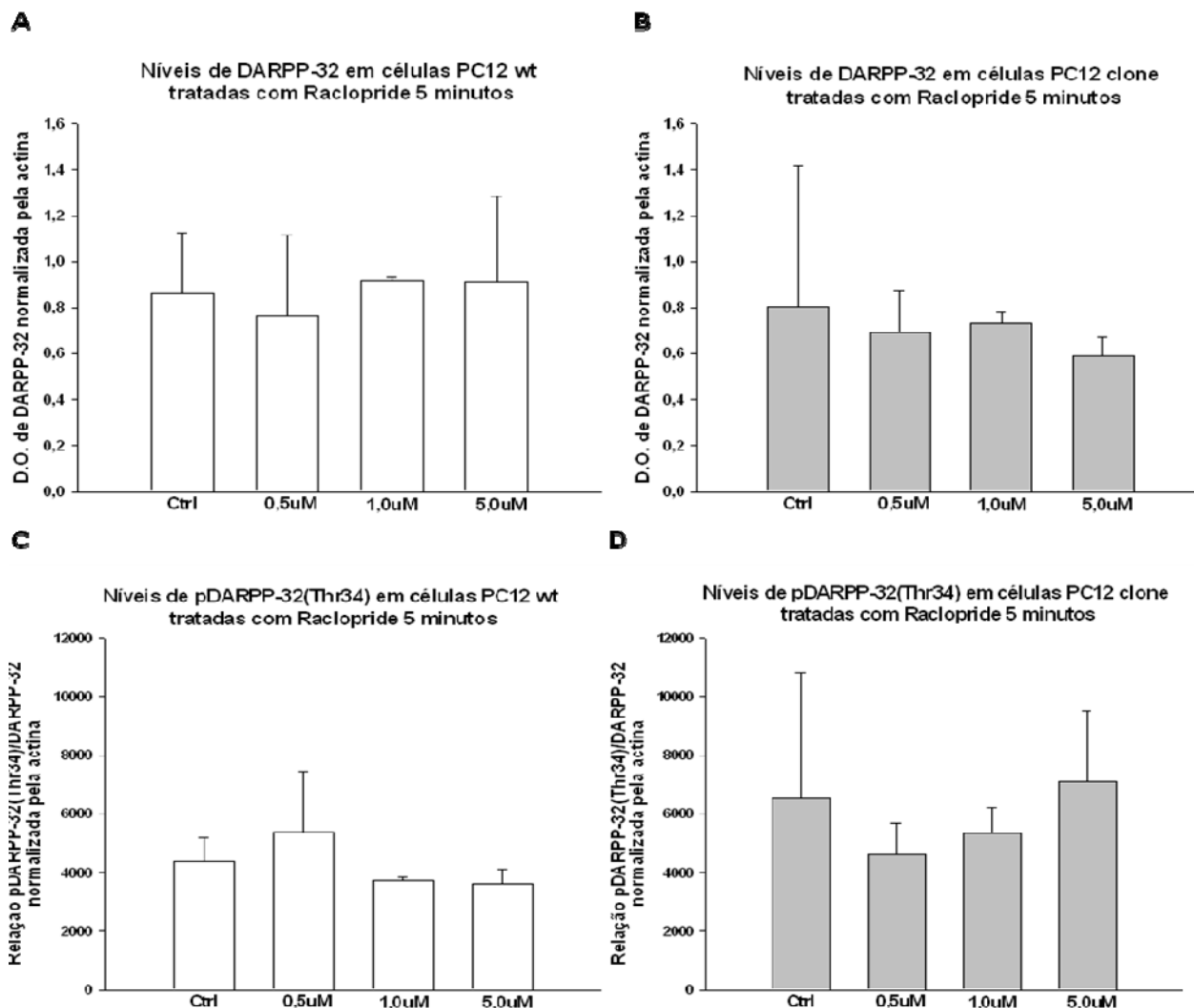


Figura 22: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas 5 minutos com diferentes concentrações de Raclopride

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de DARPP-32 e pDARPP-32(Thr34). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 após tratamento por 5 minutos com Raclopride em diversas concentrações (A-B). Quantificação dos níveis de pDARPP-32(Thr34) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) após tratamento por 5 minutos com Raclopride em diversas concentrações (C-D). (média, desvio padrão e n=2).

4.14 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 34 EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE TRATADAS 10 MINUTOS COM HALOPERIDOL

Não foram observadas alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34), tanto em células WT quanto em células Clone, tratadas com Quinpirole em diversas concentrações por 5 minutos (FIG 20), Quinpirole 1 μ M por diversos períodos de tempo (FIG 21) e Raclopride (FIG 22) em diversas concentrações por 5 minutos. Para investigarmos se existe diferença entre células WT e Clone, na resposta à inibição da sinalização dopaminérgica do receptor D₂ com antipsicótico típico, células PC12 WT e Clone foram tratadas por 10 minutos com Haloperidol 0,5 μ M, 1,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M e 25,0 μ M. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-DARPP-32 e anti-pDARPP-32(Thr34). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que tratamento por 10 minutos com Haloperidol 0,5 μ M, 1,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M e 25,0 μ M não altera a expressão de DARPP-32 (FIG 23A-B). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de pDARPP-32(Thr34) normalizada pela razão DARPP-32/Actina demonstrou ausência na alteração dos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34 após tratamento das células PC12 por 10 minutos com Haloperidol 0,5 μ M, 1,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M e 25,0 μ M (FIG 23C-D).

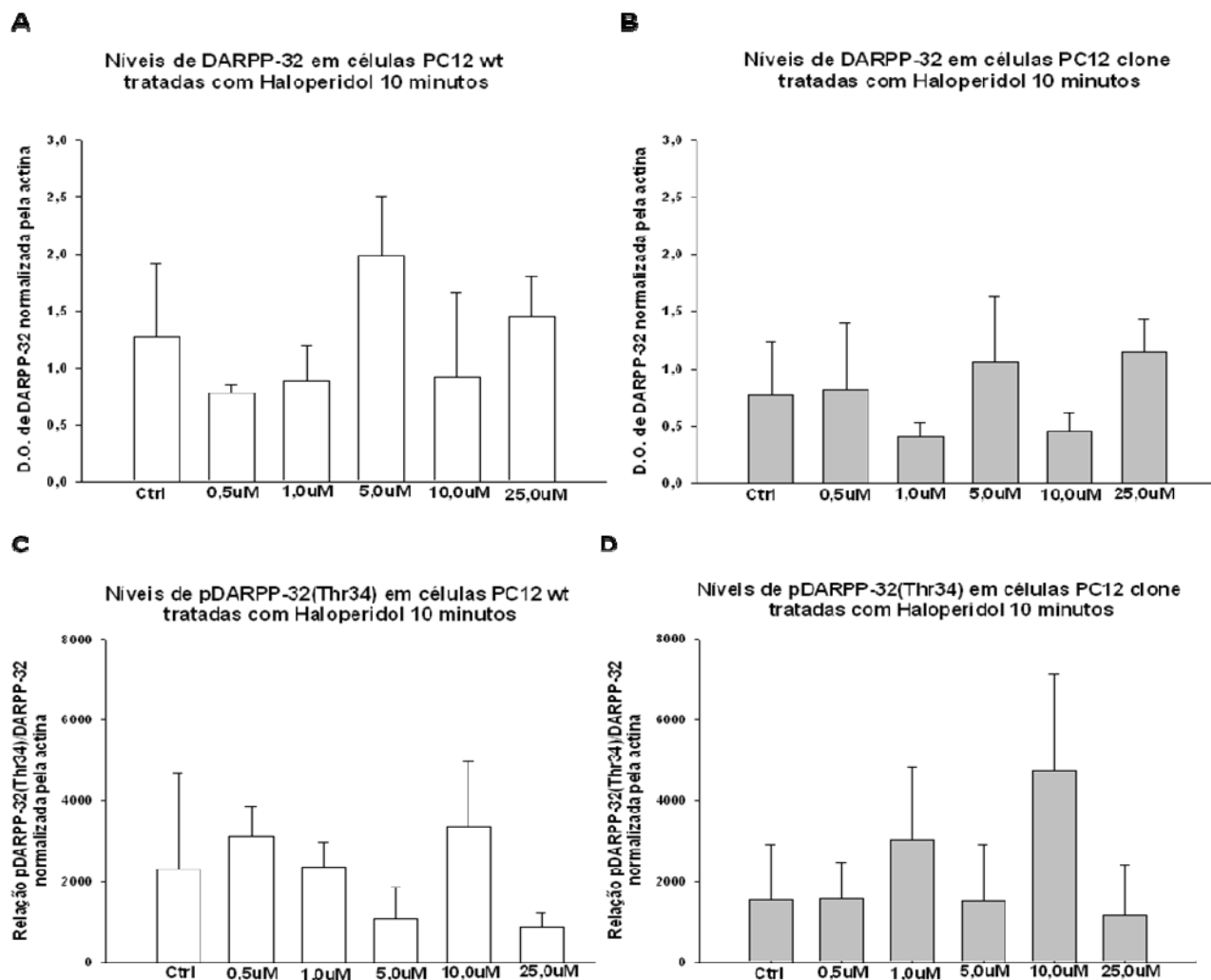


Figura 23: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas 10 minutos com diferentes concentrações de Haloperidol

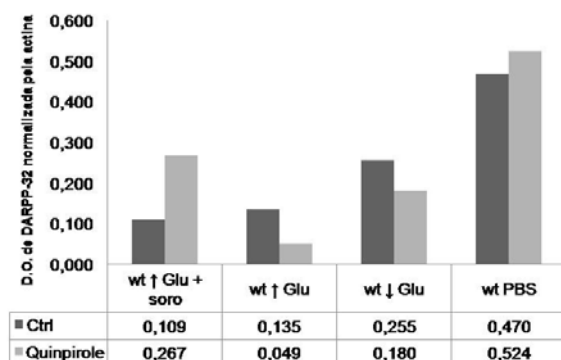
Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de DARPP-32 e pDARPP-32(Thr34). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 após tratamento por 10 minutos com Haloperidol em diversas concentrações (A-B). Quantificação dos níveis de pDARPP-32(Thr34) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) após tratamento por 10 minutos com Haloperidol em diversas concentrações (C-D). ($p > 0,1$, One way ANOVA, média, desvio padrão e $n=4$).

4.15 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E FOSFORILAÇÃO DE DARPP-32 NA TREONINA 34, EM CÉLULAS PC12 WT SUBMETIDAS À 1 HORA 30 MINUTOS DE STARVING, TRATADAS 5 MINUTOS COM 5 μ M DE QUINPIROLE, RACLOPRIDE, HALOPERIDOL E SCH-23390

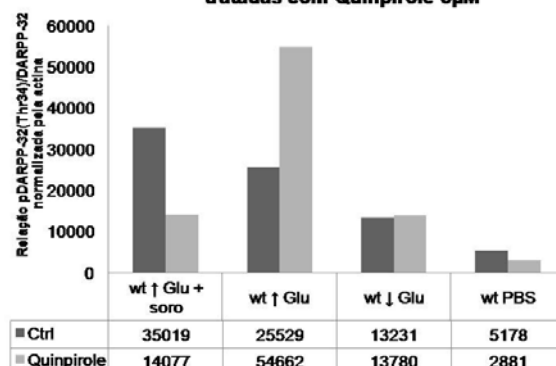
Não foram observadas alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34), tanto em células WT quanto em células Clone, tratadas com Quinpirole em diversas concentrações por 5 minutos (FIG 20), Quinpirole 1 μ M por diversos períodos de tempo (FIG 21), Raclopride em diversas concentrações por 5 minutos (FIG 22) e Haloperidol em diversas concentrações por 10 minutos. Para investigarmos se diferentes meios de cultura, os quais as células PC12 são mantidas, alteram as respostas aos tratamentos com agonistas e antagonistas específicos, células PC12 WT foram submetidas ao *starving* por 1 hora e 30 minutos em meio DMEM alta glicose sem soro, DMEM baixa glicose sem soro e PBS. Após *starving* as células foram tratadas 5 minutos com 5 μ M de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390 (antagonista específico de D₁). Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-DARPP-32 e anti-pDARPP-32(Thr34). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que após 1 hora e 30 minutos de *starving*, tratamento com 5 μ M de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390 por 5 minutos não altera a expressão de DARPP-32 (FIG 24A-C-E-G). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de pDARPP-32(Thr34) normalizada pela razão DARPP-32/Actina demonstrou inconsistência na alteração dos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34 após tratamento das células PC12 por 5 minutos com 5 μ M de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390 (FIG 24B-D-F-H).

A

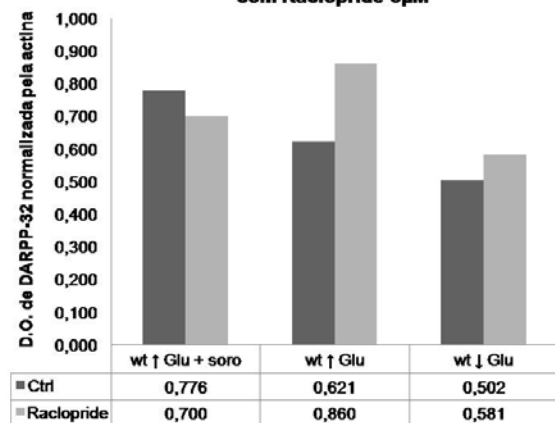
Níveis de DARPP-32 em células PC12 wt tratadas com Quinpirole 5 μ M

**B**

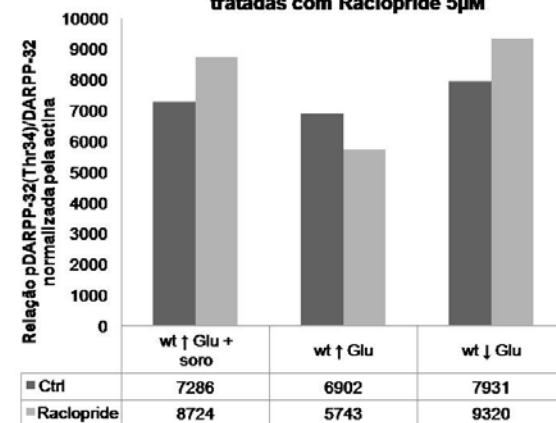
Níveis de pDARPP-32(Thr34) em células PC12wt tratadas com Quinpirole 5 μ M

**C**

Níveis de DARPP-32 em células PC12 wt tratadas com Raclopride 5 μ M

**D**

Níveis de pDARPP-32(Thr34) em células PC12 wt tratadas com Raclopride 5 μ M



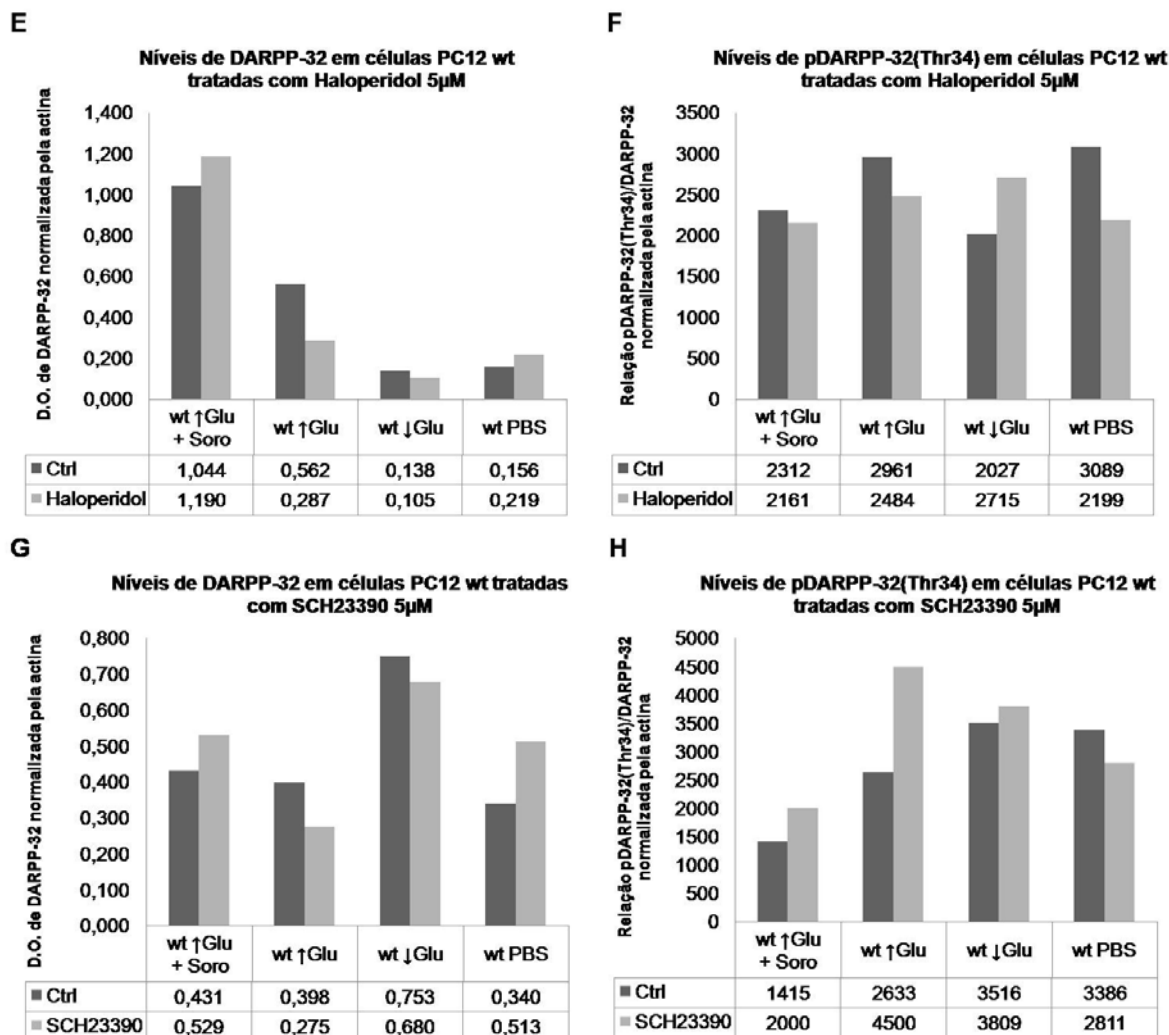


Figura 24 - Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT submetidas à 1 hora 30 minutos de starving, tratadas 5 minutos com 5µM de quinpirole, raclopride, haloperidol e sch-23390

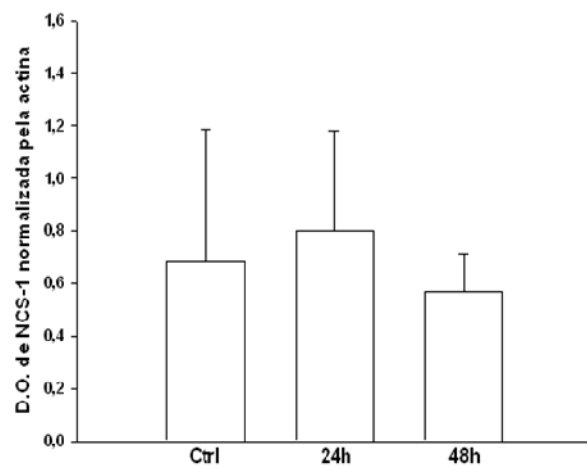
Imunoblot com extratos de células WT foram realizados para análise dos níveis de DARPP-32 e pDARPP-32(Thr34). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que nas células WT não ocorre alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 em células tratadas 5 minutos com 5µM de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390 após *starving* de 1 hora e 30 minutos(A-C-E-G). Quantificação dos níveis de pDARPP-32(Thr34) foi normalizada pela razão DARPP-32/actina. Observou-se inconsistência nas alterações nos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34 de células WT tratadas por 5 minutos com 5µM de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390 após *starving* de 1 hora e 30 minutos (B-D-F-H). (n=1).

4.16 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE TRATADAS COM FORSKOLIN 5 μ M E 10 μ M

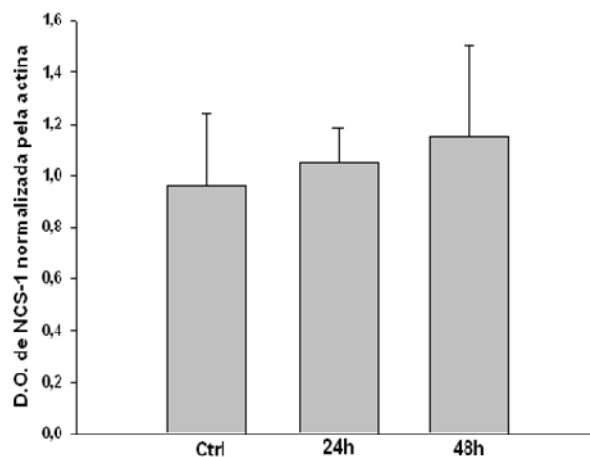
É bem conhecido que antipsicóticos típicos são potentes antagonistas do receptor dopaminérgico D₂. Para verificar se o aumento da atividade da via AMPc/PKA por tempo prolongado alteraria expressão proteica de NCS-1 e DARPP-32, células PC12 WT e Clone foram tratadas com Forskolin 5 μ M e 10 μ M por 24 e 48 horas. Para análise sobre a influência da via AMPc/PKA na expressão de DARPP-32 e NCS-1, foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que tratamento de células PC12 WT e Clone com tanto com Forskolin 5 μ M (FIG 25A-B) quanto 10 μ M (FIG 25E-F) por 24 horas e 48 horas não altera a expressão de NCS-1. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que tratamento de células PC12 WT e Clone com Forskolin 5 μ M (FIG 25C-D) e 10 μ M (FIG 25G-H) por 24 horas e 48 horas não alteram a expressão de DARPP-32.

A

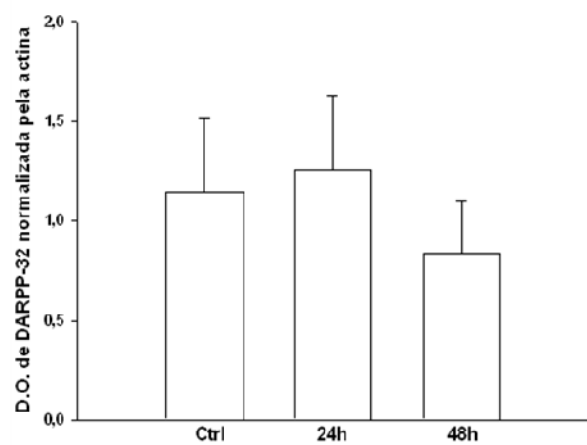
Níveis de NCS-1 em células PC12 wt tratadas com forskolin 5 μ M

**B**

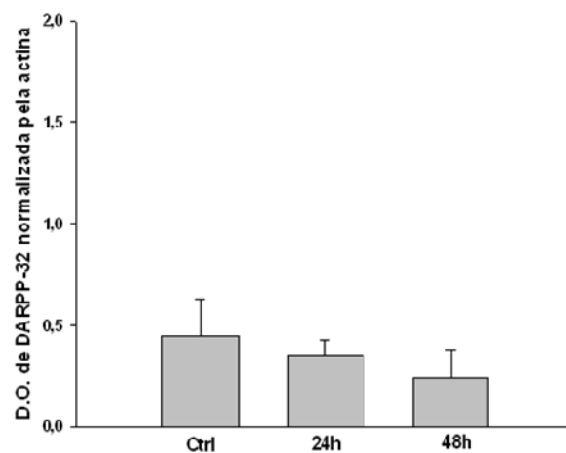
Níveis de NCS-1 em células PC12 clone tratadas com forskolin 5 μ M

**C**

Níveis de DARPP-32 em células PC12 wt tratadas com forskolin 5 μ M

**D**

Níveis de DARPP-32 em células PC12 clone tratadas com forskolin 5 μ M



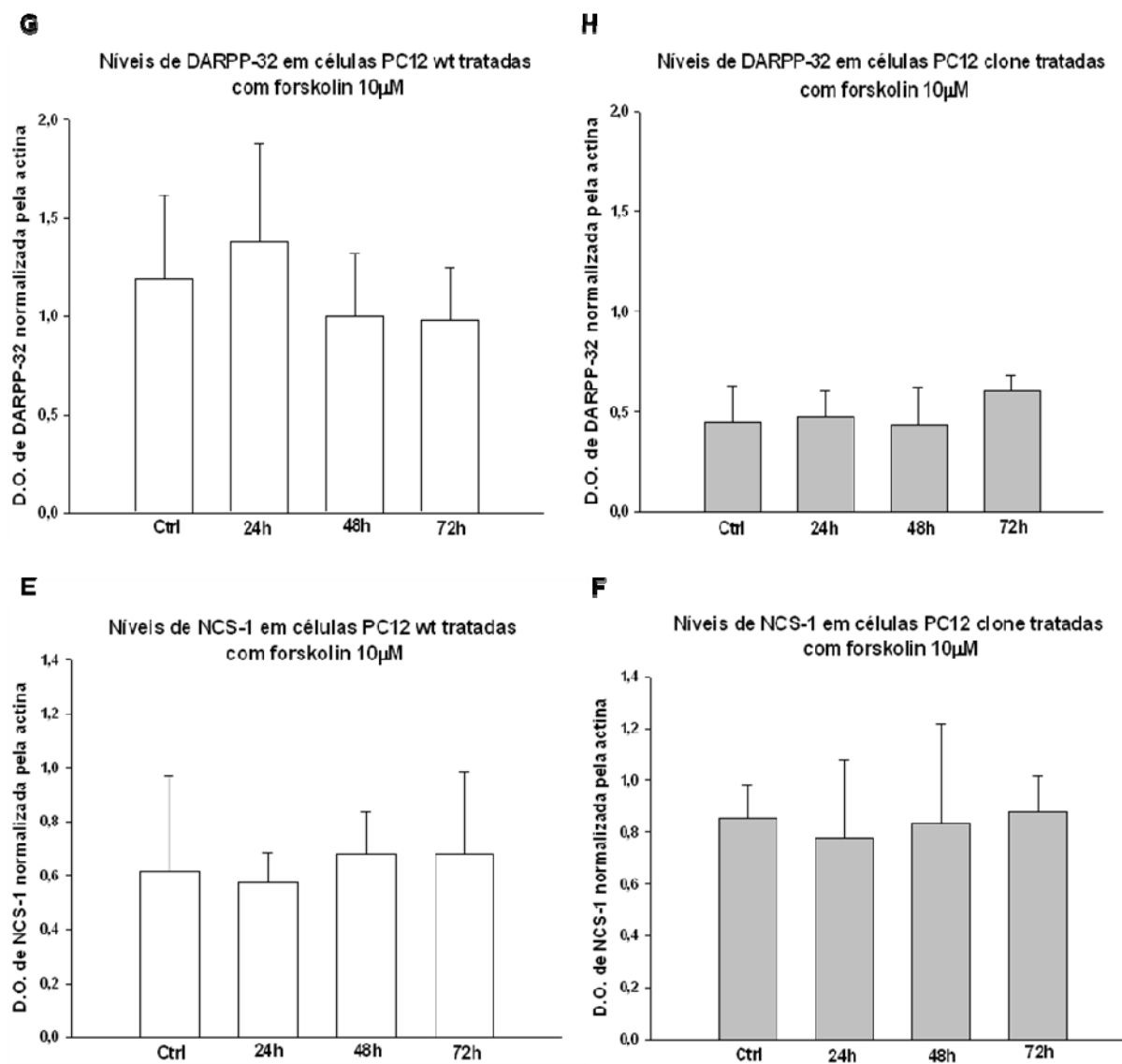


Figura 25: Níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 em células PC12 WT e Clone tratadas com Forskolin 5 μ M e 10 μ M por 24 e 48 horas

Imunoblot com extratos de células WT e Clone foram realizados para análise dos níveis de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 após 24 horas e 48 horas de tratamento Forskolin 5 μ M e 10 μ M (A-B-E-F). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pela actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de DARPP-32 após 24 horas e 48 horas de tratamento com Forskolin 5 μ M e 10 μ M (C-D-G-H). ($p > 0,1$, one way ANOVA, média, desvio padrão e $n=6$).

4.17 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 EM CÉLULAS PC12 WT E CLONE TRATADAS 14 DIAS COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS

Estudos recentes demonstraram um aumento dos níveis de NCS-1 (Bai e *cols.*, 2004; Koh e *cols.*, 2003) e redução de DARPP-32 (Albert e *cols.*, 2002; Ishikawa e *cols.*, 2007) no CPF de esquizofrênicos e bipolares. Para investigar se tratamento crônico com antipsicóticos típicos e atípicos alteram expressão de NCS-1 e DARPP-32, células PC12 WT e Clone foram tratadas com Haloperidol 1,0 μ M, 10,0 μ M e 20,0 μ M, Risperidona 20,0 μ M e Clozapina 20,0 μ M, por 14 dias. Para análise da expressão de NCS-1 e DARPP-32, foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que tratamento de células PC12 WT e Clone com antipsicóticos típicos e atípicos por 14 dias não alteram os níveis de expressão de NCS-1 (FIG 26A-B). Análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina demonstrou que tratamento de células PC12 WT e Clone com antipsicóticos típicos e atípicos por 14 dias não alteram os níveis de expressão de DARPP-32 (FIG 26C-D).

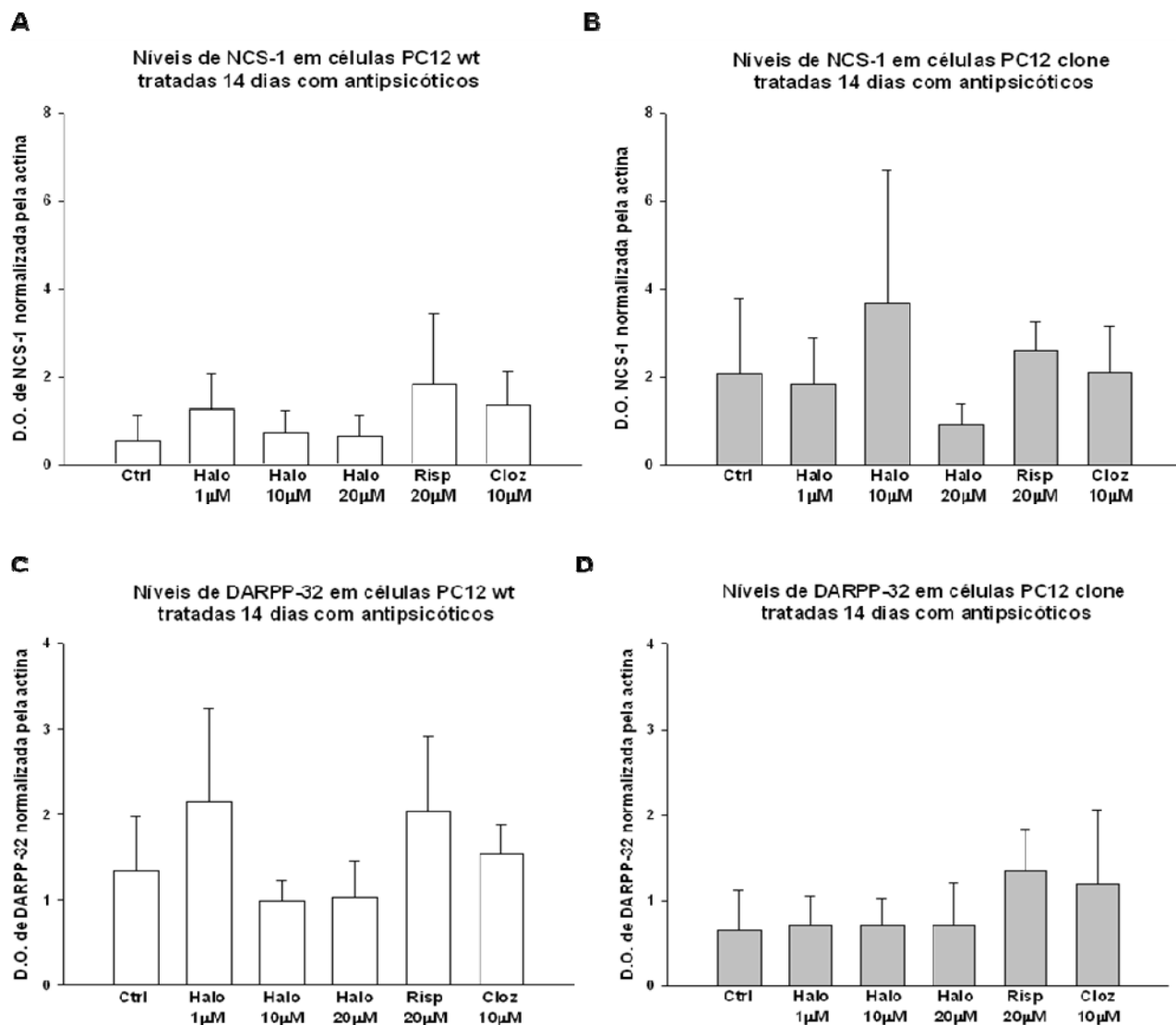


Figura 26: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 células PC12 WT e Clone tratados com Haloperidol 1μM, 10μM e 20μM, Risperidona 20μM e Clozapina 20μM por 14 dias.

Foram realizados *imunoblots* para análise dos níveis de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 após 14 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos (A-B). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pela actina. Observou-se que, tanto nas células WT quanto nas células Clone, não ocorre alteração nos níveis de DARPP-32 após 14 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos (C-D). ($p > 0,1$, one way ANOVA, média, desvio padrão e $n=3$).

4.18 –CONTROLE PARA INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 EM RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS POR 28 DIAS

Foi observado que, em experimento *in vitro*, células PC12 WT e Clone tratadas com antipsicóticos típicos e atípicos por 14 dias não apresentam alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 26). Para verificar se ocorre alteração nos níveis de expressão proteica de NCS-1 e DARPP-32 em animais tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, ratos *Wistar* receberam, intraperitonealmente, injeções de HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 ou 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) por 28 dias. Foram analisadas a expressão de NCS-1 e DARPP-32 em cinco diferentes regiões cerebrais: córtex pré-frontal, *hippocampus*, *striatum*, córtex e *cerebellum*. Os fármacos HAL, CLO, OLZ e Ari foram solubilizados em solução salina Tween1%, portanto, para controle experimental, foi analisado se existe alteração nos níveis de NCS-1 e DARPP-32 no cérebro de ratos tratados com solução salina e solução salina Tween1%. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de NCS-1 no cérebro de ratos submetidos a solução salina e solução salina Tween1% (FIG 27A). *Imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina também demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de DARPP-32 no cérebro de ratos submetidos a solução salina e solução salina Tween1% (FIG 27B).

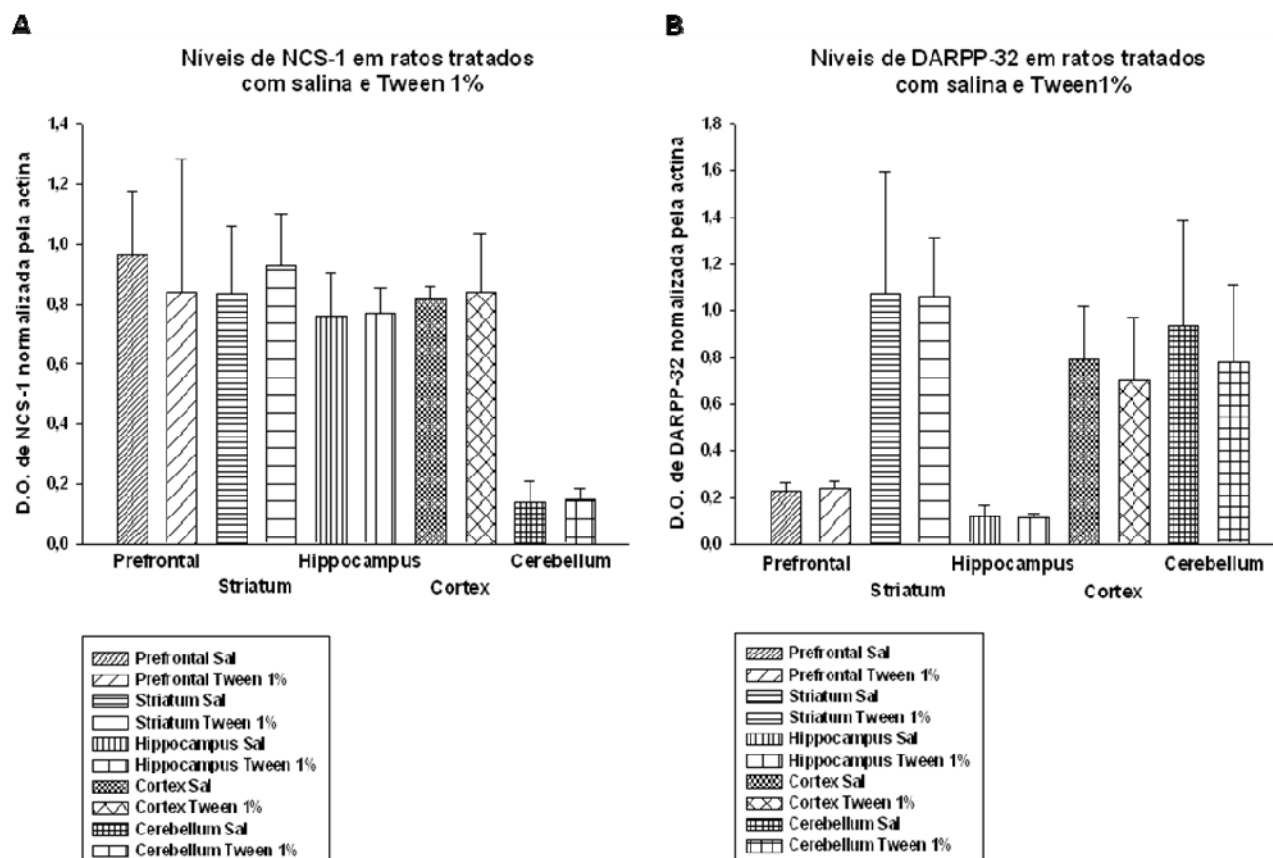


Figura 27: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 no córtex pré-frontal, hipocampo, striatum, córtex e cerebelum de ratos Wistar submetidos a injeções i.p. de solução salina e solução salina Tween1%.

Foram realizados *imunoblots* para análise controle dos níveis de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de NCS-1 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que ratos submetidos a 28 dias de injeções i.p. de solução salina Tween1% não tem alteração nos níveis de expressão de NCS-1 (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que ratos submetidos a 28 dias de injeções i.p. de solução salina Tween1% não tem alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 (A). ($p > 0,7$, *t student*, média, desvio padrão e $n=3$)

4.19 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS POR 28 DIAS

Foi demonstrado que células PC12 WT e Clone tratadas com antipsicóticos típicos e atípicos por 14 dias não apresentam alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 26). Para verificar se ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 no córtex pré-frontal de ratos tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, ratos *Wistar* receberam, intraperitonealmente, injeções de SAL, HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 or 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) por 28 dias. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-NCS-1 e anti-DARPP-32. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de NCS-1 no córtex pré-frontal de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias (FIG 28A). *Imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina também demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de DARPP-32 no córtex pré-frontal de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos (FIG 28B).

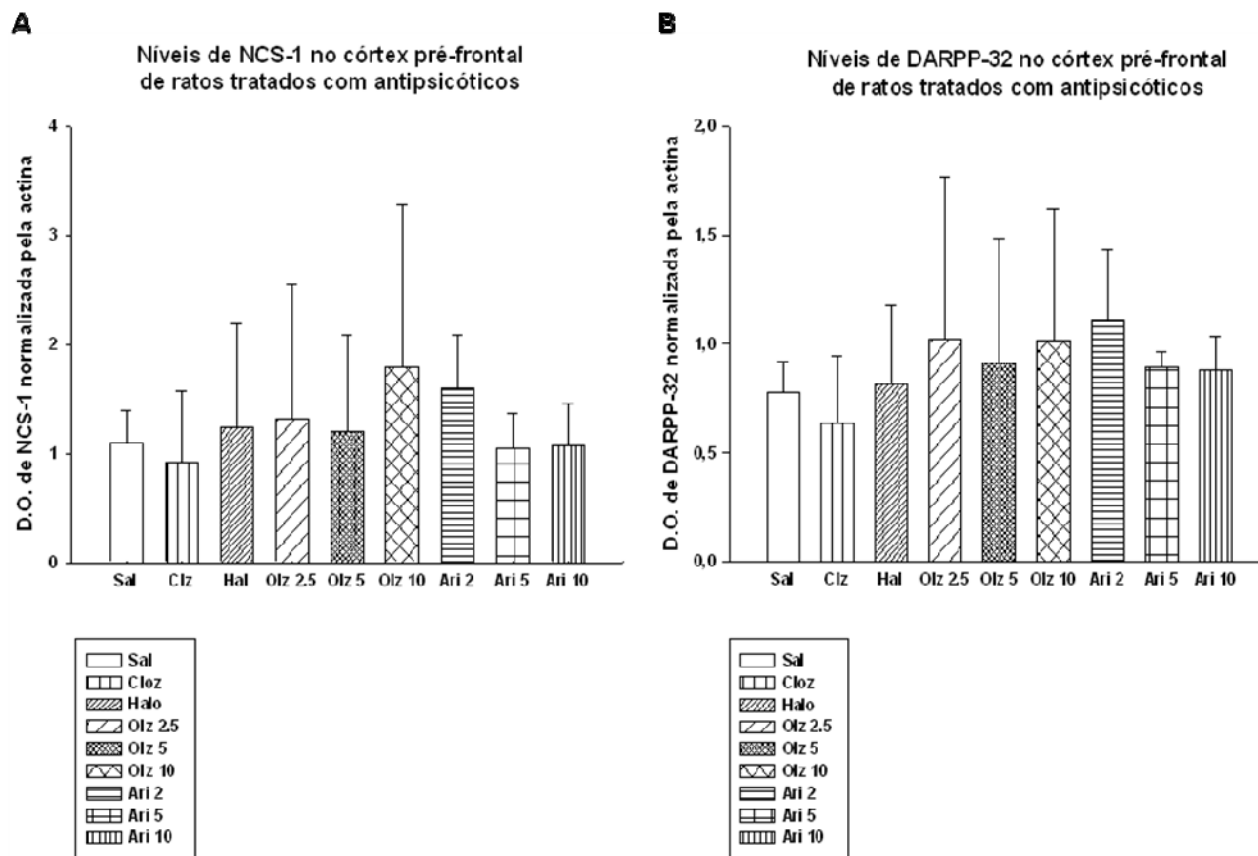


Figura 28: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 no córtex pré-frontal de ratos *Wistar* submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos.

Foram realizados *imunoblots* para análise de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de NCS-1 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de NCS-1 (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 (B). ($p > 0,1$, One Way ANOVA, média, desvio padrão e $n=6$)

4.20 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 NO HIPPOCAMPUS DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS POR 28 DIAS

Foi demonstrado que o córtex pré-frontal de ratos *wistar* tratados com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias não apresentam alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 28). Para verificar se ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 no *hippocampus* de ratos tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, ratos *Wistar* receberam, intraperitonealmente, injeções de SAL, HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 or 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) por 28 dias. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-NCS-1 e anti-DARPP-32. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de NCS-1 no *hippocampus* de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias (FIG 29A). *Imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina também demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de DARPP-32 no *hippocampus* de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos (FIG 29B).

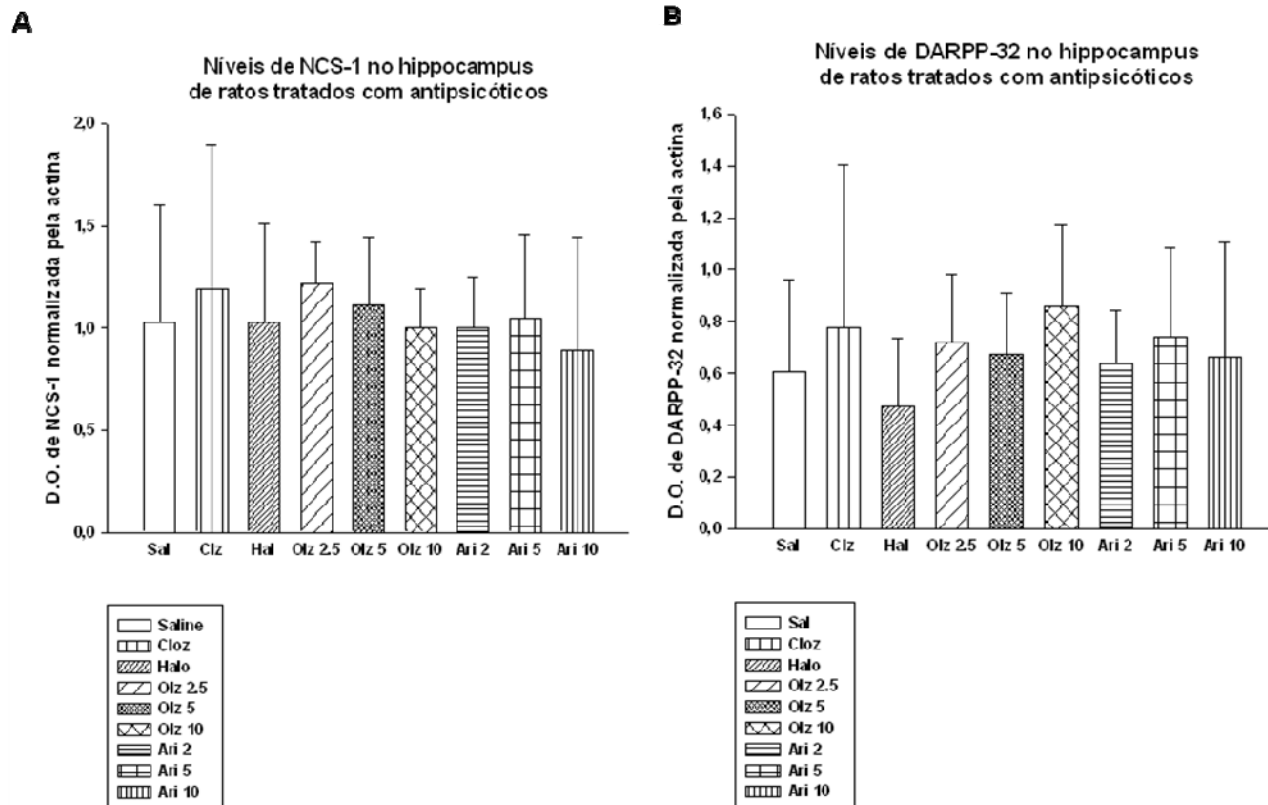


Figura 29: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em *hippocampus* de ratos *Wistar* submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos.

Foram realizados *imunoblots* para análise de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de NCS-1 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que *hippocampus* de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de NCS-1 (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que *hippocampus* de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 (B). ($p > 0,1$, One Way ANOVA, média, desvio padrão e $n=6$)

4.21 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 NO STRIATUM DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS POR 28 DIAS

Foi demonstrado que o córtex pré-frontal e *hippocampus* de ratos *wistar* tratados com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias não apresentam alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 28-29). Para verificar se ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 no *striatum* de ratos tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, ratos *Wistar* receberam, intraperitonealmente, injeções de SAL, HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 or 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) por 28 dias. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-NCS-1 e anti-DARPP-32. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de NCS-1 no *striatum* de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias (FIG 30A). *Imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina também demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de DARPP-32 no *striatum* de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos (FIG 30B).

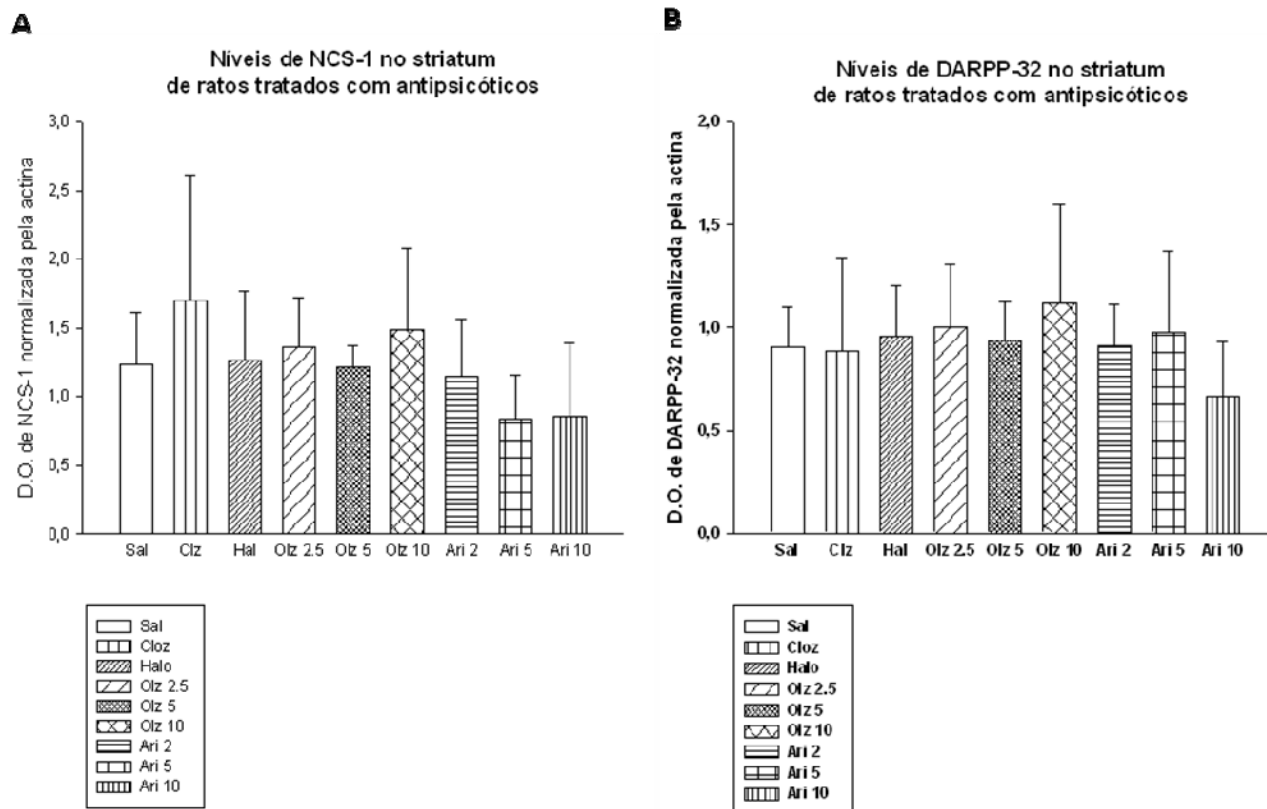


Figura 30: Níveis de NCS-1 e DARPP_32 em *striatum* de ratos *Wistar* submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos.

Foram realizados *immunoblots* para análise de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de NCS-1 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que *striatum* de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de NCS-1 (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que *striatum* de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 (B). ($p > 0,1$, One Way ANOVA, média, desvio padrão e $n=6$)

4.22 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 NO CÓRTEX RESTANTE DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS POR 28 DIAS

Foi demonstrado que o córtex pré-frontal, *hippocampus* e *striatum* de ratos *wistar* tratados com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias não apresentam alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 28-29-30). Para verificar se ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 no córtex de ratos tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, ratos *Wistar* receberam, intraperitonealmente, injeções de SAL, HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 or 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) por 28 dias. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-NCS-1 e anti-DARPP-32. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de NCS-1 no córtex de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias (FIG 31A). *Imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina também demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de DARPP-32 no córtex de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos (FIG 31B).

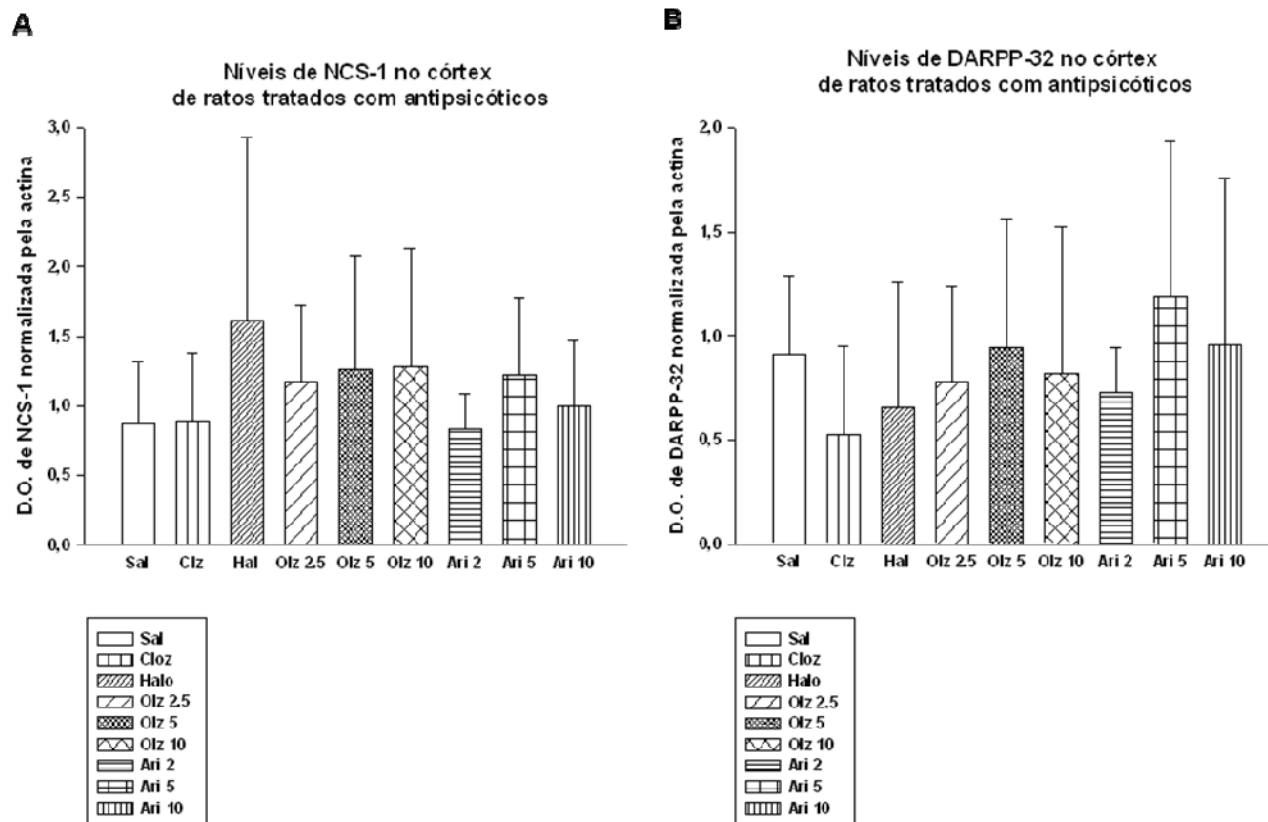


Figura 31: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 córtex restante de ratos *Wistar* submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos.

Foram realizados *imunoblots* para análise de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de NCS-1 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que córtex de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de NCS-1 (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que córtex de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 (B). ($p > 0,1$, One Way ANOVA, média, desvio padrão e $n=6$)

4.23 –NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE DARPP-32 E NCS-1 NO CEREBELLUM DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS TÍPICOS E ATÍPICOS POR 28 DIAS

Foi demonstrado que o córtex pré-frontal, *hippocampus*, *striatum* e córtex de ratos *wistar* tratados com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias não apresentam alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 28-29-30-31). Para verificar se ocorre alteração nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 no *cerebellum* de ratos tratados com antipsicóticos típicos e atípicos, ratos *Wistar* receberam, intraperitonealmente, injeções de SAL, HAL (1,5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2,5; 5 or 10 mg/kg) ou Ari (2, 10 or 20 mg/kg) por 28 dias. Foram realizados *imunoblots* com anticorpos específicos anti-NCS-1 e anti-DARPP-32. Análise quantitativa dos resultados dos níveis de NCS-1 normalizada pela actina demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de NCS-1 no *cerebellum* de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias (FIG 32A). *Imunoblots* com anticorpos específicos e análise quantitativa dos resultados dos níveis de DARPP-32 normalizada pela actina também demonstrou que não existe diferença nos níveis de expressão de DARPP-32 no *cerebellum* de ratos submetidos a tratamentos com antipsicóticos típicos e atípicos (FIG 32B).

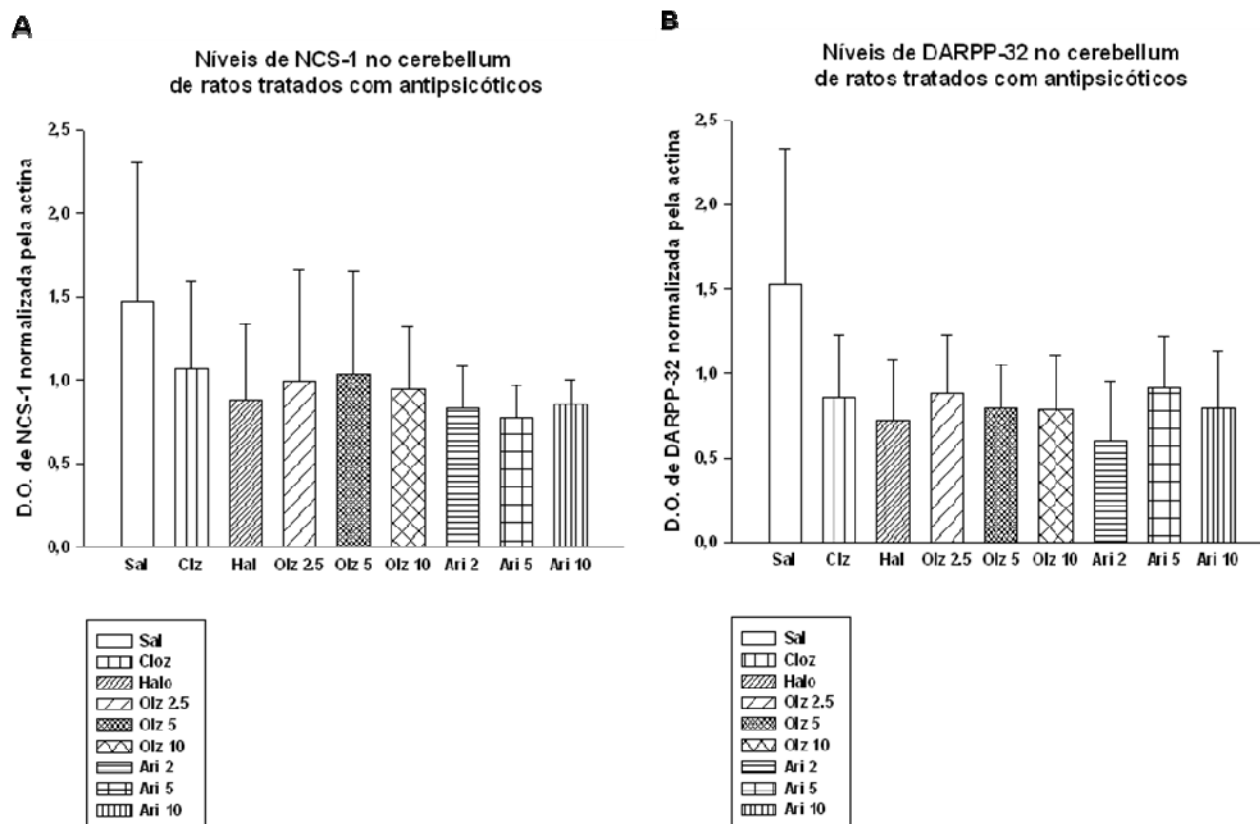


Figura 32: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 cerebellum de ratos *Wistar* submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos.

Foram realizados *imunoblots* para análise de NCS-1 e DARPP-32. Quantificação dos níveis de NCS-1 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que *cerebellum* de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de NCS-1 (A). Quantificação dos níveis de DARPP-32 foi normalizada pelos níveis de expressão de actina. Observou-se que *cerebellum* de ratos submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos não têm alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 (B). ($p > 0,1$, One Way ANOVA, média, desvio padrão e $n=6$)

A NCS-1 é encontrada em terminações pré e pós-sinápticas de interneurônios e neurônios piramidais do neocórtex de primatas humanos e não-humanos, co-localizando com receptores dopaminérgicos D₂, sugerindo assim que tenha função na modulação da transmissão sináptica dopaminérgica (Martone e cols., 1999; Chen e cols., 2002; Negyesse e Goldman-Rakic, 2005). A sinalização pelo receptor D₂ inibe tanto a formação de AMPc e consequentemente a fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34, quanto a ativação de Akt pela fosforilação na Treonina 308.

Foram encontradas alterações nos níveis de expressão NCS-1 e DARPP-32 no CPF de indivíduos com esquizofrenia. Recentes estudos demonstraram que existe redução dos níveis de expressão de DARPP-32 (Albert e cols., 2002; Ishikawa e cols., 2007) e aumento dos níveis de expressão protéica e RNAm de NCS-1 (Bai e cols., 2004; Koh e cols., 2003) no CPF de indivíduos com esquizofrenia. Porém, não existem relatos descrevendo correlação entre NCS-1 e a sinalização por DARPP-32. Portanto, com o objetivo de investigar essa correlação utilizamos células PC12 WT e células PC12 superexpressando NCS-1.

Primeiramente caracterizamos as células Clone para verificar a superexpressão de NCS-1. Através da microscopia confocal, observamos um aumento considerável dos níveis de NCS-1 nas células Clone (FIG 10). Observamos através de *imunoblot* e citometria de fluxo os níveis de NCS-1 e confirmamos que células Clone têm um aumento significativo de expressão de NCS-1 comparado com as células WT (FIG 10). Também observamos que estas células apresentavam uma localização celular de NCS-1 equivalente à localização demonstrada por Koizumi e cols.(2002), com uma presença considerável na superfície celular (FIG 10).

Através de um mecanismo de adaptação, o receptor dopaminérgico D₂ é fosforilado pela GRK2, formando um complexo D₂-Arrestina-GRK2 que é responsável pela internalização e dessensibilização deste receptor (Kuprinick & Benovic, 1998; Ito e cols., 1999; Iwata e cols., 1999; Kim e cols., 2001). Recentemente, foi demonstrado que NCS-1 inibe a dessensibilização de D₂ quando estimulado com agonista (Kabbani, e cols., 2002; Bergsson e cols., 2003). A liberação de dopamina (Greene e cols, 1976; Magyar e cols, 2004) e expressão endógena de receptor dopaminérgico D₂ (Courtney e cols, 1991; Chiasson e cols, 2006.; Wang e cols, 2006) já é descrita em células PC12. Porém, para confirmar a existência deste receptor e verificar se ocorre alguma alteração na expressão de D₂ nas células Clone, foram realizadas análises de *imunoblot* com anticorpo específico anti-D₂. Observamos a existência desse receptor nas células PC12 WT e Clone, porém, não existe diferença nos níveis de expressão de D₂ entre células WT e Clone (FIG 11). Imagens obtidas através de imunofluorescência e microscopia confocal também demonstraram a existência de receptores D₂ nas células PC12 (dados não publicados). Também observamos, através de citometria de fluxo em células PC12 não-permeabilizadas e marcadas com anti-D₂, que não existe diferença na exposição de D₂ entre as células PC12 WT e Clone (FIG 11). Porém, estas células não foram estimuladas com agonistas como demonstrado por Kabbani e cols (2002).

Como o receptor dopaminérgico D₂ modula a sinalização da via AMPc/PKA, verificamos através de *ELISA* se os níveis de AMPc estariam alterados em células Clone. Apesar de McFerran e cols (1999) não observarem alteração nos níveis de

AMPc em células cromafins bovinas expressando NCS-1, observamos uma diminuição significativa dos níveis de AMPc nas células Clone (FIG 12), sugerindo a modulação da formação de AMPc pela NCS-1.

Uma das funções bem conhecidas de PKA é a fosforilação de DARPP-32(Thr34) o que a torna um importante inibidor de PP-1. Após a observação de que os níveis de AMPc estavam alterados nas células Clone, verificamos a ativação de DARPP-32 nessas células. Primeiramente, observamos através de microscopia confocal que células Clone apresentavam uma diminuição considerável dos níveis de DARPP-32 (FIG 13). Através de *imunoblot* e citometria de fluxo, confirmamos que essa diminuição é significativa (FIG 13). Verificamos então os níveis de ativação de DARPP-32 através de *imunoblot* e observamos uma diminuição significativa nos níveis de pDARPP-32(Thr34) nas células Clone (FIG 14). Sugerimos então que NCS-1 altera a sinalização por DARPP-32.

Outra função conhecida da PKA é sua capacidade para fosforilar CREB na Serina 133, que ativa o fator de transcrição CRE (Svenningsson, 2004). Como foi demonstrado uma diminuição de AMPc e pDARPP-32(Thr34), verificamos se os níveis de pCREB(Ser133) estariam alterados nas células Clone. Observamos, através de *imunoblot*, que os níveis de pCREB(Ser133) estão significativamente menores nas células Clone (FIG 15). Sugerimos que essa diminuição da ativação de CREB é mais uma evidência da diminuição da ativação da via AMPc / PKA nas células Clone.

Porém, a regulação de pDARPP(Thr34) também pode ser regulada pela PP-2B cuja ativação é regulada por Ca^{2+} . Além de PP-2B, Ca^{2+} também ativa PP-2A, que desfosforila pDARPP-32(Thr75). A fosforilação de DARPP-32 na Treonina 75 inibe a fosforilação de pDARPP-32(Thr34) por PKA (Lindskog e cols., 2006). Portanto, verificamos se alterações da fosforilação de pDARPP-32(Thr75) estariam envolvidas na alteração de pDARPP-32(Thr34) nas células Clone. Através de *imunobot* observamos que não existem diferenças nos níveis de pDARPP-32(Thr75) entre as células WT e Clone (FIG 16). Sugerimos portanto que a diminuição dos níveis de pDARPP-32(Thr34) nas células Clone ocorre através da diminuição da atividade da via AMPc / PKA.

Outra alteração descrita no CPF de esquizofrênicos foi o aumento da expressão de Calcyon (Koh e cols., 2003; Baracskey e cols., 2006). Calcyon interage com o receptor dopaminérgico D_1 (Lezcano e cols., 2000) modulando seu estado ativo (Lidow e cols., 2001). Como Calcyon e NCS-1 modulam o sinergismo da sinalização intracelular dopaminérgica, verificamos se os níveis de Calcyon estariam alterados na células Clone. Como demonstrado na Figura 17, não observamos diferença nos níveis de Calcyon entre células WT e Clone.

Sabe-se que o receptor glutamatérgico AMPA é um dos alvos de PP-1. Portanto, para verificar se os níveis de pAMPA(Ser845) estariam alterados nas células Clone, realizamos *immunoblot* e observamos que existe diferença tanto nos níveis de expressão do receptor AMPA quanto nos níveis de pAMPA(Ser845) entre células WT e Clone (FIG 18). Porém, não observamos diferença estatisticamente significativa. Como essa fosforilação ocorre no decorrer da cascata da sinalização,

sugerimos que outras modulações devem ocorrer nesse mesmo receptor, já que NCS-1 também aumenta a liberação de glutamato (Guimarães e cols, dados não publicados).

Trabalhos recentes demonstraram que NCS-1 não altera fosforilação de Akt na Ser473 (Mora e cols, 2002; Kapp-Barnea e cols 2006). Sabe-se também que, além da via clássica do AMPc/PKA, foi descrito que a ativação de receptores D₂ alteram a ativação da via Akt (Brami-Cherrier e cols, 2002; Beaulieu e cols, 2007). Recentemente, trabalhos demonstraram diferentes resultados na fosforilação de Akt na Ser473 pelo receptor D₂ (Nair & Sealfon, 2003; Beaulieu e cols, 2004). Verificamos se os níveis de pAkt(Ser473) estariam alterados nas células Clone através de *imunoblot* e observamos que não existe diferença tanto na expressão de Akt quanto na fosforilação de Akt na Ser473 entre as células WT e Clone (FIG 19).

Foi demonstrado que CPF de esquizofrênicos e bipolares têm uma diminuição na expressão de DARPP-32 (Albert e cols., 2002; Ishikawa e cols, 2007). Também observamos uma diminuição na expressão de DARPP-32 nas células Clone (FIG 13), sugerindo um possível papel de NCS-1 na modulação da expressão de DARPP-32. Recentes trabalhos demonstraram que NCS-1 não altera fosforilação de Akt na Ser473 (Mora e cols, 2002; Kapp-Barnea e cols 2006) ou aumenta os níveis de fosforilação de Akt (Nakamura e cols., 2006). Como descrito anteriormente, a fosforilação de Akt na Thr308 por TrkB aumenta a expressão de DARPP-32 (Stroppolo e cols, 2002; Bogushi e cols, 2007). Portanto, são necessários estudos demonstrando se existe alteração na fosforilação de Akt na Thr308 em células PC12

Clone e posteriormente, caso exista alteração nos níveis desta fosforilação, se esta alteração está envolvida na expressão de DARPP-32.

Como citado anteriormente, sabe-se que a liberação de dopamina (Greene e cols, 1976; Magyar e cols, 2004) e expressão endógena de receptor dopaminérgico D₂ (Courtney e cols, 1991; Chiasson e cols, 2006.; Wang e cols, 2006) já é descrita em células PC12. Sabe-se também que NCS-1 inibe a dessensibilização de D₂ quando estimulado com agonista (Kabbani, e cols., 2002; Bergsson e cols., 2003). Demonstramos que existe uma diminuição significativa nos níveis de AMPc, DARPP-32, pDARPP-32(Thr34) e pCREB(Ser133) nas células PC12 Clone (FIG 12, 13, 14 e 15). Inicialmente sugerimos a existência de uma maior inibição na internalização de D₂ devido a superexpressão de NCS-1. Porém, demonstramos que células Clone não apresentavam níveis maiores de expressão e exposição na membrana de D₂ (FIG 11). Portanto, para avaliarmos a função do receptor D₂ na alteração da fosforilação de DARPP-32 na Thr34 em células Clone, realizamos tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos específicos. Realizamos tratamentos com o agonista de D₂, Quinpirole, em diferentes concentrações e em diferentes períodos de tempo, porém não observamos alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34) nas células PC12 WT e Clone (FIG 20-21). Realizamos tratamentos com antagonista de D₂, Raclopride, em diversas concentrações por 5 minutos e não observamos alterações nos níveis de pDARPP-32(Thr34) tanto nas células PC12 WT quanto nas Clone (FIG 22). Posteriormente realizamos tratamentos com antipsicótico típico, Haloperidol, forte antagonista de D₂, em diversas concentrações por 10 minutos e também não observamos alterações nos

níveis de pDARPP-32(Thr34), tanto nas células PC12 WT quanto nas células Clone (FIG 23).

Como observamos, diversos tratamentos com agonista, antagonista e antipsicótico típico em células PC12 não alteraram os níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34. Sabe-se que diferentes reagentes em que as células são mantidas em cultura, como soro e fatores de crescimento, alteram a ativação de diversas vias de sinalização (Nakao e *cols.*, 1996; Harthill e *cols.*, 2002; Bogush e *cols.*, 2007). Portanto, para verificar se o meio de cultura em que células PC12 estavam sendo mantidas, estaria influenciando na resposta das PC12 aos tratamentos, realizamos *starving* de 1 hora e 30 minutos, em células PC12 WT, com meio DMEM alta glicose sem soro, verificando a influência do soro, DMEM baixa glicose sem soro, verificando a influência da glicose, e PBS, verificando a influência do fenol. Após o período de *starving*, as células foram tratadas por 5 minutos com Quinpirole 5µM, Raclopride 5µM, Haloperidol 5µM e SCH-23390 5µM (antagonista específico de D₁). Porém, não observamos alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) nas células PC12 WT após os tratamentos (FIG 24). Também foi observado a ausência na fosforilação de DARPP-32 na Thr34 em células PC12 WT e Clone diferenciadas tratadas com Raclopride 5 e 10µM por 10 e 30 minutos (resultados não mostrados).

Foi observado que células PC12 superexpressando NCS-1 apresentam uma diminuição da ativação da via AMPc/PKA. Porém, células PC12 não apresentaram resposta aos tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos específicos. Portanto, sugerimos que a modulação da sinalização intracelular pela NCS-1 é independente da sinalização dopaminérgica.

Observamos que células Clone apresentam diminuição dos níveis de AMPc. Sabe-se que AMPc modula a atividade de NCS-1, aumentando sua interação com receptor D₂ (Kabbani e cols., 2002), e de DARPP-32, fosforilando-a na Thr34 (Svenningsson e col., 2004). Observamos que células PC12 WT e Clone tratadas com Forskolin 5µM e 10µM por 24, 48 e 72 horas, não apresentaram alterações nos níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 25). Portanto, sugerimos que a alteração nos níveis de expressão de DARPP-32 nas células Clone não é modulada pela diminuição da atividade da via AMPc/PKA, e que expressão de NCS-1 não é modulada pela ativação da mesma via.

Alterações nos níveis de expressão proteica e mRNA de NCS-1 e DARPP-32 foram encontradas CPF de indivíduos com esquizofrenia. Foi observado que tratamento crônico por 14 dias com antipsicóticos típicos e atípicos, em células PC12 WT e Clone, não alteraram os níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 (FIG 26). Também foi observado que tratamento crônico por 28 dias com antipsicóticos típicos e atípicos em ratos *Wistar* não altera a expressão de NCS-1 e DARPP-32 nas regiões do CPF, *hippocampus*, *striatum*, córtex e *cerebellum* (FIG 27-32). Sugerimos, com estes resultados *in vitro* e *in vivo*, que as alterações nos níveis de NCS-1 e DARPP-32 no CPF de esquizofrênicos não estão associados aos tratamentos com antipsicóticos, mas sim à patologia em si.

Durante testes para memória operacional, foi observado uma diminuição da ativação do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia comparados com indivíduos do grupo controle. Foi demonstrado a colocalização de receptor D2 e NCS-1 em

neurônios piramidais do CPF de primatas e que existe um aumento na expressão de NCS-1 no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Também foi demonstrada a diminuição na expressão proteica de DARPP-32 na mesma região além do envolvimento de polimorfismos de base única (SNP) em DARPP-32 com morfologia fronto-estriatal e funções cognitivas. Podemos inferir que a diminuição da atividade da via AMPc/PKA pela NCS-1, independentemente de receptores dopaminérgicos diminui a ativação de redes neuronais piramidais, e consequentemente o funcionamento cognitivo normal para formulação de pensamentos complexos e inibição latente.

Foi demonstrado que durante processos psicóticos, tanto na alucinação quanto delírio, ocorre a ativação anormal do CPFDL de indivíduos com esquizofrenia. Também foi demonstrado a colocalização de receptor D2 e NCS-1 em interneurônios do CPF de primatas e, como descrito anteriormente, existe um aumento na expressão de NCS-1 no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia além da diminuição de DARPP-32 na mesma região. Podemos inferir que a diminuição da atividade da via AMPc/PKA diminui a ativação de interneurônios e consequentemente a modulação da ativação cortical normal do CPFDL.

Recentes trabalhos demonstraram que a superexpressão de NCS-1 em cultura de células neuronais protege estas contra a morte celular causada por diversos agentes estressores. No mesmo trabalho foi demonstrado que NCS-1 está aumentado em neurônios do núcleo dorsal motor de ratos após axotomia, demonstrando seu papel na regeneração (Nakamura e cols., 2006). Diversos trabalhos demonstraram uma diminuição da massa cortical de indivíduos

esquizofrênicos e que proteínas envolvidas na sinalização anti-apoptótica, como Akt, BDNF e TrkB, estão diminuídas no CPF de indivíduos com esquizofrenia (Hazlett e cols., 2008, Emamian e cols., 2004, Hashimoto e cols., 2005; Welckert e cols., 2003; Takahashi e cols., 2000). Sugerimos que a NCS-1 esteja envolvida portanto, num mecanismo de proteção neuronal devido às alterações na sinalização de sobrevivência celular. Através do aumento da expressão de NCS-1 em consequência da alteração desta via de sinalização, pode-se ocorrer alteração na sinalização intracelular do AMPc/PKA/DARPP-32 independentemente de dopamina, como demonstramos neste trabalho, e consequentemente, alterações cognitivas nesse indivíduo.

Além de alterações dopaminérgicas no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia, sabe-se que existem outras alterações, como a diminuição dos níveis de RNAm e protéicos de BDNF e seu receptor, TrkB (Hashimoto e cols., 2005; Welckert e cols., 2003; Takahashi e cols., 2000). Como já foi discutido, a ativação de TrkB por BDNF, aumenta a expressão de DARPP-32 através da fosforilação de Akt (Stroppolo e cols., 2001) na Thr308. Portanto, podemos sugerir que a diminuição de BDNF e TrkB no CPFDL de indivíduos com esquizofrenia pode ter participação na diminuição de DARPP-32 na mesma região cerebral.

Demonstramos que NCS-1 modula a sinalização da via AMPc/PKA e a expressão de DARPP-32 independentemente da sinalização dopaminérgica, sugerindo assim ser um importante modulador da transdução de neurotransmissão. Porém, ainda é necessário uma investigação sobre quais os mecanismos envolvidos nesta modulação. Também demonstramos que tratamento crônico com antipsicóticos não

alteram os níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 em células PC12 e em diferentes regiões cerebrais de ratos, sugerindo que as alterações observadas no CPF de esquizofrênicos estão associadas à patologia, e não ao tratamento. Deve-se levar em consideração a limitação dos modelos *in vitro* e *in vivo* para mimetizar características principais da esquizofrenia. Portanto, somente a caracterização dos diversos elementos dessas vias de sinalização pode colaborar na elucidação dos mecanismos relacionados à esquizofrenia e seu tratamento farmacológico.

6 - CONCLUSÃO

Células PC12 superexpressando NCS-1 apresentam níveis de AMPc, pCREB(Ser133), DARPP-32 e pDARPP-32(Thr34) menores que as células WT. As mesmas apresentam níveis de AMPA e pAMPA(Ser845) alterados, porém sem diferença estatística significativa. Não existe diferença dos níveis de pDARPP-32(Thr75) entre células PC12 WT e superexpressando NCS-1, sugerindo que as vias dependentes de CK1 / CDK5 e PP2A não estão alteradas, e que a diminuição da fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 não está modulada por outros sítios de fosforilação de DARPP-32. Não existe diferença nos níveis de Calcitonin Receptor-Like Receptor 1 (Calcyon), Akt e pAkt(Thr473) entre células PC12 WT e células que superexpressam NCS-1, sugerindo que outras vias não estão alteradas (FIG 33).

Não existe diferença nos níveis de expressão e exposição do receptor dopaminérgico D₂, sem estímulo por agonistas, entre células PC12 WT e Clone. Também foi demonstrada a presença do receptor dopaminérgico D₁ nas mesmas. Porém, diversos tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos não alteraram a sinalização AMPc/PKA e a expressão de DARPP-32, sugerindo que a superexpressão de NCS-1 modula a sinalização intracelular da via AMPc/PKA e expressão de DARPP-32 por via independente dos receptores dopaminérgicos (FIG 34-36).

Tanto células PC12 WT e Clone, quanto ratos *wistar*, submetidos ao tratamento crônico com antipsicóticos típicos e atípicos não apresentaram alteração na expressão de NCS-1 e DARPP-32. (FIG 37-38)

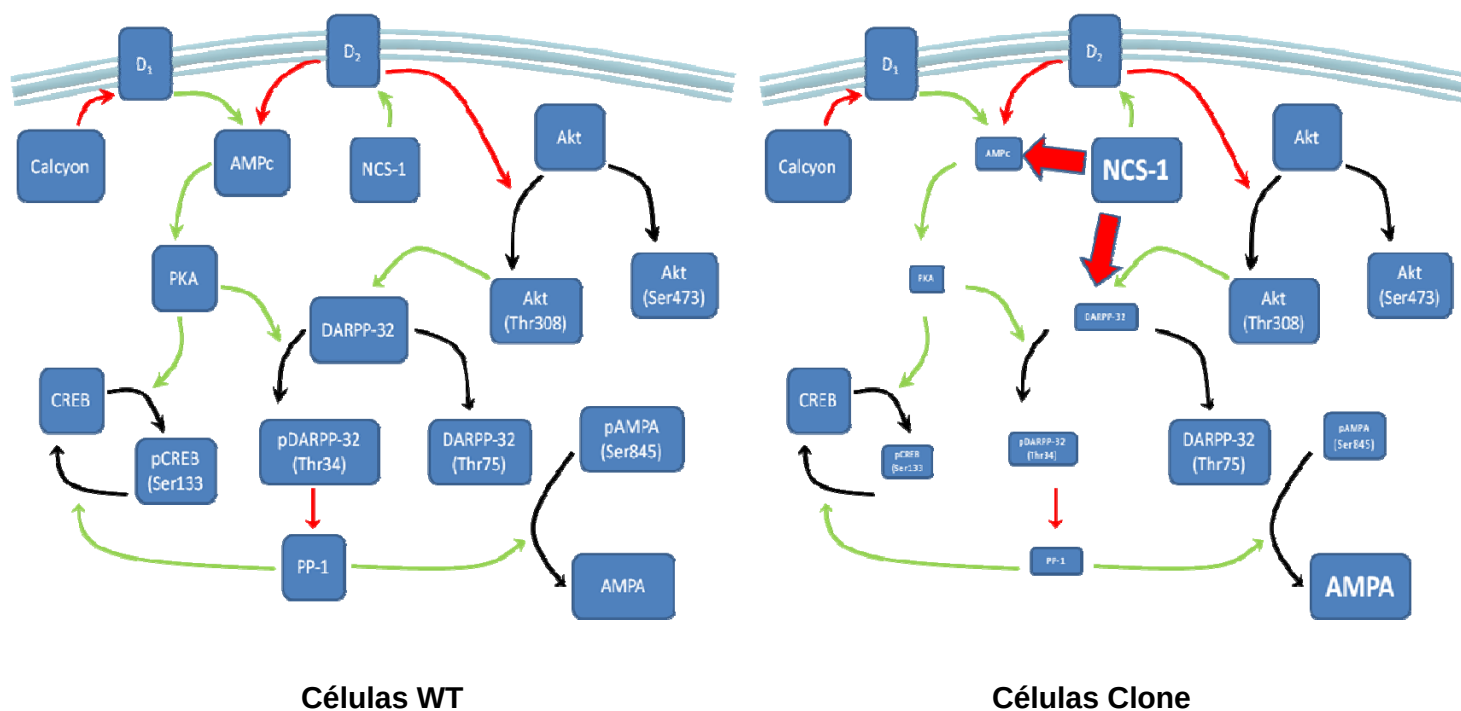


Figura 33 – Alterações na via do AMPc/PKA em células PC12 superexpressando NCS-1

Foi demonstrado que células PC12 Clone têm diversas alterações na via do AMPc/PKA, independente de receptores de dopamina. Células PC12 Clone, superexpressando NCS-1, apresentam menores níveis de AMPc, DARPP-32, pDARPP-32(Thr34), pCREB(Ser133) e pAMPA(Ser845). Também foi observado que estas apresentam níveis aumentados de receptores AMPA e nenhuma alteração nos níveis de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ e exposição de D₂ na membrana celular. Também não foi observado nenhuma alteração nos níveis de CREB, pDARPP-32(Thr75), Calcitonin, Akt e pAkt(Ser473).

Tempo / []	0,5 μ M	1 μ M	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M
1 min		X					
2 min		X					
5 min	X / O	X / O	X	X / O	X	X	X
10 min	Δ	X / Δ		Δ	Δ	Δ	
30 min		X					
1 hora		X					

Quinpirole	X
Raclopride	O
Haloperidol	Δ

Figura 34 – Tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos para avaliação de pDARPP-32(Thr34).

Células PC12 foram tratadas em diferentes tempos com diversas concentrações de Quinpirole para avaliação da fosforilação de DARPP-32 na Thr34. Estas também foram tratadas com Raclopride por 5 minutos com diversas concentrações e Haloperidol por 10 minutos em diversas concentrações. Não foi observado alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) em nenhum dos tratamentos.

Reagente / Meio	↑Glu + Soro	↑Glu	↓Glu	PBS
Quinpirole 5μM	X	X	X	X
Raclopride 5μM	X	X	X	
Haloperidol 5μM	X	X	X	X
SCH-23390 5μM	X	X	X	X

Figura 35 – Tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos após *starving* de 1 hora e 30 minutos para avaliação de pDARPP-32(Thr34)

Células PC12 foram tratadas por 5 minutos com 5μM de Quinpirole, Raclopride, Haloperidol e SCH-23390, após 1 hora e 30 minutos de *starving*. Foram feitos *starvings* em meios de cultura sem soro, com baixa glicose e sem fenol para testar se alguns reagentes encontrados no meio de cultura celular estariam impedindo a fosforilação de DARPP-32 na Thr34 através de tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos específicos. Não foi observado alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) em nenhum dos tratamentos após diferentes *starvings*.

Tempo / []	1 μ M	5 μ M	10 μ M
10 min	X	X	X
30 min	X	X	X

Figura 36 – Tratamentos com Raclopride em células PC12 diferenciadas por 3 dias para avaliação de pDARPP-32(Thr34)

Células PC12 foram diferenciadas por 3 dias com NGF e tratadas por 10 e 30 minutos com três diferentes concentrações de Raclopride, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, para avaliação dos níveis de fosforilação de DARPP-32 na Thr34. Não foi observado alteração nos níveis de pDARPP-32(Thr34) em nenhum dos tratamentos após a diferenciação celular.

Reagentes / Tempo	1 dia	2 dias	3 dias	14 dias
Forskolin 5 μ M	X	X		
Forskolin 10 μ M	X	X	X	
Haloperidol 1 μ M				X
Haloperidol 10 μ M				X
Haloperidol 20 μ M				X
Risperidona 20 μ M				X
Clozapina 20 μ M				X

Figura 37 – Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em células PC12 WT e Clone tratadas com forskolin, antipsicóticos típicos e atípicos.

Células PC12 foram tratadas com forskolin em duas concentrações, 5 μ M e 10 μ M, por 1 dia, 2 dias e 3 dias. Células PC12 também foram tratadas com antipsicótico típico, Haloperidol em três concentrações, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, e antipsicóticos atípicos, Risperidona e Clozapina a 20 μ M, por 14 dias. Não foi observado alteração nos níveis de DARPP-32 e NCS-1 nas células PC12 WT e Clone em nenhum dos tratamentos.

Região Antipsicótico /	Pré-frontal	Hippocampus	Striatum	Córtex	Cerebellum
CLZ	X	X	X	X	X
HAL	X	X	X	X	X
OLZ 2,5mg/kg	X	X	X	X	X
OLZ 5mg/kg	X	X	X	X	X
OLZ 10mg/kg	X	X	X	X	X
Ari 2mg/kg	X	X	X	X	X
Ari 5mg/kg	X	X	X	X	X
Ari 10mg/kg	X	X	X	X	X

Figura 38 – Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em regiões cerebrais de ratos *wistar* submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias.

Ratos *wistar* foram tratados com antipsicótico típico, Haloperidol, e antipsicóticos atípicos, Clozapina, Olanzapina em três concentrações, e Aripirazole em três concentrações, por 28 dias. Foram analisados os níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em cinco regiões cerebrais após o tratamento: córtex pré-frontal, *hippocampus*, *striatum*, cortex restante e *cerebellum*. Foi demonstrado que nenhuma das regiões cerebrais de ratos têm alteração nos níveis de DARPP-32 e NCS-1 após o tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

BARACSKAY, K. L.; HAROUTUNIAN, V.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Dopamine receptor signaling molecules are altered in elderly schizophrenic cortex. *Synapse*, vol. 60(4), 2006. p-271-9.

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

BEAULIEU, J. M.; SOTNIKOVA, T. D.; MARION, S.; LEFKOWITZ, R. J.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, vol. 122(2), 2005. p-261-73.

BEAULIEU, J. M.; SOTNIKOVA, T. D.; YAO, W. D.; KOCKERITZ, L.; WOODGETT, J. R.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 101(14), 2004. p-5099-104.

BEAULIEU, J. M.; TIROTTA, E.; SOTNIKOVA, T. D.; MASRI, B.; SALAHPOUR, A.; GAINETDINOV, R. R.; BORRELLI, E.; CARON, M. G. Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. *J Neurosci.*, vol. 27(4), 2007. p-881-5.

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

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

BERGSON C, LEVENSON R, GOLDMAN-RAKIC PS, LIDOW MS. Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci.* Sep;24(9): 2003, p-486-92.

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

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

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

BLAKEMORE SJ, OAKLEY DA, FRITH CD. Delusions of alien control in the normal brain. *Neuropsychologia*.;41(8): 2003, p-1058-67.

BOGUSH, A.; PEDRINI, S.; PELTA-HELLER, J.; CHAN, T.; YANG, Q.; MAO, Z.; SLUZAS, E.; GIERINGER, T.; EHRLICH, M. E. AKT and CDK5/p35 mediate brain-derived neurotrophic factor induction of DARPP-32 in medium size spiny neurons in vitro. *J Biol Chem.*, vol. 282(10), 2007. p-7352-9.

BOURNE Y, DANNENBERG J, POLLMANN V, MARCHOT P, PONGS O. Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J Biol Chem.* 13;276(15): 2001, p-11949-55.

BRAMI-CHERRIER, K.; VALJENT, E.; GARCIA, M.; PAGES, C.; HIPSKIND, R. A.; CABOCHE, J. Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci.*, vol. 22(20), 2002. p-8911-21.

BRAUNEWELL KH. The darker side of Ca²⁺ signaling by neuronal Ca²⁺-sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol Sci.*;26(7): 2005 , p-345-51..

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

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

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

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

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

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

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

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

CHEN, X. L.; ZHONG, Z. G.; YOKOYAMA, S.; BARK, C.; MEISTER, B.; BERGGREN, P. O.; Roder, J.; HIGASHIDA, H.; JEROMIN, A. Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J Physiol.*, vol. 532(Pt 3), 2001. p-649-59.

CHEUNG, Z. H.; CHIN, W. H.; CHEN, Y.; NG, Y. P.; IP, N. Y. Cdk5 Is Involved in BDNF-Stimulated Dendritic Growth in Hippocampal Neurons. *PLoS Biol.*, vol. 5(4), 2007. p-63.

CHIASSEON, K.; DAOUST, B.; LEVESQUE, D.; MARTINOLI, M. G. Dopamine D2 agonists, bromocriptine and quinpirole, increase MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells. *Neurotox Res.*, vol. 10(1), 2006. p-31-42.

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

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

COURTNEY, N. D.; HOWLETT, A. C.; WESTFALL, T. C. Dopaminergic regulation of dopamine release from PC12 cells via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Neurosci Lett.*, vol. 122(2), 1991. p-261-4.

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

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.*, vol. 13, 1999. p-2905–2927.

DE BARRY, J.; JANOSHAZI, A.; DUPONT, J. L.; PROCKSCH, O.; CHASSEROT-GOLAZ, S.; JEROMIN, A.; VITALE, N. Functional implication of neuronal calcium sensor-1 and phosphoinositol 4-kinase-beta interaction in regulated exocytosis of PC12 cells. *J Biol Chem.*, vol. 281(26), 2006. p-18098-111.

DEAN B, HUSSAIN T, HAYES W, SCARR E, KITSOULIS S, HILL C, OPESKIN K, COPOLOV DL. Changes in serotonin_{2A} and GABA(A) receptors in schizophrenia: studies on the human dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurochem.* Apr;72(4): 1999, p-1593-9.

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

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

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

EMAMIAN, E. S.; HALL, D.; BIRNBAUM, M. J.; KARAYIORGOU, M.; GOGOS, J. A. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nat Genet.*, vol. 36(2), 2004. p-131-7.

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

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

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

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

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

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

GINES S, HILLION J, TORVINEN M, LE CROM S, CASADO V, CANELA EI, RONDIN S, LEW JY, WATSON S, ZOLI M, AGNATI LF, VERNIERA P, LLUIS C, FERRE S, FUXE K, FRANCO R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18;97(15) 2000, p-8606-11.

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

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

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

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

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

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 7, 1976. p. 2424-8.

GREENGARD P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*. 294(5544): 2001, p-1024-30

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

HARTHILL, J.E.; POZUELO RUBIO, M.; MILNE, F.C.; MACKINTOSH C. Regulation of the 14-3-3-binding protein p39 by growth factors and nutrients in rat PC12 pheochromocytoma cells *Biochem. J.*, vol 368, 2002, p. 565–572.

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

HAYES, J. S.; MAYER, S. E. Regulation of guinea pig heart phosphorylase kinase by cAMP, protein kinase, and calcium. *Am J Physiol.*, vol. 240(3), 1981. p-340-9.

HAZLETT, E.A.; BUCHSBAUM, M.S.; MEHMET HAZNEDAR, M.; NEWMARK, R.; GOLDSTEIN, K.E.; ZELMANOVA, Y.; GLANTON, C.F.; TOROSJAN, Y.; NEW, A.S.; LO, J.N.; MITROPOULOU, V.; SIEVER, L.J. Cortical gray and white matter volume in unmedicated schizotypal and schizophrenia patients. *Schizophr Res*, 2008.

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

HUI, H.; MCHUGH, D.; HANNAN, M.; ZENG, F.; XU, S. Z.; KHAN, S. U.; LEVENSON, R.; BEECH, D. J.; WEISS, J. L. Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *J Physiol.*, vol. 572(Pt 1), 2006. p-165-72.

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

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

ISHIKAWA M, MIZUKAMI K, IWAKIRI M, ASADA T. Immunohistochemical and immunoblot analysis of Dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein, relative molecular mass 32,000 (DARPP-32) in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 15;31(6): 2007, p-1177-81.

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

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

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

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

KANDELL, E.R.; SHWARTZ J.H.; JESSELL, T.M.; Princípios da Neurociência. 4 ed., São Paulo: Manole, 2003.

KAPP-BARNEA, Y.; NINIO-MANY, L.; HIRSCHBERG, K.; FUKUDA, M.; JEROMIN, A.; SAGI-EISENBERG, R. 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. *Mol Biol Cell.*, vol. 17(9), 2006. p-4130-41.

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

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

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

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

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

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

KOH, T. W.; BELLEN, H. J. Synaptotagmin I, a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.*, vol. 26, 2003. p. 413-422.

KOIZUMI S, ROSA P, WILLARS GB, CHALLISS RA, TAVERNA E, FRANCOLINI M, BOOTMAN MD, LIPP P, INOUE K, RODER J, JEROMIN A. Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem.* 16;277(33): 2002, p-30315-24.

KOUZMENKO, A. P.; SCAFFIDI, A.; PEREIRA, A. M.; HAYES, W. L.; COPOLOV, D. L.; DEAN, B. No correlation between A(-1438)G polymorphism in 5-HT_{2A} receptor

gene promoter and the density of frontal cortical 5-HT_{2A} receptors in schizophrenia. *Hum Hered.*, vol. 49, n. 2, 1999. p. 103-105.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEZCANO, N.; MRZLJAK, L.; EUBANKS, S.; LEVENSON, R.; GOLDMAN-RAKIC, P.; BERGSON, C. Dual signaling regulated by calcyon, a D1 dopamine receptor interacting protein. *Science*, vol. 287(5458), 2000. p-1660-4.

LI, C. H.; LIAO, H. M.; HUNG, T. W.; CHEN, C. H. Mutation analysis of DARPP-32 as a candidate gene for schizophrenia. *Schizophr Res.*, vol. 87(1-3), 2006. p-1-5.

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

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

LIDOW, M. S.; ROBERTS, A.; ZHANG, L.; KOH, P. O.; LEZCANO, N.; BERGSON, C. Receptor crosstalk protein, calcyon, regulates affinity state of dopamine D1 receptors. *Eur J Pharmacol.*, vol. 427(3), 2001. p-187-93.

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

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

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

LINDSKOG, M.; KIM, M.; WIKSTROM, M. A.; BLACKWELL, K. T.; KOTALESKI, J. H. Transient calcium and dopamine increase PKA activity and DARPP-32 phosphorylation. *PLoS Comput Biol.*, vol. 2(9), 2006. p-119.

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

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

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

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

MAGYAR, K.; SZENDE, B. (-)-Deprenyl, a selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties. *Neurotoxicology*, vol. 1-2, 2004. p. 233-42.

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

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

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

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

MCFERRAN, B. W.; WEISS, J. L.; BURGOYNE, R. D. Neuronal Ca(2+) sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca(2+)-independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca(2+) signal transduction. *J Biol Chem.*, vol. 274(42), 1999. p-30258-65.

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

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

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

MEYER-LINDENBERG, A.; STRAUB, R. E.; LIPSKA, B. K.; VERCHINSKI, B. A.; GOLDBERG, T.; CALLICOTT, J. H.; EGAN, M. F.; HUFFAKER, S. S.; MATTAY, V. S.; KOLACHANA, B.; KLEINMAN, J. E.; WEINBERGER, D. R. Genetic evidence implicating DARPP-32 in human frontostriatal structure, function, and cognition. *J Clin Invest.*, vol. 117(3), 2007. p-672-82.

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

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

MORA, S.; DURHAM, P. L.; SMITH, J. R.; RUSSO, A. F.; JEROMIN, A.; PESSIN, J. E. NCS-1 inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.*, vol. 277(30), 2002. p-27494-500.

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

NAIR, V. D.; SEALFON, S. C. Agonist-specific transactivation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by the dopamine D2 receptor. *J Biol Chem.*, vol. 278(47), 2003. p-47053-61.

NAKAMURA, T. Y.; JEROMIN, A.; SMITH, G.; KURUSHIMA, H.; KOGA, H.; NAKABEPPU, Y.; WAKABAYASHI, S.; NABEKURA, J. Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol.*, vol. 172(7), 2006. p-1081-91.

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

NAKAO, N.; ODIN, P.; LINDVALL, O.; BRUNDIN, P. Differential trophic effects of basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1, and neurotrophin-3 on striatal neurons in culture. *Exp Neurol.* vol 138(1), 1996, p.144-57.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O'CALLAGHAN, D. W.; IVINGS, L.; WEISS, J. L.; ASHBY, M. C.; TEPIKIN, A. V.; BURGOYNE, R. D. Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem.*, vol. 277(16), 2002. P-14227-37.

OFIR, R.; DWARKI, V. J.; RASHID, D.; VERMA, I. M. CREB represses transcription of fos promoter: role of phosphorylation. *Gene Expr.*, vol. 1(1), 1991. p-55-60.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

STAHL S.M. Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações práticas. 2 ed. 2002. Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro.

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

STROPPOLO, A.; GUINEA, B.; TIAN, C.; SOMMER, J.; EHRLICH, M. E. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in brain-derived neurotrophic factor-induced DARPP-32 expression in medium size spiny neurons in vitro. *J Neurochem.*, vol. 79, n. 5, 2001. p. 1027-1032.

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

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

Svenningsson P, Tzavara ET, Carruthers R, Rachleff I, Wattler S, Nehls M, McKinzie DL, Fienberg AA, Nomikos GG, Greengard P. Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science*. 21;302(5649): 2003, p-1412-5.

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

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

TAVERNA, E.; SABA, E.; LINETTI, A.; LONGHI, R.; JEROMIN, A.; RIGHI, M.; CLEMENTI, F.; ROSA, P. Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains. *J Neurochem.*, vol. 100(3), 2007. p-664-77.

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

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

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

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

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

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

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

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

VOGELEY, K.; TEPEST, R.; SCHNEIDER-AXMANN, T.; HUTTE, H.; ZILLES, K.; HONER, W. G.; FALKAI, P. Automated image analysis of disturbed cytoarchitecture

in Brodmann area 10 in schizophrenia. *Schizophr Res.*, vol. 62, n. 1-2, 2003. p. 133-140.

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

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

WANG, H.; YUAN, G.; PRABHAKAR, N. R.; BOSWELL, M.; KATZ, D. M. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling. *J Neurochem.*, vol. 96(3), 2006. p-694-705.

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

YAN, Z.; HSIEH-WILSON, L.; FENG, J.; TOMIZAWA, K.; ALLEN, P. B.; FIENBERG, A. A.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat. Neurosci.*, vol. 2, 1999. p. 13-17.

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

ZUCKER RS. NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat Neurosci.* Oct;6(10): 2003, p-1006-8.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As quatro vias dopaminérgicas	13
Figura 2: Vias de síntese e degradação de dopamina	15
Figura 3: Modulação da adenilato ciclase	17
Figura 4: Efeitos da sinalização dopaminérgica tanto na via AMPc quanto na via Akt	18
Figura 5: Mecanismo de internalização e dessensibilização de receptor metabotrópico	21
Figura 6: Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos	23
Figura 7: Sítios de fosforilação da DARPP-32	24
Figura 8: Funções de proteínas sensoras de cálcio	28
Figura 9: Modulação de GRK2/D2 por NCS-1	30
Figura 10: Níveis da expressão proteica de NCS-1 em células PC12 WT e Clone	56
Figura 11: Níveis da expressão do receptor dopaminérgico D ₂ em células PC12 WT e Clone	58
Figura 12: Representação quantitativa dos níveis totais de AMPc em células PC12 WT e Clone	60
Figura 13: Diminuição dos níveis de expressão de DARPP-32 em células PC12 WT e Clone	62
Figura 14: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina em células PC12 WT e Clone	64
Figura 15: Níveis de CREB e pCREB (Ser133) em células PC12WT e Clone	66
Figura 16: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 75 em células PC12 WT e Clone	69

Figura 17: Níveis de Calcyon em células PC12WT e Clone	70
Figura 18: Níveis de AMPA e pAMPA (Ser 845) em células PC12 WT e Clone	72
Figura 19: Níveis de Akt e pAkt (Ser473) em células PC12 WT e Clone	74
Figura 20: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas 5 minutos com diversas concentrações de Quinpirole	76
Figura 21: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas com Quinpirole 1µM por diversos períodos de tempo	78
Figura 22: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas 5 minutos com diferentes concentrações de Raclopride	80
Figura 23: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT e Clone tratadas 10 minutos com diferentes concentrações de Haloperidol	82
Figura 24: Níveis de fosforilação de DARPP-32 na Treonina 34 em células PC12 WT submetidas à 1 hora e 30 minutos de starving, tratadas 5 minutos com 5µM de quinpirole, raclopride, haloperidol e sch-23390	85
Figura 25: Níveis de expressão de NCS-1 e DARPP-32 em células PC12 WT e Clone tratadas com Forskolin 5µM e 10µM por 24 e 48 horas	88
Figura 26: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em células PC12 WT e Clone tratados com Haloperidol 1µM, 10µM e 20µM, Risperidona 20µM e Clozapina 20µM por 14 dias	90
Figura 27: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em córtex pré-frontal, <i>hippocampus</i> , <i>striatum</i> , córtex e <i>cerebellum</i> de ratos Wistar submetidos a injeções i.p. de solução salina e solução salina Tween 1%	92
Figura 28: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em córtex pré-frontal de ratos Wistar submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos	94
Figura 29: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em <i>hippocampus</i> de ratos Wistar submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos	96
Figura 30: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em <i>striatum</i> de ratos Wistar submetidos a	

28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos	98
Figura 31: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em córtex de ratos Wistar submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos	100
Figura 32: Níveis de NCS-1 e DARPP-32 em <i>cerebellum</i> de ratos Wistar submetidos a 28 dias de tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos	102
Figura 33 – Alterações na via do AMPc/PKA em células PC12 superexpressando NCS-1	117
Figura 34 – Tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos para avaliação de pDARPP-32(Thr34)	118
Figura 35 – Tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos após <i>starving</i> de 1 hora e 30 minutos para avaliação de pDARPP-32(Thr34)	119
Figura 36 – Tratamentos com Raclopride em células PC12 diferenciadas por 3 dias para avaliação de pDARPP-32(Thr34)	120
Figura 37 – Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em células PC12 WT e Clone tratadas com forskolin, antipsicóticos típicos e atípicos	121
Figura 38 – Níveis de expressão de DARPP-32 e NCS-1 em regiões cerebrais de ratos <i>wistar</i> submetidos ao tratamento com antipsicóticos típicos e atípicos por 28 dias.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

A2A	Receptor adrenérgico $\alpha 2a$
AC	Adenilato ciclase
AAAD	Descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos
AMPA	Alfa-amino-3-hidróxido-5-metil-isoxazole-propionato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ari	Aripiprazole
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAPS	Proteína ativadora de secreção dependente de cálcio
CB1	Receptor canabinóide 1
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
Cdk-5	Quinase dependente de ciclina 5
CK	Caseína quinase
CLO	Clozapina
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CPF	Córtex Pré-Frontal
CPFDL	Córtex Pré-Frontal Dorsolateral
CREB	Elemento ligante responsivo a AMPc
D	Receptor de dopamina
Da	Dalton
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 KDa
DAT	Transportador de dopamina

DMEM	Meio <i>Eagle</i> modificado Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
FGF-2	Fator de crescimento para fibroblasto
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD67	Ácido glutâmico descarboxilase
GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
GPCR	Receptores acoplados heteromericamente à proteína G
GRK2	Proteína quinase 2 acoplada à proteína G
GSK	Glicogênio sintase quinase
HAL	Haloperidol
H2O2	Peróxido de hidrogênio
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potencial de longa duração
M	Receptor muscarínico
MAO	Monoamino oxidase
NMDA	N-metil-D-aspartato
NCS-1	Sensora de cálcio neuronal 1
NGF	Fator de crescimento neuronal
OLZ	Olanzapina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS	Tampão fosfato salino
PC12	Célula feocromocitoma de rato
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
PP	Proteína fosfatase
PET	Tomografia de emissão Positrônica
RNA	Ácido ribonucleico
SAL	Salina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNAP	Synaptosome-associated protein
SNARE	Proteína receptora anexada ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel
Ser	Serina
TDH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TH	Tirosina hidroxilase
Thr	Treonina
Trk	Tirosina quinase
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
WT	Tipo selvagem
5HT	Receptor serotoninérgico

DARPP-32 and NCS-1 Expression is not Altered in Brains of Rats Treated with Typical or Atypical Antipsychotics

Bruno R. Souza · Bernardo S. Motta · Daniela V. F. Rosa · Karen C. L. Torres ·
Adalberto A. Castro · Clarissa M. Comim · André M. Sampaio ·
Fabrício F. Lima · Andreas Jeromin · João Quevedo · Marco A. Romano-Silva

Accepted: 24 July 2007 / Published online: 31 August 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract Dopamine-mediated neurotransmission imbalances are associated with several psychiatry illnesses, such as schizophrenia. Recently it was demonstrated that two proteins involved in dopamine signaling are altered in prefrontal cortex (PFC) of schizophrenic patients. DARPP-32 is a key downstream effector of intracellular signaling pathway and is downregulated in PFC of schizophrenic subjects. NCS-1 is a neuronal calcium sensor that can inhibit dopamine receptor D₂ internalization and is upregulated in PFC of schizophrenic subjects. It is well known that dopamine D₂ receptor is the main target of antipsychotic. Therefore, our purpose was to study if chronic treatment with typical or atypical antipsychotics induced alterations in DARPP-32 and NCS-1 expression in five brain regions: prefrontal cortex, hippocampus, striatum, cortex and cerebellum. We did not find any changes in

DARPP-32 and NCS-1 protein expression in any brain region investigated.

Keywords DARPP-32 · NCS-1 · Antipsychotic · Schizophrenia

Introduction

Dopaminergic neurotransmission is involved in many functions in mammals [1–4], and dopamine-mediated neurotransmission imbalances are associated with several psychiatry illnesses, such as schizophrenia [5–6].

Schizophrenia is a major psychiatry disease that affects 1% of worldwide population [7]. It is the most disabling of psychiatry disorders and it is characterized by psychosis, apathy and social withdrawal, and cognitive impairment, which results in altered functioning in many aspects of life. It is a life-long disorder and, although exact disease cause remains unknown, it is well known that the disease can be triggered by a combination of genetic and environmental factors [8].

Recently, some studies have demonstrated alteration in the expression of two proteins, associated with regulation of the dopaminergic signaling, in the prefrontal cortex (PFC) of patients with schizophrenia [9]. One of them is dopamine and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein of relative molecular mass 32,000 (DARPP-32). Downregulation of DARPP-32 expression in PFC of schizophrenia patients was reported [10–11]. Dopamine receptors are G protein-coupled receptors (GPCR) classified into two subtypes: D₁-like receptor subtypes (D₁, D₅), positively coupled to adenylyl cyclase (G_s), and D₂-like receptor subtypes (D₂, D₃, D₄), negatively coupled to adenylyl cyclase (G_i) [12]. Activation of D₁ receptor subtypes enhances phosphorylation of DARPP-32 at threonine 34

B. R. Souza · B. S. Motta · D. V. F. Rosa ·
K. C. L. Torres · A. M. Sampaio · F. F. Lima ·
M. A. Romano-Silva
Laboratório de Neurociências, Departamento de Saúde Mental,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais,
Av Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil

A. A. Castro · C. M. Comim · J. Quevedo
Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
Criciúma, SC 88806-000, Brazil

A. Jeromin
Center for Learning and Memory, University of Texas at Austin,
Austin, TX, USA

M. A. Romano-Silva (✉)
Departamento de Farmacologia – ICB, Universidade Federal de
Minas Gerais, Av Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG
CEP 31270-901, Brazil
e-mail: romano-silva@ufmg.br

through protein kinase A (PKA) activity [13–14]. This effect is counteracted by the action of D₂ receptors [15]. Since DARPP-32 phosphorylated at Thr34 inhibits protein phosphatase-1 (PP-1), it is a key downstream effector in transducing dopamine signal, integrating the signaling of different neurotransmitters and neuromodulators [16].

Another protein with altered expression in PFC of schizophrenic patients is Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS-1). It was demonstrated that both protein expression and mRNA levels of NCS-1 are upregulated in dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of schizophrenic subjects [17–18]. NCS-1 is a member of the EF-hand superfamily, which is a group of proteins that can bind to calcium and then be inserted into a lipid bilayer membrane anchoring the protein [19–21]. However, NCS-1 is not dependent on free Ca²⁺ to expose its N-terminal myristoyl tail [22], then it is predominantly localized in trans-Golgi network (TNG) and plasma membrane [23] in both pre and postsynaptic structures [24]. It is involved in several functions and one of them is inhibition of dopamine D₂ receptor desensitization [25]. Desensitization and internalization of a receptor is a process that reduces cell responsiveness to neurotransmitters [26]. D₂ receptor internalization is regulated by phosphorylation by G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and, only in its phosphorylated state, arrestin can bind to trigger sequestration [27]. However, NCS-1 forms a complex with GRK2 and D₂ receptors, inhibiting this receptor phosphorylation and consequently, inhibiting its internalization [25]. Recently, it was demonstrated that NCS-1 colocalizes with D₂ receptors in pre and post-synaptic structures of pyramidal neurons and interneurons in primate prefrontal cortex (PFC) [28].

Antipsychotics are drugs used in pharmacological treatment to reduce schizophrenia symptoms. According to their difference in receptor affinities and side effects, they are classified as typical and atypical. Typical antipsychotics, such as haloperidol (HAL), are D₂ antagonists with strong affinity and slow dissociation kinetics from the receptor, which is frequently associated with extrapyramidal effects [8, 29]. Atypical antipsychotics, such as clozapine (CLO) and olanzapine (OLZ) show reduced affinity to D₂ and are antagonists of serotonin receptors. Aripiprazole (Ari) is a partial agonist of D₂ receptors. Due to these properties, atypical antipsychotics show much lower levels of extrapyramidal effects [29]. Although it is well known that antipsychotics moderate schizophrenia symptoms, the molecular and biochemical mechanisms implicated in this improvement is not well established.

Because of the roles of both DARPP-32 and NCS-1 in dopaminergic signaling, which is the main target of antipsychotics, and their alterations in PFC of schizophrenia patients, our purpose was to study the effects of typical and atypical antipsychotics on the expression of DARPP-32 and NCS-1 in the prefrontal cortex (PFC), hippocampus

(HP), striatum (ST), cortex (CX) and cerebellum (CB) of male Wistar rats using western blot.

Experimental procedures

Animals

Male Wistar rats (2 months old) were obtained from our colony. Animals were housed five to a cage with food and water available *ad libitum*, and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care, with the approval of the local ethics committee.

Drugs and chemicals

LC-grade water was obtained from Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA. Haloperidol (Haldol[®]) was purchased from Cristália Prod. Quím. e Farmacêuticos, Itapira, Brazil. Clozapine (Leponex[®]) was purchased from Novartis Biociências AS, São Paulo, Brazil. Olanzapine (Zyprexa[®]) was provided from Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil. Aripiprazole (Abilify[®]) was purchased from Bristol-Myers Squibb, São Paulo, Brazil.

Pharmacological procedures

Animals received daily intraperitoneal (i.p.) injections of HAL (1.5 mg/kg), CLO (25 mg/kg), OLZ (2.5, 5 or 10 mg/kg) or Ari (2, 10 or 20 mg/kg) in a 1.0 ml/kg volume for 28 days. All the drugs were dissolved in Tween 1% solution (saline). Control animals received saline (1.0 ml/kg). Three days after the last injection [30–31], the rats were sacrificed by decapitation, and the prefrontal cortex (PFC), the hippocampus (HP), striatum (ST), cortex (CX) and cerebellum (CB) and were immediately removed.

Preparation of tissue sample

Tissue was incubated with lysis buffer (20 mM MOPS—pH 7, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 30 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerophosphate—pH 7.2, 20 mM pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 3 mM benzamidine, 10 μ M leupeptin e 0.5% Nonidet P40, final pH 7.2). Lysates were sonicated and incubated on ice for 30 min before

centrifugation at 13,000g for 20 min at 4°C. Supernatants were transferred to plastic tubes, protein was quantified [32] and extracts stored at −80°C.

Immunoblot

Equal amounts of protein (50 µg) of each sample was prepared for electrophoresis with sample buffer NuPAGE LDS (Invitrogen) plus 10% of β-mercaptoethanol and incubated at 70°C for 10 min. The samples were loaded into bis-Tris NuPAGE 4–12% gels (Invitrogen) and submitted to electrophoresis as recommended by the manufacturer, followed by transfer to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Protein loading and efficiency of blot transfer were monitored by staining with Ponceau S (Sigma Chemical Co., USA). The membranes were blocked for 45 min with TBS (tris-buffered saline, pH 7.4) Tween 20 0.1% plus non-fat milk 5%. Membrane blots were incubated with polyclonal anti-NCS-1 antibody (1:2,000—FL-190, Santa Cruz Biotechnology), polyclonal anti-DARPP-32 (1:500—H-62, Santa Cruz Biotechnology) and monoclonal anti-actin antibody (1:7,000—MAB1501R—Chemicon) diluted in TBS Tween 20 0.1% overnight at 4°C. Then, membranes were washed and incubated for 1 h at RT with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, goat anti-rabbit IgG (1:15,000) and goat anti-mouse IgG (1:7,000) (secondary antibodies were purchased from Molecular Probes). Membranes were submitted to chemiluminescent detection with ECL Plus (Amersham Biosciences) as described by manufacturer, and visualized on ImageQuant. Densitometric analysis was performed using Scion Image Software version Beta 4.0.2 (Scion Corporation, National Institutes of Health, USA).

Statistical analysis

All data are presented as means ± Standard Error of the Mean (SEM). Differences among experimental groups in experiments evaluating protein expression were determined by one-way ANOVA. In all experiments, *P*-values lower than 0.05 were considered to significant.

Results

DARPP-32 expression in brain regions of rats treated with antipsychotics

Adult male Wistar rats (2 months) were treated with SAL, HAL, CLO, OLZ (2.5, 5 or 10 mg/kg) or Ari (2, 10 or

20 mg/kg) for 28 days. Five different brain regions, PFC, HP, ST, CX and CB, were prepared to examine DARPP-32 protein expression after drug treatment and it was observed no changes in expression of this protein in brains of rats after chronic treatment with either typical or atypical antipsychotics (Fig. 1).

NCS-1 expression in brain regions of rats treated with antipsychotics

Adult male Wistar rats (2 months) were treated with SAL, HAL, CLO, OLZ (2.5, 5 or 10 mg/kg) or Ari (2, 10 or 20 mg/kg) for 28 days. After chronic treatment, five different brain regions, PFC, HP, ST, CX and CB, were prepared to examine NCS-1 protein expression. It was not observed any alteration in NCS-1 protein expression in brains of rats after chronic treatment with either typical or atypical antipsychotics (Fig. 2).

Discussion

Drugs that target D₂ receptors are commonly used in the treatment of subjects with schizophrenia [8], which is evidence of the involvement of dopaminergic signaling pathway in this psychopathology. However, although there are data showing that there are no changes in D₂ receptor expression in brains of schizophrenia patients [33], it was postulated that changes in receptor-associated signaling complex and second messengers might be involved with dopamine disturbance in these patients [9, 33].

DARPP-32 is a key downstream effector in transducing dopamine signaling, integrating the pathways of different neurotransmitters and neuromodulators [16]. Since it was showed that DARPP-32 is downregulated in PFC of schizophrenia subjects [10, 11] and that there are genetic variations associated with PFC cognitive functions [34], we did not find alterations in the expression of DARPP-32 in five brain regions, PFC, HP, ST, CX and CB, of rats after chronic treatment with typical or atypical antipsychotics. Our results of chronic treatment with typical antipsychotic was similar to that already observed in other studies with chronic treatment with haloperidol or a specific D₂ antagonist, raclopride [35, 36].

NCS-1 inhibits phosphorylation of dopamine D₂ receptor by GRK2 and consequently D₂-Arrestin-GRK2 complex formation, which is responsible for internalization and desensitization of D₂ [27, 37, 38]. Also it was reported a colocalization of NCS-1 and D₂ in PFC of primates [28]. Since it was previously shown that NCS-1 was upregulated in DLPFC of schizophrenic subjects [17, 18], we investigated the expression of this protein in five different brain

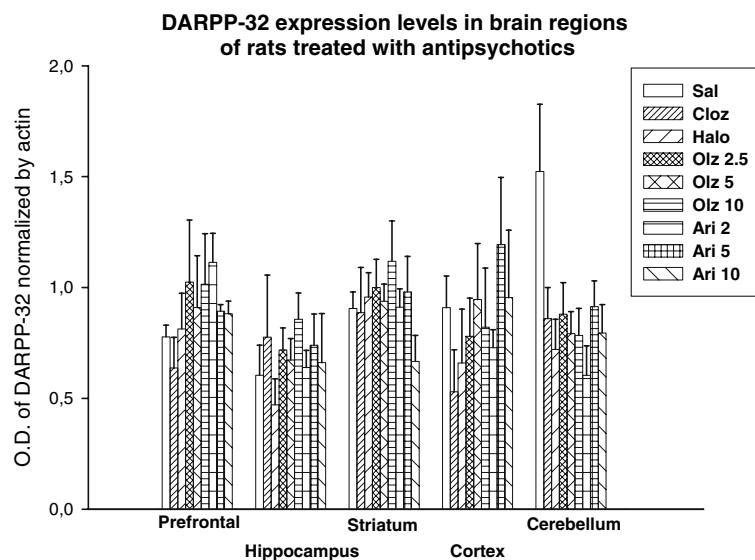


Fig. 1 Densitometry analyses of western blots showing the consequences of 28 days antipsychotic treatments on rats' prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HP), striatum (ST), cortex (CX) and cerebellum (CB). The results show that there are no alterations in DARPP-32 protein expression levels followed by chronic antipsychotic

administration. Results are presented in arbitrary units normalized by actin. Data represent means $\pm$ SEM. for duplicates of $n = 7$ and statistically analyzed using one-way ANOVA. Sal, saline; Cloz, clozapine; Hal, haloperidol; Olz, olanzapine (2.5, 5.0 and 10.0 mg/kg); Ari, aripiprazole (2.0, 5.0 and 10.0 mg/kg)

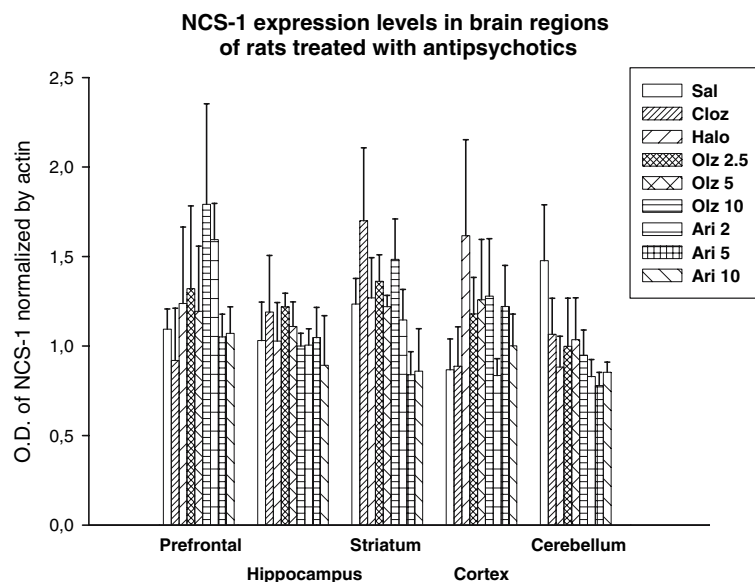


Fig. 2 Densitometry analyses of western blots showing the consequences of 28 days antipsychotic treatments on rats' prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HP), striatum (ST), cortex (CX) and cerebellum (CB). The results show that there are no alterations in NCS-1 protein expression levels followed by chronic antipsychotic administration.

Results are presented in arbitrary units normalized by actin. Data represent means $\pm$ SEM. for duplicates of $n = 7$ and statistically analyzed using one-way ANOVA. Sal, saline; Cloz, clozapine; Hal, haloperidol; Olz, olanzapine (2.5, 5.0 and 10.0 mg/kg); Ari, aripiprazole (2.0, 5.0 and 10.0 mg/kg)

regions, PFC, HP, ST, CX and CB, of rats after chronic treatment with typical or atypical antipsychotics. We observed that there was no significant different in the levels of NCS-1 in all brain regions after chronic antipsychotic treatment.

Although the results were negative in all brain regions studied, our findings allow the suggestion that both

downregulation of DARPP-32 and upregulation of NCS-1 reported to occur in the PFC of schizophrenia patients might be associated with the psychopathology of the disease and not with treatment with antipsychotic drugs. Taking into consideration that there is no good animal model able to mimic the major characteristics of schizophrenia, and of the limitations of postmortem studies in

humans, this is an idea difficult to be tested. Thus, only an extensive investigation of intracellular integrators and modulators will shed more light on the signaling mechanisms involved in this serious psychiatric disorder and its treatment.

Acknowledgements This research was supported by grants from Eli Lilly do Brazil, UNESC and CNPq.

References

- Giros B, Jaber M, Jones SR et al (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606–612
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563–593
- Lourenco GA, Dorce VA, Palermo-Neto J (2005) Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:271–277
- Kavelaars A, Cobelens PM, Teunis MA et al (2005) Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. *J Neuroimmunol* 161:162–168
- Seeman P (1992) Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 7:261–284
- Bergson C, Levenson R, Goldman-Rakic PS et al (2003) Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci* 24:486–492
- Foubister V (2002) Do all paths lead to DARPP-32? *Drug Discov Today* 7:1068–1070
- Mueser KT, McGurk SR (2004) Schizophrenia. *Lancet* 363:2063–2072
- Souza BR, Souza RP, Rosa DV et al (2006) Dopaminergic intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 8:95–100
- Albert KA, Hemmings HC Jr, Adamo AI et al (2002) Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59:705–712
- Ishikawa M, Mizukami K, Iwakiri M, Asada T (2007) Immunohistochemical and immunoblot analysis of Dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein, relative molecular mass 32,000 (DARPP-32) in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [Epub ahead of print]
- Stoof JC, Kebabian JW (1981) Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature* 294:366–368
- Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17:8147–8155
- Svenningsson P, Lindskog M, Ledent C et al (2000) Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1856–1860
- Lindskog M, Svenningsson P, Fredholm BB et al (1999) Activation of dopamine D2 receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. *Neuroscience* 88:1005–1008
- Svenningsson P, Nishi A, Fisone G et al (2004) DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:269–296
- Koh PO, Undie AS, Kabbani N et al (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:313–317
- Bai J, He F, Novikova SI et al (2004) Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol Psychiatry* 56:427–440
- Nakayama S, Moncrief ND, Kretsinger RH (1992) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *J Mol Evol* 34:416–448
- Nef S, Fiumelli H, de Castro E et al (1995) Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 15:365–378
- Ames JB, Ishima R, Tanaka T et al (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature* 389:198–202
- O'Callaghan DW, Ivings L, Weiss JL et al (2002) Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem* 277:14227–14237
- O'Callaghan DW, Burgoyne RD (2003) Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem Soc Trans* 31:963–965
- Martone ME, Edelmann VM, Ellisman MH et al (1999) Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res* 295:395–407
- Kabbani N, Negyessy L, Lin R et al (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22:8476–8486
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S et al (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95:489–502
- Iwata K, Ito K, Fukuzaki A et al (1999) Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem* 263:596–602
- Negyessy L, Goldman-Rakic PS (2005) Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 488:464–475
- Seeman P (2006) Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets* 10:515–531
- Reinke A, Martins MR, Lima MS et al (2004) Haloperidol and clozapine, but not olanzapine, induces oxidative stress in rat brain. *Neurosci Lett* 372:157–160
- Polydoro M, Schröder N, Lima MNM et al (2004) Haloperidol- and clozapine-induced oxidative stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 78:751–756
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bonci A, Hopf FW (2005) The dopamine D2 receptor: new surprises from an old friend. *Neuron* 47:335–338
- Meyer-Lindenberg A, Straub RE, Lipska BK et al (2007) Genetic evidence implicating DARPP-32 in human frontostriatal structure, function, and cognition. *J Clin Invest* 117:672–682
- Grebb JA, Girault JA, Ehrlich M et al (1990) Chronic treatment of rats with SCH-23390 or raclopride does not affect the concentrations of DARPP-32 or its mRNA in dopamine-innervated brain regions. *J Neurochem* 55:204–207

36. Guitart X, Nestler EJ (1992) Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in rat frontal cortex. *J Neurochem* 59:1164–1167
37. Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289–319
38. Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR et al (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem* 276:37409–37414

