

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Expressão de DARPP-32 e NCS-1  
em cérebros de ratos submetidos à  
estimulação eletroconvulsiva**

**Daniela Valadão Freitas Rosa**

**Orientador: Prof. Marco A. Romano-Silva**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BELO HORIZONTE – OUTUBRO/2005**

**Daniela Valadão Freitas Rosa**

**Expressão de DARPP-32 e NCS-1  
em cérebros de ratos submetidos à  
estimulação eletroconvulsiva**

Dissertação submetida ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de Grau de Mestre

Orientador: Marco Aurélio Romano-Silva

**Belo Horizonte  
Minas Gerais - Brasil  
2005**

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

Elzi Nascimento

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

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

**Dedico esta dissertação aos meus pais,**

**Anibal Freitas Rosa e Maria Lúcia Valadão**

**por transformar minha realidade em um sonho....**

# **Agradecimientos**

Ao Prof. Marco Aurélio pela credibilidade, oportunidade e orientação. Admiro muito seu trabalho.

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

Aos amigos do laboratório de Neurofarmacologia e de Farmacologia Bioquímica e Molecular. Na convivência acabamos adquirindo peculiaridades daqueles que nos rodeiam. Vocês fazem parte da minha história. Obrigada!

Aos meus “meninos”, à Livinha, ao Daniel e à Eliane pela paciência, atenção e por aguentarem com tanto carinho as brigas da tia Dany. Adoro e confio muito em vocês.

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

À Mell, pela receptividade, confiança, carinho e incentivo. Adoro você!

Ao Bruno Rezende, acho que estamos crescendo juntos e agradeço sempre a paciência e o carinho que você tem comigo. Aprendi muito com você e tenho certeza que seu futuro será brilhante. Te adoro !

À Aninha, quem é? Você tornou minha amiga, irmã, filha, presente no bom e mau humor. Tenho certeza que poderei contar sempre com você. Te amo!

Ao Stefany, aliás, qual a sua programação? Bom, tenho idéia da minha. Obrigada pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Renan, anjo da minha vida. Você tornou um grande e fiel amigo. Torço para a sua felicidade todos os dias. Tenho um carinho imenso por você! Vocês são muito importantes pra mim.

Aos meus irmãos, tia Vera e Omar, pelo apoio incondicional e por compreenderem a “distância”. A força, alegria e o incentivo de vocês foram fundamentais. Não vou citar nomes, “que família pequena”, mas saibam que cada um, com suas respectivas características, contribuíram e vão contribuir sempre para as minhas conquistas. Amo vocês !!!!!!!!!!!!!!!

À tia Aninha, por ser um eterno incentivo e me proporcionar a delícia de ser chamada de “dindinha”. Amo vocês!

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

À Andressa, por me aguentar no dia-a-dia e pela eterna força;

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

Aos meus pais, alicerces da minha vida, que contribuem sempre para que eu seja esta pessoa que vocês conhecem. Amo vocês mais que qualquer coisa !!!!

À Deus, pela vida !!!



# Sumário

<i>Lista de abreviaturas</i> .....	<i>IV</i>
<i>Lista de figuras</i> .....	<i>VI</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>VIII</i>
<b>1. Introdução</b>	
1.1 Eletroconvulsoterapia .....	2
1.2 Transmissão dopaminérgica .....	7
1.3 DARPP-32 .....	11
1.4 NCS-1 .....	16
<b>2. Objetivos</b>	
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3. Material e Métodos</b>	
3.1 Estimulação eletroconvulsiva .....	21
3.2 Produção de extrato protéico de tecidos .....	21
3.3 Dosagem de proteínas .....	22
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	22
3.5 Imunoblots .....	23
3.6 Análise dos imunoblots.....	23
<b>4. Resultados</b>	
4.1 Expressão de DARPP-32 e NCS-1 <i>no striatum</i> .....	25
4.2 Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no córtex.....	26

4.3 Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no hipocampo .....	27
4.4 Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no cerebelo .....	28
<b>5. Discussão</b>	
5.1 Efeito da estimulação eletroconvulsiva na expressão de DARPP-32.....	30
5.2 Efeito da estimulação eletroconvulsiva na expressão de NCS-1.....	35
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>37</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>39</b>

## Lista de abreviaturas

AC	Adenilato ciclase
AAAD	Descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos
AMPA	Alfa-amino-3-hidróxido-5-metil-isoxazole-propionato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
Cdk-5	Quinase dependente de ciclina 5
CK	Caseína quinase
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CREB	Elemento ligante responsivo a AMPc
Da	Dalton
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 KDa
DAT	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
EEC	Estimulação eletroconvulsiva
ECT	Eletroconvulsoterapia
FGF-2	Fator de crescimento para fibroblasto
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GRK2	Proteína quinase 2 acoplada à proteína G
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potencial de longa duração
MAO	Monoamino oxidase
NMDA	N-metil-D-aspartato
NCS-1	Sensora de cálcio neuronal 1
NGF	Fator de crescimento neuronal
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS	Tampão fosfato salino
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PP	Proteína fosfatase
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
Ser	Serina
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TH	Tirosina hidroxilase
Thr	Treonina
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b>	Vias dopaminérgicas .....	07
<b>Figura 2:</b>	Vias de síntese e degradação da dopamina .....	08
<b>Figura 3:</b>	Modulação da adenilato ciclase mediada por receptores dopaminérgicos .....	09
<b>Figura 4:</b>	Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos .....	11
<b>Figura 5:</b>	Sítos de fosforilação da DARPP-32.....	12
<b>Figura 6:</b>	Mecanismos de integração envolvidos na sinalização dopaminérgica e glutamatérgica via cascatas quinase/fosfatase.	13
<b>Figura 7:</b>	Modulação de GRK2/ D2 por NCS-1.....	17
<b>Figura 8:</b>	Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em <i>striatum</i> de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo e ao tratamento crônico	25
<b>Figura 9:</b>	Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em córtex de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo e ao tratamento crônico..	26
<b>Figura 10:</b>	Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em hipocampo de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo e ao tratamento crônico. ....	27
<b>Figura 11:</b>	Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em cerebelo de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo e ao tratamento crônico	28

<b>Figura 12:</b>	Níveis de proteicos e de RNAm de DARPP-32 em cérebros de ratos.....	31
<b>Figura 13:</b>	Vias pelas quais a transmissão serotoninérgica pode regular o estado de fosforilação da DARPP-32.....	32
<b>Figura 14:</b>	Via de modulação CREB por BDNF. A ativação de CREB está envolvida no aumento dos níveis de DARPP-32.....	34

# **Resumo**



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

Indução de convulsões na forma de ECT tem sido usada no tratamento de desordens psiquiátricas por mais de 60 anos. As principais indicações diagnósticas incluem depressão, mania, catatonia e esquizofrenia. Devido às dificuldades na identificação dos mecanismos de ação da ECT, têm-se usado a estimulação eletroconvulsiva (EEC) aplicada experimentalmente a animais com o intuito de obter dados que contribuam para explicar alguns efeitos terapêuticos da ECT. Há relatos de alteração nos níveis das proteínas DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina) e NCS-1 (sensora neuronal de cálcio 1) em pacientes com transtornos neuropsiquiátricos.

Neste trabalho foram avaliados os níveis de expressão das proteínas DARPP-32 e NCS-1 em quatro regiões cerebrais (*striatum*, córtex, hipocampo e cerebelo) de ratos submetidos ao choque eletroconvulsivo agudo e crônico. A estimulação eletroconvulsiva aguda gerou aumento na expressão de DARPP-32 no córtex. É interessante notar que nessa área as alterações foram observadas logo após a realização do estímulo e após 24 horas sendo essa sustentada até às 48 horas. Nas outras áreas avaliadas (*striatum*, hipocampo e cerebelo) não foram observadas alterações significativas. Tais achados corroboram a ausência de eficácia dessa terapêutica de modo agudo usualmente.

A estimulação crônica provocou alterações significativas em todas as áreas estudadas, o que está de acordo com a utilização de repetidas sessões desta técnica na clínica. A estimulação eletroconvulsiva aguda gerou somente alterações pontuais nos níveis de NCS-1 no córtex (diminuição em 48 horas), hipocampo (diminuição em 03 horas) e cerebelo (aumento em 3 horas). A estimulação crônica gerou modificações importantes no *striatum* e córtex, cerebelo. No *striatum*, aumento é notado logo após do último estímulo e a partir de 03 horas até às 24 horas. No córtex e cerebelo, o aumento é evidente de 12 horas até às 48 horas. Tais dados, assim como os obtidos para DARPP-32, mostram uma maior eficiência da terapia crônica em relação à aguda e uma dinâmica temporal que favorece a aplicação da técnica num intervalo de 2-3 dias (tempo pelo qual manteve-se os níveis elevados das proteínas).

# **1-Introdução**

## 1.1 - Eletroconvulsoterapia

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

- febre induzida por malária, para tratar neurosífilis, descoberta em Viena por Julius Wagner-Jauregg, em 1917;

- coma e convulsões induzidas por insulina, para tratar esquizofrenia, descoberto em Berlim por Manfred J. Sakel, em 1927;

- convulsões induzidas por metrazol, para tratar esquizofrenia e psicoses afetivas, descoberta em Budapeste por Ladislaus von Meduna, em 1934;

- terapia por choque eletroconvulsivo, descoberta por Ugo Cerletti e Lucio Bini em Roma, em 1938.

Cerletti descobriu que os choques elétricos gerados na eletroconvulsoterapia (ECT) tornavam os pacientes difíceis e obsessivos em dóceis e controláveis (Royal College of Psychiatrists, 1989). O uso desta técnica difundiu-se rapidamente e nas duas primeiras décadas do século XX houve uma progressiva aceitação e refinamento na aplicação. Inicialmente, a ECT era realizada com o paciente consciente, sem uso de anestesia ou relaxante muscular. Havia perda da consciência durante a aplicação da corrente, e os pacientes apresentavam contrações musculares incontroláveis e, com frequência, quebravam ossos, especialmente vértebras, e apresentavam distensão muscular devido às convulsões violentas induzidas pelo choque. Em 1939, Walter Freeman sugeriu que o curare poderia ser usado para reduzir as taxas de fraturas associadas à ECT, e em seguida logo se incorporou o uso sistemático de anestésicos gerais.

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

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

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

A aplicação da técnica muitas vezes é decisiva para a vida do paciente, evitando o suicídio por tratar com grande eficácia a depressão grave (The UK ECT Review Group, 2003). Cerca de 5% dos pacientes depressivos não respondem a qualquer medida farmacológica e/ou psicoterápica (Post, 1999). Para esses pacientes, a ECT constitui uma importante oportunidade de melhora. Além disso, quadros depressivos graves com psicose respondem melhor a ECT que a farmacoterapia (Pande *e cols.*, 1990; Parker *e cols.*, 1992; The UK ECT Review Group, 2003). Estudos demonstram que a utilização da ECT diminui o tempo de internação e custos com o tratamento (Olfson *e cols.*, 1998), dados relevantes considerando a realidade de saúde pública do Brasil.

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

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

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

Evidências sugerem que a EEC altera as concentrações de neurotrofinas em algumas regiões do cérebro. Os fatores neurotróficos são proteínas que estão envolvidas na sobrevivência neuronal e plasticidade de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos no SNC e, provavelmente, exercem importante papel na fisiopatologia e tratamento da depressão (Angelucci e cols., 2003), caracterizando um alvo importante no mecanismo de ação da ECT.

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

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

Sugere-se que problemas com proteínas envolvidas na matriz estrutural das sinapses (como as sinapsinas) podem ocorrer na esquizofrenia, uma das indicações da ECT, levando a um número reduzido de vesículas sinápticas, formação sináptica aberrante e retardo ou redução na formação das sinapses (Stahl, 2002). Estímulos elétricos induzem a ativação de proteínas de regulação associadas ao citoesqueleto. A sinapsina é uma destas proteínas e é fosforilada por várias proteínas quinases. A EEC induz uma mudança bidirecional na fosforilação da sinapsina. Imediatamente após a convulsão, ocorre um rápido aumento na desfosforilação da sinapsina, o que implica uma maior rigidez na organização da actina-citoesqueleto, que modula a liberação de vesículas sinápticas. Esse fato impede que ocorra uma liberação maciça de neurotransmissores na fenda sináptica, provocada pela EEC, promovendo assim, um efeito protetor. No entanto, alguns minutos após a convulsão, ocorre um aumento na fosforilação da sinapsina, desaparecendo a rede de actina, aumentando a liberação de neurotransmissores e, possivelmente, induzindo plasticidade neuronal, tal como uma reorganização sináptica (Kondratyev *e cols.*, 2001).

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

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

Recentemente, dois grupos relataram resultados de experimentos realizados em amostras de cérebro de indivíduos esquizofrênicos, onde a expressão de duas proteínas moduladoras da sinalização celular foi investigada. Em ambos a área estudada foi a região dorsolateral do córtex pré-frontal. No primeiro, publicado em 2002 no *Archives of General Psychiatry* pelo grupo de Paul Greengard (Albert *e cols.*, 2002), a quantidade de DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina – peso molecular 32kDa) e de outras proteínas neuronais foi medida por *imunoblot* em amostras *post-mortem* de cérebros de indivíduos esquizofrênicos, que tiveram idade, sexo e tempo de autólise pareados com controles. Foram pareados também indivíduos em uso de neurolépticos mas não esquizofrênicos, nesse caso com Doença de Alzheimer, com a finalidade de afastar possíveis influências do uso dessas drogas. Demonstraram que a DARPP-32 estava significativamente reduzida na região dorsolateral do córtex pré-frontal em mais esquizofrênicos que indivíduos controles pareados. As demais proteínas estudadas, sinapsina I e subunidade alfa da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, não estavam alteradas.

O outro trabalho, publicado em 2003 no *Proceedings of National Academy of Sciences*, USA, descreve resultados obtidos de amostras de cérebros de indivíduos esquizofrênicos, bipolares e controles normais, provenientes do banco de cérebros do Consórcio de Neuropatologia da *Stanley Foundation* (Koh *e cols.*, 2003). Eles encontraram um aumento maior que 50% nos níveis de NCS-1 (neuronal sensora de cálcio-1) na região dorsolateral do córtex pré-frontal 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.

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

## 1.2- Transmissão dopaminérgica

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

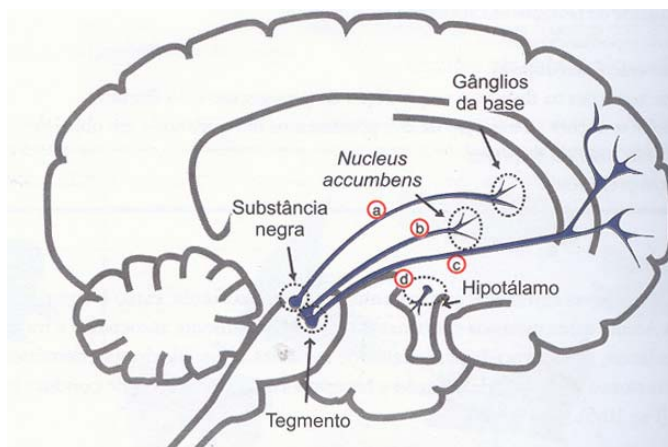
Diferente de outros sistemas de neurotransmissão, que são encontrados difusamente no sistema nervoso central, a dopamina se distribui de maneira circunscrita (Glenthoj, 1995) no SNC e também no sistema nervoso periférico. As principais projeções são apresentadas a seguir e ilustradas na figura 1:

- via mesolímbica - projeta-se dos corpos celulares da área tegumentar ventral do mesencéfalo para os axônios terminais das áreas límbicas do cérebro, como o núcleo acumbens;

- via mesocortical - os corpos celulares desta via surgem na área tegumentar ventral, próximo aos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica, e projetam-se para áreas do córtex cerebral, particularmente do córtex límbico;

- via nigroestriatal - projeta-se dos corpos celulares da substância negra do mesencéfalo por meio de axônios que terminam nos gânglios da base ou *striatum*;

- via túbero-infundibular- projeta do hipotálamo para a glândula pituitária anterior.

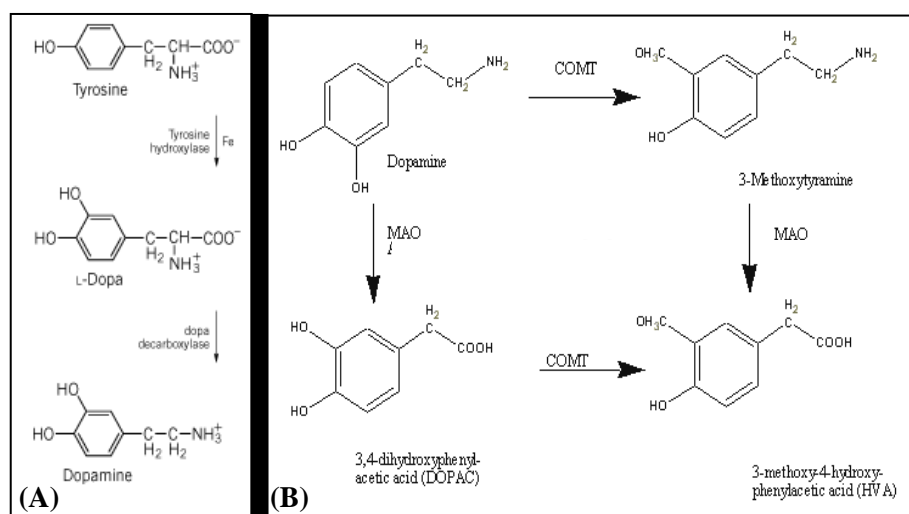


**Figura 1:** As quatro vias dopaminérgicas. (a) via nigroestriatal, (b) via mesolímbica, (c) via mesocortical, (d) via túbero-infundibular. Modificado de Stahl, 2002.



A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico sintetizado a partir de tirosina por duas reações sequenciais catalizadas pelas enzimas tirosina hidroxilase (TH) (formação de 3,4-dihidroxiifenilalanina ou L-DOPA) e descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (AAAD) (Figura 2A). A dopamina livre no citosol é rapidamente captada pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT) que utiliza um gradiente eletroquímico de prótons para transportá-la para o interior das vesículas, sendo que este apresenta duas isoformas: VMAT-1, presente na periferia, e VMAT-2, localizado em estruturas do SNC (Erickson *e cols.*, 1992). As vesículas contendo o neurotransmissor fundem-se à membrana do neurônio pré-sináptico, após influxo de cálcio pelos canais de cálcio sensíveis a voltagem (Staal *e cols.*, 2004).

Após a liberação e interação da dopamina com receptores pós-sinápticos específicos ocorre a recaptção pelo transportador de dopamina (DAT) e posterior degradação, no citosol, em produtos inativos (figura 2B) pela monoamino oxidase (MAO) e pela catecol-O-metil-transferase (COMT). Esses produtos são 3-metoxitiramina, ácido dihidroxiifenilacético e o ácido homovanílico (Thorpe *e cols.*, 1987)

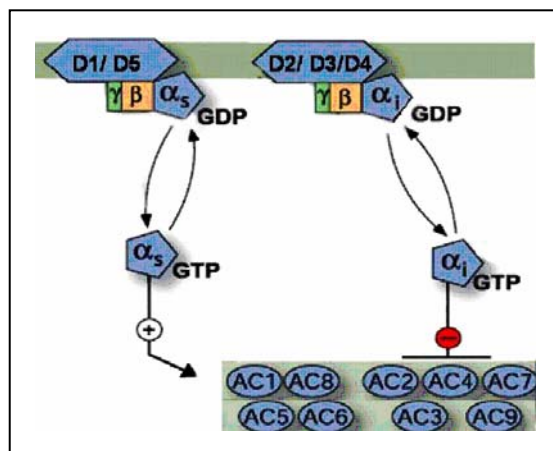


**Figura 2:** Vias de síntese (2A) e degradação (2B) da dopamina

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

técnicas de biologia molecular possibilitaram a identificação de mais três tipos: D3, D4 e D5. Avaliando-se as propriedades bioquímicas, estruturais e farmacológicas *in vitro* e *in vivo* estes foram agrupados em duas famílias: receptores do tipo D1 (D1 e D5) e receptores do tipo D2 (D2, D3 e D4) (Levant, 1997).

Os receptores do tipo D1 são acoplados a proteína  $G_s\alpha/G_{olf}\alpha$  (figura 3) que ativam a adenilato ciclase (AC) resultando no aumento dos níveis intracelulares do AMPc, já os do tipo D2 estão acoplados a  $G_i\alpha/G_o\alpha$  gerando inativação desta enzima e redução dos níveis de AMPc (Missale *e cols.*, 1998; Vallone *e cols.*, 2000).



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

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

Disfunções desse neurotransmissor estão relacionadas com diversos transtornos neuropsiquiátricos. Estudos demonstrando que a maior parte da dopamina cerebral está confinada aos gânglios basais levaram a hipótese que essa estaria envolvida com o controle motor e que uma diminuição dos níveis estriatais dessa amina poderia ser a causa de sintomas extrapiramidais na doença de Parkinson (Kish *e cols.*, 1988). A descoberta de profundas reduções de dopamina no *striatum* de pacientes com Parkinson e a demonstração que L-DOPA tem efeitos benéficos nesses pacientes substanciou a relevância clínica dessa

teoria (Walton-Hadlock, 2005). Tal redução deve-se a degeneração dos neurônios capazes de sintetizá-la, presentes na substância negra (Lang e Lozano, 1996).

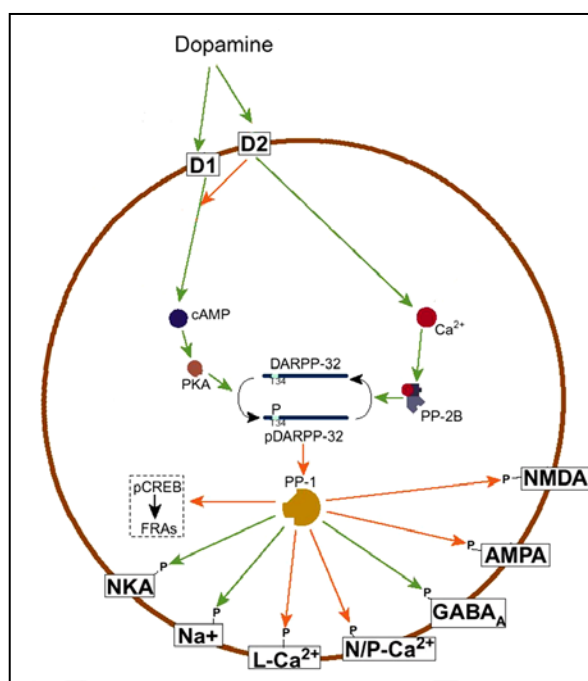
O transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é outra manifestação clínica cuja etiologia é creditada a um desbalanço em sistemas de neurotransmissão, entre eles o dopaminérgico. O tratamento deste é feito com fármacos que aumentam os níveis dopaminérgicos na fenda sináptica e, paradoxalmente, acalmam os pacientes (Seiden *e cols.*, 1993; Russell *e cols.*, 2000).

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

Outros quadros clínicos como depressão maior, depressão bipolar, alcoolismo, transtorno do pânico, dependência de drogas e déficits cognitivos estão também associados com perturbações nesse sistema (Nass e Bressman, 2002; Tsuang *e cols.*, 2004; Tupala e Tiihonen, 2004). Vias ainda não elucidadas na sinalização do sistema dopaminérgico podem gerar uma melhor compreensão quanto ao mecanismo responsável por essas patologias e, conseqüentemente, à proposição de novos alvos farmacológicos (Suo *e cols.*, 2004).

### 1.3 – DARPP-32

Uma proteína, descoberta por S. Ivar Walaas e Dana W. Aswad (Walaas, Aswad e Greengard, 1983) e extensivamente estudada desde então, DARPP-32 (fosfoproteína regulada por AMPc e dopamina peso molecular-32 kDa), tem 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). Localiza-se em neurônios que possuem receptores dopaminérgicos sendo identificada como o maior alvo dos produtos da adenilato ciclase ativada por dopamina no estriato (Wallas *e cols.*, 1983) (figura 4).

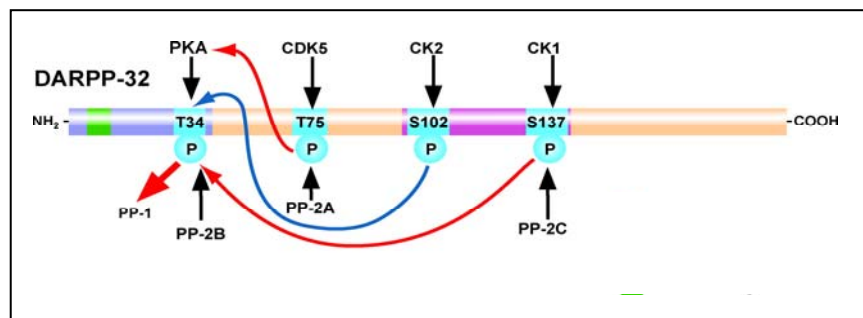


**Figura 4:** Sinalização dopaminérgica em neurônios pós-sinápticos (modificado de Greengard, 2001)

Existindo disponibilidade de AMPc, ocorre ativação da proteína quinase sensível a AMPc (PKA) que por sua vez atua fosforilando a DARPP-32 no resíduo de treonina na posição 34 (Thr<sup>34</sup>) (figura 5), passando a atuar como potente inibidor da proteína fosfatase 1 (PP-1) (Yan *e cols.*, 1999). Além da Thr<sup>34</sup>, essa fosfoproteína apresenta outros três sítios de fosforilação:

- treonina na posição 75 (Thr<sup>75</sup>), que ao ser fosforilada pela quinase dependente de ciclina 5 (Cdk-5) provoca inibição de PKA;
- serina na posição 102 (Ser<sup>102</sup>), que fosforilada pela caseína quinase 2 (CK-2) favorece a fosforilação da Thr<sup>34</sup> pela PKA;
- serina na posição 137 (Ser<sup>137</sup>), fosforilada pela caseína quinase 1 (CK-1) passa a inibir a atividade da proteína fosfatase 2B (PP-2B) sobre o resíduo Thr<sup>34</sup> (King *e cols.*, 1984; Girault *e cols.*, 1989; Desdouits *e cols.*, 1998; Bibb *e cols.*, 1999; Nishi *e cols.*, 1999).

A PP1, cuja atividade é modulada pela DARPP-32, é capaz de regular o estado de ativação de diversos canais iônicos, receptores e fatores de regulação da transcrição gênica (Greengard *e cols.*, 1999; Hsieh-Wilson *e cols.*, 1999).



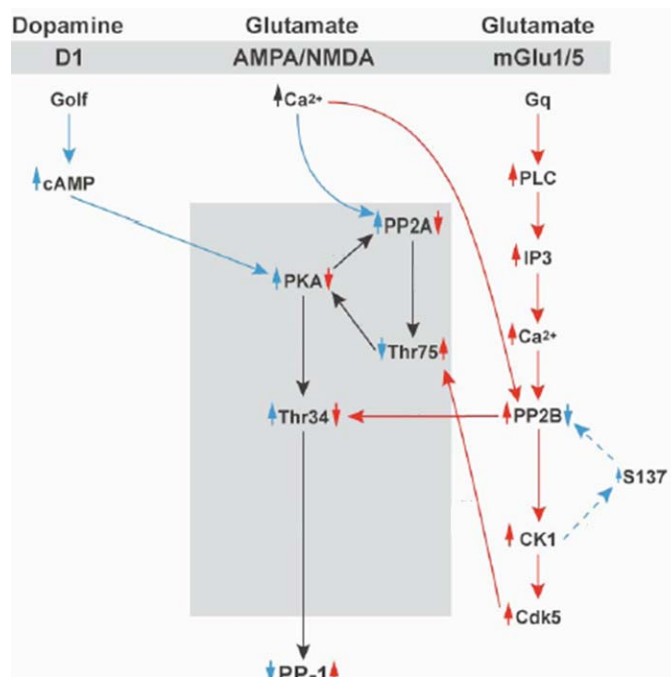
**Figura 5:** Sítios de fosforilação da DARPP-32 (adaptado de Svenningsson *e cols.*, 2004). Em vermelho são indicadas vias inibitórias e em azul as estimulatórias.

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

Mudanças a longo prazo na plasticidade sináptica geram alterações na transcrição gênica que são importantes para manutenção das adaptações moleculares e início das adaptações morfológicas. Há evidências de que a regulação da transcrição gênica envolve fosforilação alterada de fatores de transcrição, e consequente modulação de sua atividade

(Hyman *e cols.*, 2001). Perturbações nos sistemas de neurotransmissores contribuem para a etiologia de várias desordens neuropsiquiátricas. Os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico parecem ser alvos primários para a maioria das medicações usadas no tratamento destes transtornos psiquiátricos (Parsons *e cols.*, 2000). Estudos detalhados com animais têm demonstrado que a serotonina causa um aumento da fosforilação na Thr<sup>34</sup> e Ser<sup>137</sup> e diminuição na Thr<sup>75</sup> da DARPP-32 (Sveningsson, *e cols.*, 2002). As ações da serotonina na fosforilação da Thr<sup>34</sup> e Thr<sup>75</sup> são mediadas primariamente pela ativação de receptores 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>6</sub>, enquanto a regulação da Ser<sup>137</sup> é mediada primariamente via receptores 5-HT<sub>2</sub>. Esses três caminhos parecem inibir PP-1 através de mecanismos sinérgicos.

Glutamato e GABA são os principais neurotransmissores que controlam a fosforilação da DARPP-32 estriatal. O principal efeito anti-dopaminérgico do glutamato é a desfosforilação da DARPP-32 na Thr<sup>34</sup>, através da ativação da PP-2B induzida pelos receptores NMDA/AMPA (figura 6).



**Figura 6:** Mecanismos de integração envolvidos na sinalização dopaminérgica e glutamatérgica via cascatas quinase/fosfatase. Etapas da regulação da cascata PKA/PP-2A/Thr<sup>75</sup>-DARPP-32/PKA/Thr<sup>34</sup>-DARPP-32 que são pró-dopaminérgicas estão indicadas com setas azuis e as que são anti-dopaminérgicas com setas vermelhas (modificado de Greengard, 2001).

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

- receptores NMDA-AMPA/Ca<sup>2+</sup>/PP-2A/desfosforilação da DARPP-32 na Thr<sup>75</sup>;
- favorecer a formação de AMPc acoplado ao receptor A<sub>2A</sub> mediada pela ativação de receptores mGlu5;
- aumentar a fosforilação na Ser<sup>137</sup> da DARPP-32 mediada através da ativação induzida do receptor mGlu da CK1 (Nishi *et cols.*, 2003).

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

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

Mostrou-se que o tratamento com vários antidepressivos, incluindo fluoxetina, favorece a eficácia da sinalização de PKA em vários níveis diferentes no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo acumbens (Nestler *et cols.*, 2002). O tratamento agudo e crônico com fluoxetina causou um aumento na fosforilação da DARPP-32 na Thr<sup>34</sup> e uma diminuição na fosforilação da Thr<sup>75</sup> no hipocampo, córtex frontal e estriato (Svenningsson *et cols.*, 2002).

A L-DOPA permanece como o tratamento farmacológico mais efetivo para Doença de Parkinson. Evidências apontam para o envolvimento da DARPP-32 nos mecanismos da geração de discinesia induzida por L-DOPA (Picconi *et cols.*, 2003). Relatou-se que neurônios estriatais de ratos discinéticos não mostram despotenciação em resposta à estimulação de baixa frequência de aferentes corticais. Falta de despotenciação pode refletir um estado alterado de transmissão sináptica estriatal, que pode produzir discinesia. A

despotenciação é bloqueada pela ativação de receptores D<sub>1</sub>, bem como por inibição de PP-1 (Picconi *e cols.*, 2003). Animais discinéticos apresentam anormalmente altos níveis de fosforilação na Thr<sup>34</sup> (Picconi *e cols.*, 2003). Baseado nestes dados, sugere-se que a discinesia pode resultar de mudanças específicas ocorridas ao longo da sinalização dopaminérgica D<sub>1</sub>, levando a um aumento da fosforilação da Thr<sup>34</sup>, aumentando a inibição da atividade de PP-1 e perda de despotenciação.

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

- Etanol: a DARPP-32 está envolvida nas respostas agudas e a longo prazo ao etanol. Tem sido proposto que o envolvimento da DARPP-32 na dependência ao etanol depende da habilidade dela em regular o estado de fosforilação do receptor NMDA. Dopamina, via receptores D<sub>1</sub>, estimula fosforilação mediada por PKA da subunidade NR1 do receptor NMDA na Ser<sup>897</sup> e reduz a sensibilidade ao etanol do receptor NMDA (Maldve *e cols.*, 2002). Estas observações indicam que a DARPP-32 pode mediar o reforço por reduzir a fosforilação de receptores NMDA e, conseqüentemente, por prevenir a sensibilidade ao etanol.

- Cafeína: há fortes evidências para o envolvimento da DARPP-32 nas ações estimulatórias da cafeína. Administração sistêmica de cafeína, ou de SCH58261, um antagonista seletivo do receptor A<sub>2A</sub>, causa aumento na fosforilação da Thr<sup>75</sup> em camundongos selvagens (Lindskog, *e cols.*, 2002).

- Cocaína e anfetaminas: o tratamento agudo com cocaína ou anfetamina aumenta a fosforilação da Thr<sup>34</sup> e diminui a fosforilação da Thr<sup>75</sup> (Nishi *e cols.*, 2000). Tratamento com cocaína e anfetamina também aumenta o estado de fosforilação de CREB, ELK e múltiplos genes de expressão imediata (Nestler *e cols.*, 2001). Entretanto, tratamento crônico com cocaína leva ao aumento da fosforilação da Thr<sup>75</sup> e diminuição da Thr<sup>34</sup> (Bibb *e cols.*, 2001).

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



## 1.4 – NCS-1

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

O processo de transdução espaço-temporal do sinal de cálcio em funções específicas intracelulares e 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 pertence a uma família de proteínas do tipo “*EF-hand*” apresentando 4 sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , um grupo miristoil capaz de interagir com membranas e regiões de associação com quinases e outras proteínas (Bourne *e cols.*, 2000). Tanto a NCS-1 quanto sua ortóloga frequenina encontrada em *Drosófila sp.* são capazes de:

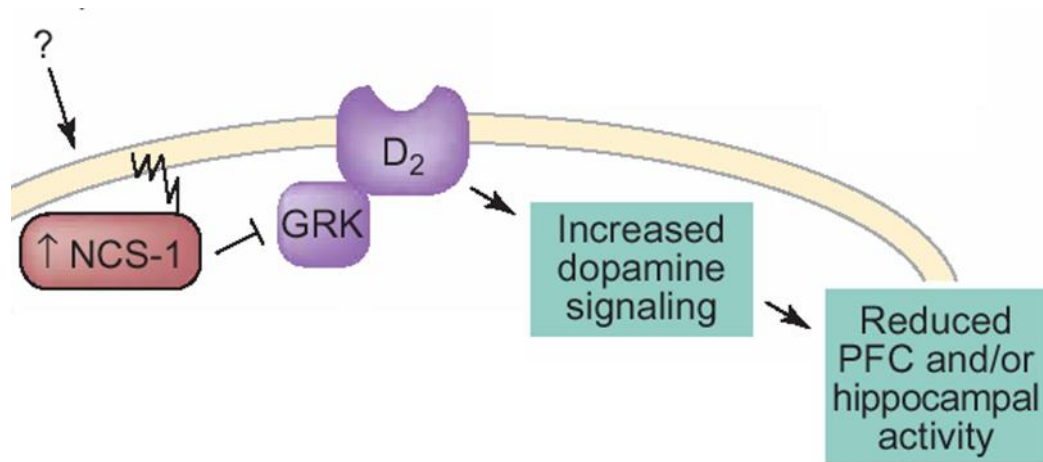
- regular a exocitose de neurotransmissores e agentes secretórios;
- controlar o tráfego de proteínas celulares e modular a atividade de canais iônicos, como os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e os canais de  $\text{K}^+$ ;
- modular alguns processos de plasticidade celular (Pongs *e cols.*, 1993; Nakamura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

Evidências sugerem o envolvimento da NCS-1 no processo de facilitação da neurotransmissão e, possivelmente, em certos transtornos do sistema nervoso, como a esquizofrenia e o distúrbio bipolar.

Trabalhos têm mostrado que a NCS-1 ocupa uma posição “chave” 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, dessensibilizar receptores de dopamina D<sub>2</sub>, ativar a fosfatidilinositol 4-hidroxiquinase-β do tipo III (PI4Kβ-III) dentre outras (Rajebhosale e cols., 2003).

Em 2003, Koh *e cols.*, mostraram que a NCS-1 encontra-se superexpressa no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos e bipolares pós-morte (Koh e cols., 2003). Naquele mesmo ano, Kabbani *e cols.* mostraram que a NCS-1 forma complexos com a proteína quinase-2 acoplada à proteína G (GRK2) e com o receptor de dopamina (D<sub>2</sub>), regulando, assim, a dessensibilização do receptor D<sub>2</sub> ativado (Kabbani *e cols.*, 2002) (figura 7). Essa associação entre os altos níveis da NCS-1 encontrada em pacientes esquizofrênicos e bipolares e a regulação da atividade dos receptores D<sub>2</sub> favorecem, assim, a hipótese do envolvimento da NCS-1 em distúrbios neurológicos e psiquiátricos.



**Figura 7:** Modulação de GRK2/ D2 por NCS-1(modificado de Braunewell, 2005)

Em 2005, Negyessy e Goldman-Racik reportaram, em córtex pré-frontal de primatas, a localização ultraestrutural de D<sub>2</sub> e compararam com a NCS-1. Foi observada imunoreatividade abundante em estruturas pré e pós-sinápticas, nas quais também estava colocalizada com D<sub>2</sub>. Relatou-se, também, a coexistência de NCS-1 e D<sub>2</sub> (Negyessy e Goldman-Racik, 2005). Estes dados corroboram com a idéia de um papel da NCS-1 na dessensibilização de D<sub>2</sub> no córtex pré-frontal.

## **2 – Objetivos**

### **Objetivo geral**

- avaliar os níveis de expressão da DARPP-32 e da NCS-1 em ratos submetidos ao choque eletroconvulsivo.

### **Objetivos específicos**

- estudar o impacto da estimulação eletroconvulsiva na expressão de DARPP-32 e NCS-1 em diferentes regiões cerebrais de ratos;
- analisar o papel da estimulação eletroconvulsiva aguda e crônica sobre a expressão de DARPP-32 e NCS-1 em cérebros de ratos;
- avaliar a dinâmica temporal da expressão de DARPP-32 e NCS-1 após a estimulação eletroconvulsiva.

## **3– Material e métodos**

### 3.1 – Estimulação eletroconvulsiva

Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 (sessenta) dias de vida. Os procedimentos foram realizados com os ratos previamente anestesiados com tiopental (60mg/Kg i.p.) e relaxante muscular (cloridrato de d-tubocurarina 4mg/Kg i.p.) para evitar dor e sofrimento físico ou psicológico durante os procedimentos. Houve aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Com base em estudos prévios em modelos animais, para uma diferença de 10% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra de 5 ratos por grupo, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. Foram então computados 40 ratos adicionais (25%), prevendo a mortalidade no modelo animal.

Para o eletrochoque utilizou-se aparato que produz uma corrente elétrica (150V, 60HZ) através de eletrodos (clipes) bilaterais fixados previamente nas orelhas dos animais, durante dois segundos. Cada estimulação produz uma convulsão tônico-clônica. Foram utilizados dois protocolos: agudo e crônico. Agudo – uma única sessão de EEC. Crônico – oito sessões de EEC, distribuídas ao longo de 16 dias. O procedimento do eletrochoque foi realizado pela equipe do Professor João Quevedo, do Laboratório de Neurociências, da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

A coleta do material biológico foi efetuada em diferentes tempos após a última sessão de EEC (única no caso agudo): imediatamente e após, 30 minutos, 03 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas. Os animais foram anestesiados com tionembutal (30mg/Kg, i.p.) e sacrificados por decaptação; os cérebros foram removidos e fracionados nas áreas cerebrais de interesse (hipocampo, *striatum*, córtex e cerebelo) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram armazenados a  $-80^{\circ}$  C.

### 3.2 - Produção de extrato protéico de tecidos

Amostras de diferentes regiões cerebrais foram lavadas em PBS 1x (58mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 17mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 68mM NaCl, pH 7.4) e, posteriormente, incubados em tampão de lise (20mM Tris pH 8,0, 137mM NaCl, 0,5mM ortovanadato de sódio, 2mM

ácido okadáico, 10% glicerol, 1% Nonidet P40, 2% de coquetel de inibidores de protease) e sonicados por pulsos de 1 segundo. Após uma hora, centrigou-se a amostra a 1000xg a 4 °C por 20 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado.

### **3.3 - Dosagem de proteína**

Para a quantificação protéica foi utilizado o método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Entre 0,2 e 1,0µL de extrato protéico foram adicionados a 1,0mL de solução de NaCl 0,15M e 1,0mL de reagente de Bradford. O reagente de Bradford continha 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. Então, 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 - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

Realizou-se eletroforeses em gel de poliacrilamida desnaturante de acordo com Laemmli (Laemmli *e cols.*, 1970). O gel de separação consistia de 15% (v/v) de acrilamida/ bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,4M, pH 8.8; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amônio 50mM e TEMED 0,05% (v/v). Já o gel de concentração consistia de 4% (v/v) de acrilamida/ bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 0,125M, pH 6.8; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amônio 4mM e TEMED 0,025% (v/v). O tampão de corrida continha Tris-Hcl 0,025M, pH8.3; glicina 0,192M e SDS 0,1% (p/v). O tampão de amostra era composto de SDS 0,2% (p/v), glicerol 0,2% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v), azul de bromofenol 0,0001% (p/v) e Tris-Hcl 12,5mM, pH6.8.

### 3.5 - Immunoblots

O *western blot* foi realizado como descrito por Towbin (Towbin *e cols.*, 1979). Ao término da eletroforese, o gel foi lavado com tampão de transferência (Tris 48mM; glicina 39mM; metanol 20% (v/v); 0,013mM SDS) e montado um sanduiche com papéis de filtro e uma membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham Biosciences). A transferência foi realizada a 24V, 80mA por 8-12 horas. Ao fim da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau - Ponceau S 1% (p/v); ácido acético 10% (v/v) - por 3 minutos em agitação constante e descorada com água deionizada.

A membrana foi incubada por uma hora com solução de bloqueio (PBS 1X; Tween 20 0,5% (v/v); leite desnatado em pó 5% (p/v)). Em seguida, incubou-se as membranas por 2 horas com anticorpos anti-actina (1:2000- Chemicon), anti-DARPP-32 (H-62-1:500- Santa Cruz) e anti-NCS-1 (FL-190-1:2000- Santa Cruz). As membranas foram lavadas 3 vezes por 7 minutos e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (goat anti-mouse peroxidase-linked IgG 1:7000 - Molecular Probes ou goat anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG, 1:20000 - Molecular Probes) por uma hora.

A detecção foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o kit ECL™ (Amersham Biosciences). Após a sensibilização do filme de raio X (Kodak), este foi revelado com o revelador e fixador (GBX, Kodak).

### 3.6 – Análise dos imunoblots

Bandas imunoreativas não saturadas foram submetidas a escaner densitométrico e a quantificação pelo Scion Image Software. Os valores obtidos para DARPP-32 e NCS-1 foram corrigidos pelos valores da actina. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student e foram considerados estatisticamente significativos para valores de  $p < 0,05$ .



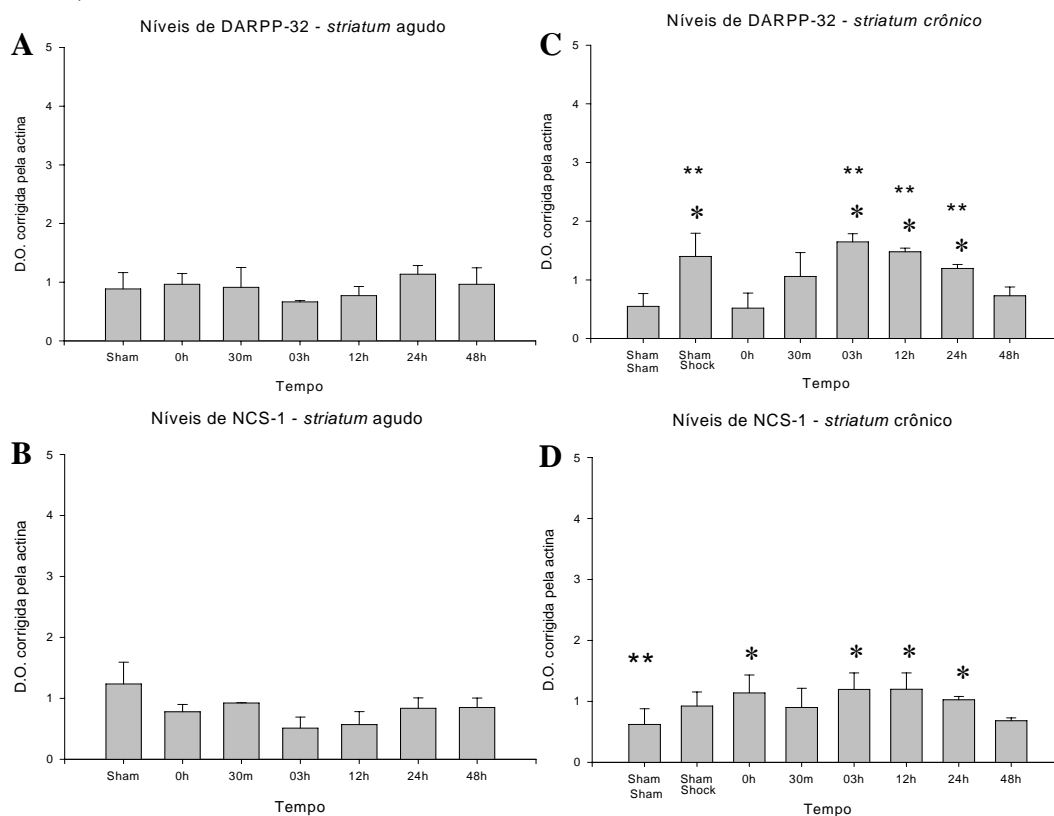
## **4 - Resultados**

#### 4.1 – Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no *striatum*

O tratamento agudo não causou alteração nos níveis de expressão das proteínas DARPP-32 e NCS-1 no *striatum* ao longo do tempo analisado, ou seja, até o tempo de 48 horas após a aplicação do choque (figura 8A e 8B).

Observou-se maior expressão da DARPP-32 no tempo de 03 horas após o tratamento crônico. Houve um decréscimo, mas ainda significativo, nos tempos de 12 e 24 horas. Após 48 horas, houve retorno aos níveis basais na expressão desta proteína. É interessante notar que houve diferença estatística quando comparado os grupos controle e *sham shock* (figura 8C).

Houve aumento significativo nos níveis de NCS-1 nos tempos de 0, 03, 12 e 24 horas quando comparados ao grupo controle no tratamento crônico. Os valores de expressão retornaram aos níveis basais com o tempo de 48 horas após o último choque (figura 8D).

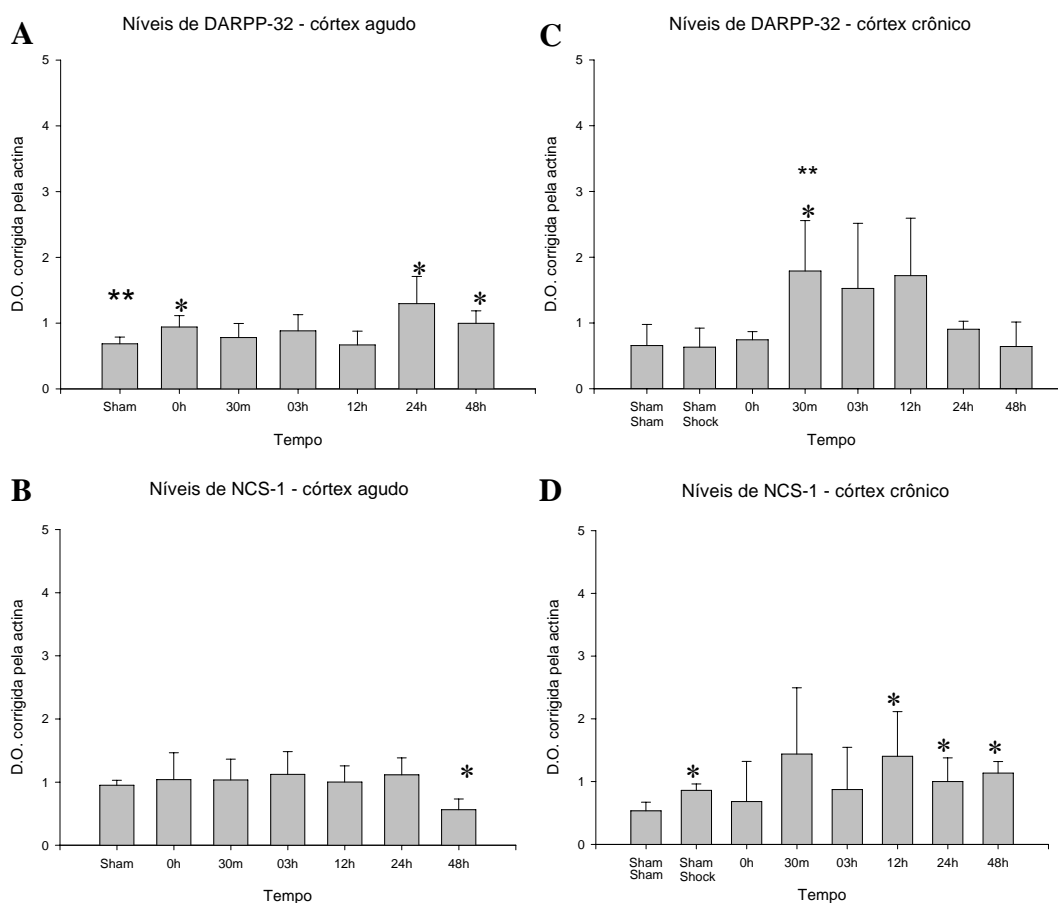


**Figura 8:** Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em *striatum* de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo (A e B, respectivamente) e ao tratamento crônico (C e D, respectivamente). Os valores no eixo tempo representam o intervalo que os animais foram sacrificados após o último choque (\* $p < 0.05$  em relação ao controle; \*\*  $p < 0,05$  em relação ao tempo 0h, todos os gráficos foram plotados com desvio padrão e  $n=5$ ).

## 4.2 – Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no córtex

A análise da expressão da DARPP-32, no tratamento agudo, indica aumento nos tempos de 0, 24 e 48 horas após o último choque eletroconvulsivo, quando comparado ao controle (figura 9A). Já nos níveis de NCS-1, relativos ao tratamento agudo, não observou-se alteração na expressão desta proteína até 24 horas e houve diminuição significativa no tempo de 48 horas (figura 9B).

No tratamento crônico, os níveis de DARPP-32 aumentaram no tempo de 30 minutos, quando comparados ao grupo controle e ao tempo de 0 hora, retornando aos valores basais com o tempo de 48 horas (figura 9C). Em relação aos níveis de NCS-1 notou-se um aumento da expressão no grupo *sham shock*, no tempo de 12, 24 e 48 horas, quando comparadas ao controle (figura 9D).

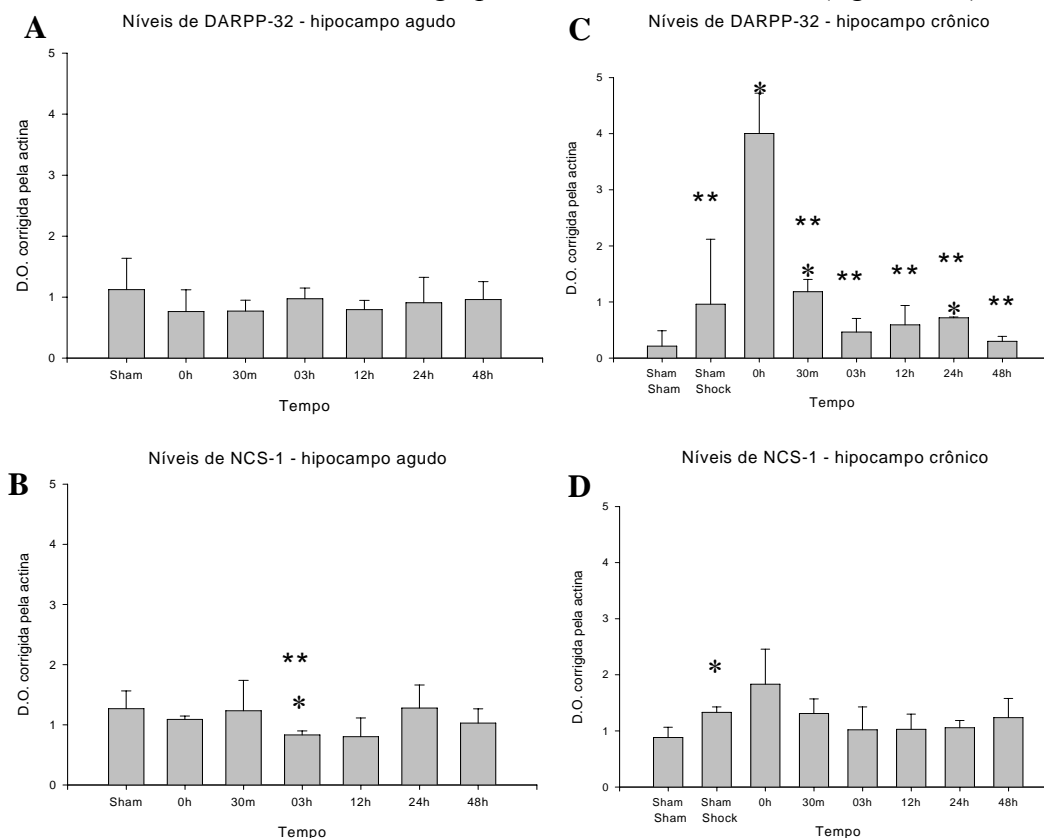


**Figura 9:** Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em córtex de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo (A e B, respectivamente) e ao tratamento crônico (C e D, respectivamente). Os valores no eixo tempo representam o intervalo que os animais foram sacrificados após o último choque (\* $p < 0.05$  em relação ao controle; \*\*  $p < 0,05$  em relação ao tempo 0h, )

### 4.3 – Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no hipocampo

Não houve alteração nos níveis de expressão da DARPP-32 após tratamento agudo no hipocampo (figura 10A). Os níveis da NCS-1 mostrou diminuição no tempo de 03 horas em relação ao grupo controle e ao tempo de 0 hora. Os níveis retornaram ao basal após 24 horas e se mantiveram até o tempo de 48 horas (figura 10B).

Houve um grande aumento na expressão da DARPP-32, com tratamento crônico, no tempo de 0 hora quando comparado com o grupo controle. Houve um decréscimo deste aumento, comparado com o controle, mas a expressão continuou aumentada nos tempos de 30 minutos e 24 horas. Os níveis retornaram a valores basais com o tempo de 48 horas. Houve diferenças do grupo *sham shock* e dos tempos de 30 minutos, 03, 12, 24 e 48 horas quando comparados com o tempo de 0 hora (figura 10C). Observou-se alteração na expressão de NCS-1 somente entre os grupos controle e *sham shock* (figura 10D).

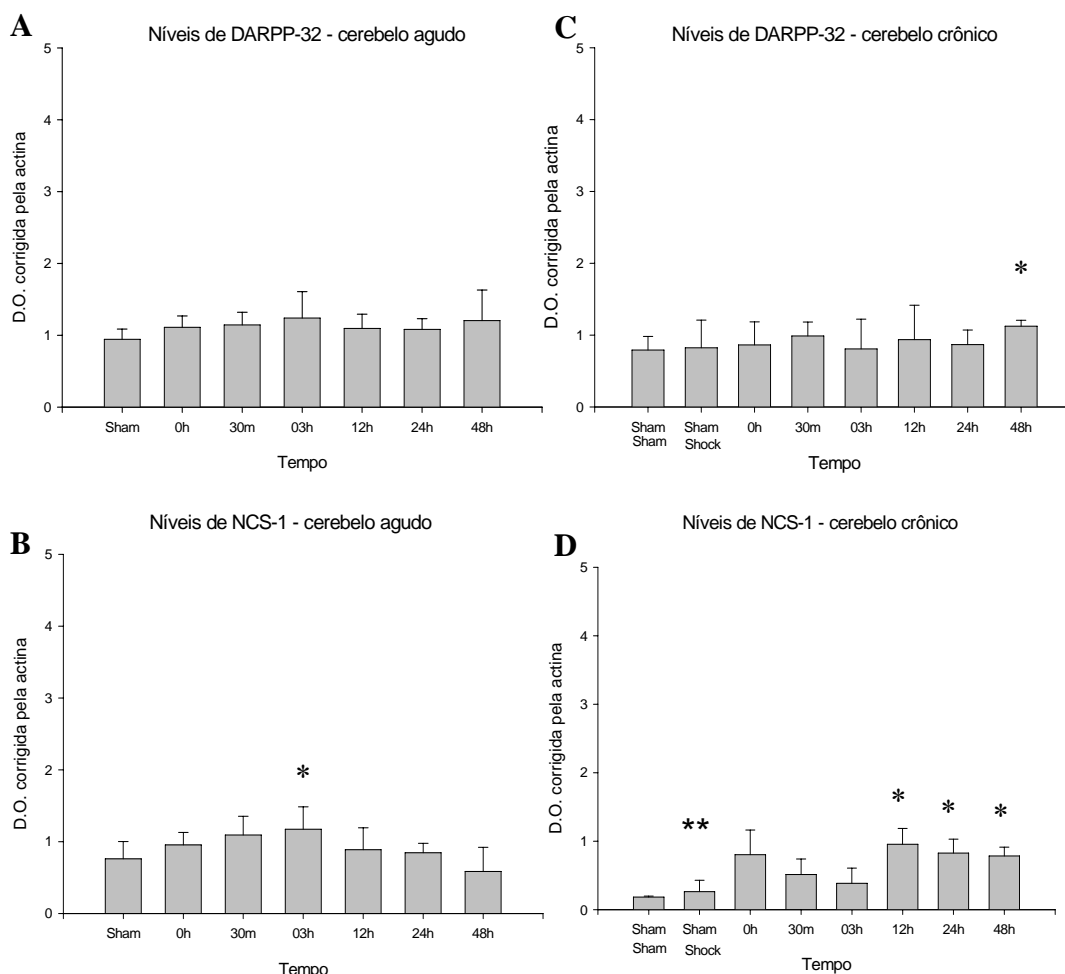


**Figura 10:** Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em hipocampo de ratos submetidos ao tratamento eletroconvulsivo agudo (A e B, respectivamente) e ao tratamento crônico (C e D, respectivamente). Os valores no eixo tempo representam o intervalo que os animais foram sacrificados após o último choque (\* $p < 0.05$  em relação ao controle; \*\*  $p < 0,05$  em relação ao tempo 0h)

#### 4.4 – Expressão de DARPP-32 e NCS-1 no cerebello

No cerebello, não observou-se alterações nos níveis detectáveis de DARPP-32, com tratamento agudo, em relação ao grupo controle e ao tempo de 0 hora (figura 11A). Na análise de NCS-1 nota-se um significativo aumento no tempo de 03 horas. Os níveis desta retornaram aos valores basais nos tempos seguintes (figura 11B).

Com o tratamento crônico, constatou-se um aumento na expressão de DARPP-32 no tempo de 48 horas (figura 11C). Além disso, aumentaram os níveis de NCS-1 nos tempos de 12, 24 e 48 horas quando comparado ao grupo controle. Houve aumento do grupo *sham shock* quando comparado ao tempo de 0 hora (figura 11D).



**Figura 11:** Níveis de DARPP-32 e NCS-1 em cerebello de ratos submetidos ao tratamento electroconvulsivo agudo (A e B, respectivamente) e ao tratamento crônico (C e D, respectivamente). Os valores no eixo tempo representam o intervalo que os animais foram sacrificados após o último choque (\* $p < 0.05$  em relação ao controle; \*\*  $p < 0,05$  em relação ao tempo 0h)

## **5 – Discussão**

## 5.1 – Efeito da estimulação eletroconvulsiva na expressão de DARPP-32

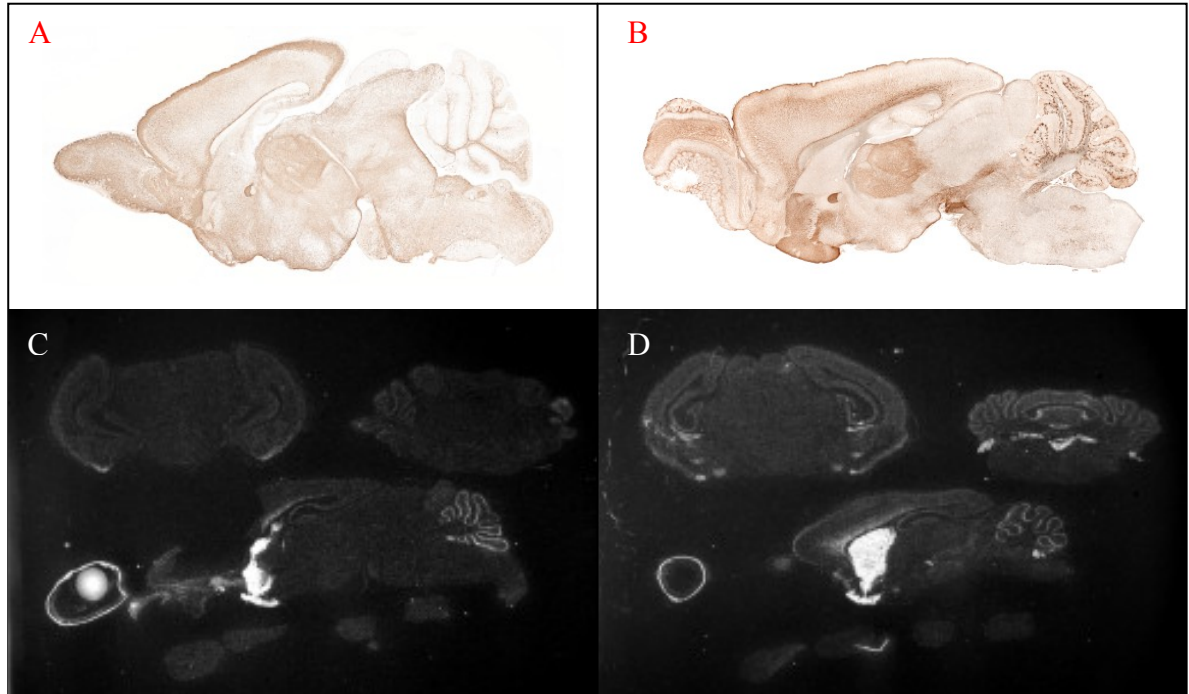
A estimulação eletroconvulsiva aguda gerou aumento na expressão de DARPP-32 no córtex. É interessante notar que nessa área as alterações foram observadas logo após a realização do estímulo e após 24 horas sendo essa sustentada até às 48 horas. Nas outras áreas avaliadas (*striatum*, hipocampo e cerebelo) não foram observadas alterações significativas. Tais achados corroboram a ausência de eficácia dessa terapêutica de modo agudo usualmente.

A estimulação crônica provocou alterações significativas em todas as áreas estudadas, o que está de acordo com a utilização de repetidas sessões desta técnica na clínica. As alterações no hipocampo e *striatum* foram as mais pronunciadas e que estão de acordo com os dados descritos na literatura. Segundo Hendriksen, a EEC tem influência em várias regiões cerebrais, particularmente no hipocampo, córtex frontal, *neostriatum*, córtex parieto-temporal e vários núcleos monoaminérgicos que projetam para essas áreas. Além disso, este afirma que os grandes benefícios da ECT são devidos ao tratamento crônico e sugere que os efeitos moleculares crônicos da EEC podem elucidar mecanismos para a eficácia terapêutica (Hendriksen e cols., 2001).

Ainda sobre alterações nos níveis de DARPP-32 no hipocampo e *striatum*, nota-se um efeito placebo (aumento da expressão no grupo *sham shock* em relação ao controle). Esse dado está de acordo com os achados reunidos por Mendelson que mostram a existência deste em dez estudos analisados, porém com menor magnitude em relação a aplicação da técnica (Mendelson, 1977).

Como a indicação da ECT é para casos que necessitam de resposta clínica rápida ou quando há refratariedade e/ou intolerância à medicação, a rápida alteração na expressão protéica (notada a partir de 30 minutos no córtex, por exemplo) poderia então justificar seu uso. Os níveis de expressão nas áreas estudadas retornam aos valores basais com até 48 horas, exceto no cerebelo, que é o intervalo comum entre o uso de terapias eletroconvulsivas. Este dado também mostra-se interessante por sugerir que a ECT não gera alterações constantes nos níveis de DARPP-32, o que modificaria permanentemente a fisiologia do paciente.

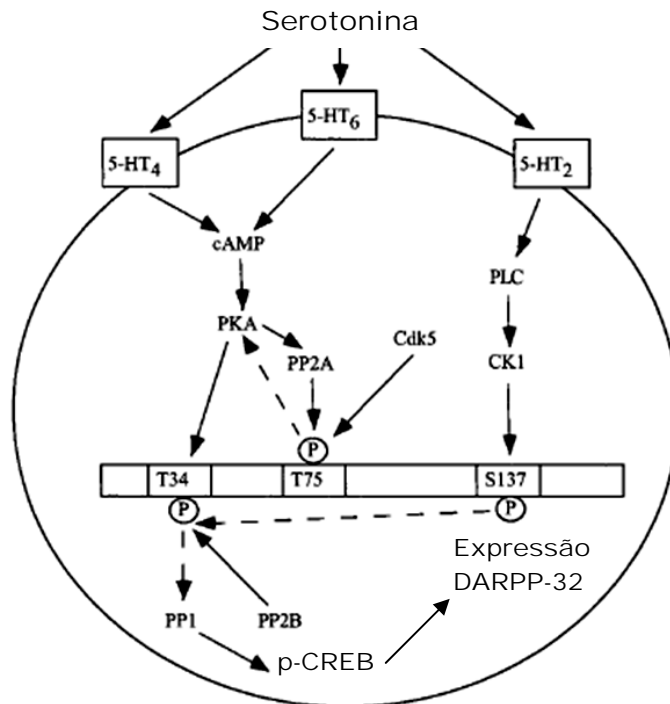
Há radioimunoensaios que indicam a presença de DARPP-32 no *striatum*, córtex, hipocampo e marcações pontuais no cerebelo, que corroboram com os dados encontrados para essas regiões neste trabalho (figura 12).



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

Svenningsson e colaboradores, em 2002, publicaram um trabalho que mostra a regulação do estado de fosforilação de DARPP-32 por serotonina. Foi observado que a estimulação de receptores de serotonina do tipo 4 e 6 (5-HT<sub>4</sub> E 5-HT<sub>6</sub>) causam aumento no estado de fosforilação na Thr<sup>34</sup> e uma diminuição na Thr<sup>75</sup> da DARPP-32. Estimulação de 5-HT<sub>2</sub> aumentam o estado de fosforilação na Ser<sup>137</sup> da DARPP-32. Com o resíduo Thr<sup>34</sup> fosforilado DARPP-32 torna-se um potente inibidor de PP1 (figura 5). Sabe-se que a desfosforilação de CREB está sob o controle de PP1. De acordo com o que tem sido proposto, sugere-se um possível aumento nos níveis de expressão da DARPP-32, não apenas pela ativação da via dopaminérgica através de receptores de dopamina do tipo 1 (D<sub>1</sub>), mas possivelmente por ativação de receptores serotoninérgicos (figura 13).





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

Essa ativação seria favorecida uma vez que a EEC promove:

- aumento na transmissão serotoninérgica no hipotálamo induzindo dessensibilização dos autorreceptores pré-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub>;
- diminuição da expressão de RNA mensageiro (RNAm) para o transportador de serotonina (5-HTT), tanto no tratamento agudo quanto no crônico (tal adaptação na mudança da expressão do RNAm responsável pela síntese de 5-HTT pode estar implicada na eficácia da ECT sobre a depressão resistente a fármacos);
- repetidas EECs aumentam significativamente os níveis de RNAm de 5-HT<sub>2</sub> (Dremencov *e cols.*, 2002; Gur e cols., 2002; Shen e cols., 2001).

A atividade serotoninérgica atuando no aumento da expressão de DARPP-32 é particularmente possível no córtex pré-frontal e *striatum*, uma vez que essas duas áreas recebem inervação serotoninérgica e dopaminérgica convergente (Lindvall e cols., 1984).

Estudos prévios sugerem que ECT pode promover alterações duradouras na expressão gênica. Tais alterações, que são mediadas por oncogenes, funcionam como um código para a transcrição de fatores na futura expressão de genes por estímulos

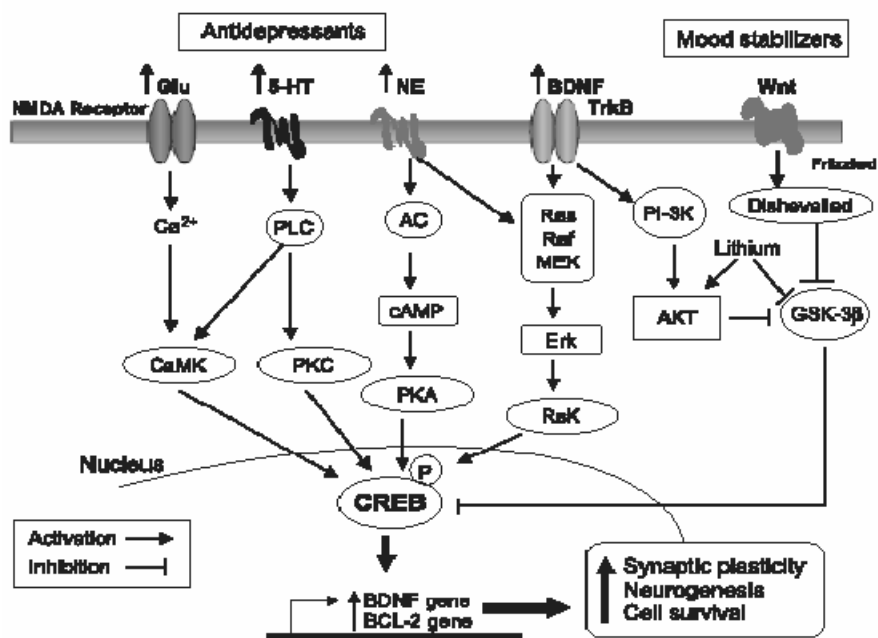
extracelulares. Sabe-se que a ECT crônica modifica o sistema serotoninérgico, em particular o 5-HT<sub>2A</sub>, via oncogenes, como *c-fos* (Quevedo *e cols.*, 2002).

Cole e colaboradores, avaliaram a transcrição dos genes *zif/268*, *c-fos*, *c-jun* e *jun-B* em resposta à ECT aguda e crônica. Os níveis de RNAm de cada um destes genes aumentaram dentro de 15 minutos e todos, exceto *c-jun*, retornaram aos níveis basais em quatro horas. Embora essa resposta tenha sido mais proeminente nas células granulares dos neurônios hipocâmpais, aumentos também foram observados no neocórtex e córtex piriforme. A rápida resposta do RNAm persistiu em animais que foram submetidos a um protocolo de tratamento crônico similar ao usado na ECT clínica (Cole *e cols.*, 1990). Esse aumento de *c-fos* poderia então aumentar a atividade serotoninérgica e, conseqüentemente, os níveis de DARPP-32.

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

Neurotrofinas regulam a sobrevivência e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento, mas evidências crescentes também indicam que elas estão envolvidas em várias funções na fase adulta, incluindo processos de plasticidade. A expressão de BDNF no sistema nervoso central é modificada por vários tipos de injúrias cerebrais (estresse, isquemia, atividade convulsiva, hipoglicemia, entre outras) e alterações na sua expressão podem contribuir para algumas patologias, como depressão, epilepsia, doença de Alzheimer e de Parkinson (Barde *e cols.*, 1990).

Em cultura de células estriatais embrionárias de camundongos, a dopamina tem sido mostrada capaz de regular os níveis de RNAm e proteína de BDNF através da ativação de receptores D<sub>1</sub>. Além disso, o elemento responsivo à AMPc (CRE) foi recentemente identificado no promotor III do BDNF humano, que participa da modulação dopaminérgica na expressão de BDNF via receptor do tipo D<sub>1</sub>. Estes dados apontam para a importância da regulação dopaminérgica do BDNF na via nigroestriatal (figura 14) (Fang *e cols.*, 2003; Kuppers *e cols.*, 2001)



**Figura 14** : Via de modulação CREB por BDNF. A ativação de CREB está envolvida no aumento dos níveis de DARPP-32 (Hashimoto e cols, 2004).

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

## 5.2 – Efeito da estimulação eletroconvulsiva na expressão de NCS-1

A estimulação eletroconvulsiva aguda gerou somente alterações pontuais nos níveis de NCS-1 no córtex (diminuição em 48 horas), hipocampo (diminuição em 03 horas) e cerebelo (aumento em 3 horas).

A estimulação crônica gerou modificações importantes no *striatum* e córtex, cerebelo. No *striatum*, aumento é notado logo após do último estímulo e a partir de 03 horas até às 24 horas. No córtex e cerebelo, o aumento é evidente de 12 horas até às 48 horas. Tais dados, assim como os obtidos para DARPP-32, mostram uma maior eficiência da terapia crônica em relação à aguda e uma dinâmica temporal que favorece a aplicação da técnica num intervalo de 2-3 dias (tempo pelo qual manteve-se os níveis elevados das proteínas).

Os dados encontrados no *striatum* estão de acordo com os resultados obtidos no trabalho de Koh *e cols*, no qual ele descreve resultados obtidos de amostras de cérebros de indivíduos esquizofrênicos, bipolares e controles normais, provenientes do banco de cérebros do Consórcio de Neuropatologia da *Stanley Foundation* (Koh *e cols.*, 2003). Eles encontraram um aumento maior que 50% nos níveis de NCS-1 (neuronal sensora de cálcio-1) na região dorsolateral do córtex pré-frontal 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.

No hipocampo e córtex nota-se um efeito “placebo” sobre os níveis de NCS-1. A literatura apresenta a existência do efeito placebo para ECT, porém com menor eficiência que a técnica (Mendelson, 1977). Nossos dados, mostram que quando há esse efeito para a expressão de NCS-1 estes são semelhantes aos valores encontrados para os animais submetidos a EEC, o que contrasta com a literatura.

Pouco se conhece sobre a regulação da transcrição da proteína NCS-1. Em relação às vias em que atua sabe-se que o cálcio é um componente importante na sua modulação uma vez que esta possui quatro sítios de ligação a esse íon (Bourne *e cols.*, 2001). O choque

eletroconvulsivo acarreta um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular devido à abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (Lisanby *e cols.*, 2000).

Em neurônios, mudanças na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico regulam diferentes eventos em uma ampla variação de tempo, de menos que milisegundos a horas, dias e até mesmo semanas (Augustine *e cols.*, 2003). Tem se tornado aparente que as proteínas sensoras de cálcio estão envolvidas na regulação de uma ampla variedade de funções neuronais envolvendo efeitos nos receptores, canais iônicos, tráfego de membrana e sobrevivência neuronal (Burgoyne *e cols.*, 2001).

A NCS-1 age como um regulador dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  da plasticidade sináptica em neurônios hipocâmpais e, assim, pode estar envolvida no aprendizado hipocâmpal e em processos de memória (Sippy *e cols.*, 2003). NCS-1 interage com GRK2 e com o receptor de dopamina do tipo  $\text{D}_2$ . NCS-1 inibe a fosforilação do receptor mediada por GRK2 em uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e, assim, inibe a dessensibilização de receptores  $\text{D}_2$  e atenua a internalização do receptor  $\text{D}_2$  induzida por dopamina (Kabbani *e cols.*, 2002).

O aumento das concentrações de cálcio citosólico proporcionado pela ECT poderiam favorecer as funções da NCS-1. Essa maior ativação poderia estar relacionada às alterações nos níveis de expressão desta proteína.

## **6 - Conclusão**

Os níveis de DARPP-32 aumentaram após a estimulação eletroconvulsiva aguda no córtex. Nas outras áreas avaliadas (*striatum*, hipocampo e cerebelo) não foram observadas mudanças significativas. Tais achados corroboram a ausência de eficácia dessa terapêutica de modo agudo. Já a estimulação crônica provocou alterações significativas em todas as áreas estudadas, o que está de acordo com a utilização de repetidas sessões desta técnica na clínica.

A estimulação eletroconvulsiva aguda gerou somente alterações pontuais nos níveis de NCS-1 no córtex (diminuição em 48 horas), hipocampo (diminuição em 03 horas) e cerebelo (aumento em 3 horas). A estimulação crônica gerou modificações importantes no *striatum*, córtex, cerebelo. No *striatum*, aumento é notado logo após do último estímulo e a partir de 03 horas até às 24 horas. No córtex e cerebelo, o aumento é evidente de 12 horas até às 48 horas.

Tais dados mostram uma maior eficiência da terapia crônica em relação à aguda e uma dinâmica temporal que favorece a aplicação da técnica num intervalo de 2-3 dias (tempo pelo qual manteve-se os níveis elevados das proteínas), tal como utilizando na prática clínica.

## **7 - Referências bibliográficas**



Abrams, R. *Electroconvulsive therapy*. 2<sup>nd</sup> Edition. New York. Oxford University Press, Oxford, 1992.

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., and Greengard, P., Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 705-712, 2002.

American Psychiatric Association. *The practice of Electroconvulsive Therapy: Recommendations for Practice, Training and Privilegiana: a Task Force Report of the American Psychiatric Association*. Washington: American Psychiatry Association Press, 1990.

Angelucci, F., Aloe, L., Jimenez-Vasquez, P., and Mathe, A.A., Electroconvulsive stimuli alter nerve growth factor but not brain-derived neurotrophic factor concentrations in brains of a rat model of depression. *Neuropeptides* 37, 51-56, 2003.

Augustine, G.J., Santamaria, F., and Tanaka, K., Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40, 331-346, 2003.

Bai, J., He, F., Novikova, S.I., Undie, A.S., Dracheva, S., Haroutunian, V., and Lidow, M.S., Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biological Psychiatry* 56, 427-440, 2004.

Bergson, C., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S., and Lidow, M.S., Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca<sup>2+</sup> connection in dopamine signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* 24, 486-492, 2003.

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., Haganir, R.L., Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C., and Greengard, P., Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* 402, 669-671, 1999.

Bibb, J.A., Chen, J., Taylor, J.R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G.L., Yan, Z., Sagawa, Z.K., Ouimet, C.C., Nairn, A.C., Nestler, E.J., and Greengard, P., Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* 410, 376-380, 2001.

Bourne, Y., Dannenberg, J., Pollmann, V., Marchot, P., and Pongs, O., Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J. Biol. Chem.* 276, 11949-11955, 2001.

Burgoyne, R.D. and Weiss, J.L., The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochemical Journal* 353, 1-12, 2001.

Burnet, P.W., Mead, A., Eastwood, S.L., Lacey, K., Harrison, P.J., and Sharp, T., Repeated ECS differentially affects rat brain 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor expression. *Neuroreport* 6, 901-904, 1995.

Busnello, E. Eletroconvulsoterapia. Rotinas em psiquiatria, 1995

Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, A.A., and 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.* 20, 8443-8451, 2000.

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

Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., and Waldeck, B., On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127, 471, 1958.

Chen, J., Nye, H.E., Kelz, M.B., Hiroi, N., Nakabeppu, Y., Hope, B.T., and Nestler, E.J., Regulation of delta FosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol. Pharmacol.* 48, 880-889, 1995.

Cole, A.J., Abushakra, S., Saffen, D.W., Baraban, J.M., and Worley, P.F., Rapid Rise in Transcription Factor Messenger-Rnas in Rat-Brain After Electroshock-Induced Seizures. *Journal of Neurochemistry* 55, 1920-1927, 1990.

Desdouits, F., Siciliano, J.C., Nairn, A.C., Greengard, P., and 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.* 330 ( Pt 1), 211-216, 1998.

Dremencov,E., Gur,E., Lerer,B., and Newman,M.E., Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hypothalamus. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 26, 1029-1034, 2002.

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

Erickson,J.D., Eiden,L.E., and Hoffman,B.J., Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 89, 10993-10997, 1992.

Fang,H., Chartier,J., Sodja,C., Desbois,A., Ribocco-Lutkiewicz,M., Walker,P.R., and Sikorska,M., Transcriptional activation of the human brain-derived neurotrophic factor gene promoter III by dopamine signaling in NT2/N neurons. *J.Biol.Chem.* 278, 26401-26409, 2003.

Fienberg,A.A., Hiroi,N., Mermelstein,P.G., Song,W., Snyder,G.L., Nishi,A., Cheramy,A., O'Callaghan,J.P., Miller,D.B., Cole,D.G., Corbett,R., Haile,C.N., Cooper,D.C., Onn,S.P., Grace,A.A., Ouimet,C.C., White,F.J., Hyman,S.E., Surmeier,D.J., Girault,J., Nestler,E.J., and Greengard,P., DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281, 838-842, 1998.

Flood,P. and Role,L.W., Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulation by general anesthetics. *Toxicol.Lett.* 100-101, 149-153, 1998.

Fochtmann,L.J., Animal studies of electroconvulsive therapy: foundations for future research. *Psychopharmacol.Bull.* 30, 321-444, 1994.

Follesa,P., Gale,K., and Mocchetti,I., Regional and temporal pattern of expression of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA in rat brain following electroconvulsive shock. *Exp.Neurol.* 127, 37-44, 1994.

Gerfen,C.R., Keefe,K.A., and Gauda,E.B., D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J.Neurosci.* 15, 8167-8176, 1995.

Girault,J.A., Raisman-Vozari,R., Agid,Y., and Greengard,P., Striatal phosphoproteins in Parkinson disease and progressive supranuclear palsy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 86, 2493-2497, 1989.

Giros,B., Jaber,M., Jones,S.R., Wightman,R.M., and Caron,M.G., Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379, 606-612, 1996.

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

Green, A. R & Nutt, D. J. Psychopharmacology of repeated seizure: Possible relevance to the mechanism of action of ECT.In Iverssen LL, Iverssen SH, Snyder SH (Eds) *Handbook of Psychopharmacology*. London: Plenum Press. 375-419, 1987

Greengard,P., Allen,P.B., and Nairn,A.C., Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/Protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435-447, 1999.

Gur,E., Dremencov,E., Garcia,F., van de Kar,L.D., Lerer,B., and Newman,M.E., Functional effects of chronic electroconvulsive shock on serotonergic 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptor activity in rat hippocampus and hypothalamus. *Brain Res.* 952, 52-60, 2002.

Hagiwara,M., Alberts,A., Brindle,P., Meinkoth,J., Feramisco,J., Deng,T., Karin,M., Shenolikar,S., and Montminy,M., Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70, 105-113, 1992.

Hashimoto,K., Shimizu,E., and Iyo,M., Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 45, 104-114, 2004.

Heckers,S. and Konradi,C., Hippocampal neurons in schizophrenia. *J.Neural Transm.* 109, 891-905, 2002.

Hendriksen,H., Datson,N.A., Ghijsen,W.E., van Vliet,E.A., da Silva,F.H., Gorter,J.A., and Vreugdenhil,E., Altered hippocampal gene expression prior to the onset of spontaneous seizures in the rat post-status epilepticus model. *Eur.J.Neurosci.* 14, 1475-1484, 2001.

Hsieh-Wilson,L.C., Allen,P.B., Watanabe,T., Nairn,A.C., and Greengard,P., Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry* 38, 4365-4373, 1999.

Hunter,T., Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236, 1995.

Hyman,S.E. and Malenka,R.C., Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 695-703, 2001.

Jacobs,B.L., Praag,H., and Gage,F.H., Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol.Psychiatry* 5, 262-269, 2000.

Jones,M.V., Sahara,Y., Dzubay,J.A., and Westbrook,G.L., Defining affinity with the GABAA receptor. *J.Neurosci.* 18, 8590-8604, 1998.

Kabbani,N., Negyessy,L., Lin,R., Goldman-Rakic,P., and Levenson,R., Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J.Neurosci.* 22, 8476-8486, 2002.

Kavelaars,A., Cobelens,P.M., Teunis,M.A., and Heijnen,C.J., Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. *J.Neuroimmunol.* 161, 162-168, 2005.

King,M.M., Huang,C.Y., Chock,P.B., Nairn,A.C., Hemmings,H.C., Jr., Chan,K.F., and Greengard,P., Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *J.Biol.Chem.* 259, 8080-8083, 1984.

Kish,S.J., Shannak,K., and Hornykiewicz,O., Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N.Engl.J.Med.* 318, 876-880, 1988.

Koh,P.O., Undie,A.S., Kabbani,N., Levenson,R., Goldman-Rakic,P.S., and 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* 100, 313-317, 2003.

Koh,T.W. and Bellen,H.J., Synaptotagmin I, a Ca<sup>2+</sup> sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26, 413-422, 2003.

Kondratyev,A., Sahibzada,N., and Gale,K., Electroconvulsive shock exposure prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 91, 1-13, 2001.

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

Lang,A.E. and Lozano,A., Hemiballism in Parkinson's disease. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 60, 247, 1996.

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

Lidow,M.S., Calcium signaling dysfunction in schizophrenia: a unifying approach. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 43, 70-84, 2003.

Lindgren,N., Usiello,A., Goiny,M., Haycock,J., Erbs,E., Greengard,P., Hokfelt,T., Borrelli,E., and 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* 100, 4305-4309, 2003.

Lindvall, O. & Bjorklund, A. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*:55-122., 1984

Lindskog,M., Svenningsson,P., Pozzi,L., Kim,Y., Fienberg,A.A., Bibb,J.A., Fredholm,B.B., Nairn,A.C., Greengard,P., and Fisone,G., Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature* 418, 774-778, 2002.

Lisanby,S.H., Maddox,J.H., Prudic,J., Devanand,D.P., and Sackeim,H.A., The effects of electroconvulsive therapy on memory of autobiographical and public events. *Arch.Gen.Psychiatry* 57, 581-590, 2000.

Liu,F.C. and Graybiel,A.M., Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* 17, 1133-1144, 1996.

Lourenco,G.A., Dorce,V.A.C., and Palermo-Neto,J., Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. *European Neuropsychopharmacology* 15, 271-277, 2005.

Malberg,J.E., Eisch,A.J., Nestler,E.J., and Duman,R.S., Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J.Neurosci.* 20, 9104-9110, 2000.

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., and Morrisett,R.A., DARPP-32 and regulation of the ethanol sensitivity of NMDA receptors in the nucleus accumbens. *Nat.Neurosci.* 5, 641-648, 2002.

Mendelson,G., Electrotherapy and "placebo" electrotherapy. A review. *Med.J.Aust.* 2, 125-6, 128, 1981.

Missale,C., Nash,S.R., Robinson,S.W., Jaber,M., and Caron,M.G., Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78, 189-225, 1998.

Modigh,K., Electroconvulsive shock and postsynaptic catecholamine effects: increased psychomotor stimulant action of apomorphine and clonidine in reserpine pretreated mice by repeated ECS. *J.Neural Transm.* 36, 19-32, 1975.

Mody,I., Tanelian,D.L., and MacIver,M.B., Halothane enhances tonic neuronal inhibition by elevating intracellular calcium. *Brain Res.* 538, 319-323, 1991.

Mora,S., Durham,P.L., Smith,J.R., Russo,A.F., Jeromin,A., and Pessin,J.E., NCS-1 inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinase-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 277, 27494-27500, 2002.

Nakamura,T.Y., Pountney,D.J., Ozaita,A., Nandi,S., Ueda,S., Rudy,B., and Coetzee,W.A., A role for frequenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein, as a regulator of Kv4 K<sup>+</sup>-currents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 98, 12808-12813, 2001.

Nass,R., Hall,D.H., Miller,D.M., III, and Blakely,R.D., Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 99, 3264-3269, 2002.

National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Electroconvulsive therapy. *Natl. Inst. Health Consens Dev Conf Consens Statement*. 5(11):8pp, 1985.

Negyessy,L. and 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*. 488, 464-475, 2005.

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

Nestler,E.J., Barrot,M., DiLeone,R.J., Eisch,A.J., Gold,S.J., and Monteggia,L.M., Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25, 2002.

Nibuya,M., Morinobu,S., and Duman,R.S., Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J.Neurosci*. 15, 7539-7547, 1995.

Nishi,A., Snyder,G.L., Nairn,A.C., and Greengard,P., Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J.Neurochem*. 72, 2015-2021, 1999.

Nishi,A., Liu,F., Matsuyama,S., Hamada,M., Higashi,H., Nairn,A.C., and Greengard,P., Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 100, 1322-1327, 2003.

Nowak,G., Kata,M., Jopek,R., and Siedlecki,A., Chronic electroconvulsive treatment increases the activity of nitric oxide synthase in the rat brain. *Polish Journal of Pharmacology* 49, 379-382, 1997.

Nutt,D.J., Cowen,P.J., and Green,A.R., Studies on the post-ictal rise in seizure threshold. *Eur.J.Pharmacol*. 71, 287-295, 1981.

Olfson,M., Marcus,S., Sackeim,H.A., Thompson,J., and Pincus,H.A., Use of ECT for the inpatient treatment of recurrent major depression. *Am.J.Psychiatry* 155, 22-29, 1998.

Ouimet,C.C., Miller,P.E., Hemmings,H.C., Jr., Walaas,S.I., and Greengard,P., DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein



enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J.Neurosci.* 4, 111-124, 1984.

Packard,M.G. and Knowlton,B.J., Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu.Rev.Neurosci.* 25, 563-593, 2002.

Pande,A.C., Grunhaus,L.J., Haskett,R.F., and Greden,J.F., Electroconvulsive therapy in delusional and non-delusional depressive disorder. *J.Affect.Disord.* 19, 215-219, 1990.

Parker,G., Roy,K., Hadzi-Pavlovic,D., and Pedic,F., Psychotic (delusional) depression: a meta-analysis of physical treatments. *J.Affect.Disord.* 24, 17-24, 1992.

Parsons,L.H., Koob,G.F., and Weiss,F., Serotonin dysfunction in the nucleus accumbens of rats during withdrawal after unlimited access to intravenous cocaine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 274, 1182-1191, 1995.

Paul,M.L., Graybiel,A.M., David,J.C., and Robertson,H.A., D1-like and D2-like dopamine receptors synergistically activate rotation and c-fos expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J.Neurosci.* 12, 3729-3742, 1992.

Pei,Q., Burnet,P.W., Grahame-Smith,D.G., and Zetterstrom,T.S., Differential effects of acute and chronic electroconvulsive shock on the abundance of messenger RNAs for voltage-dependent potassium channel subunits in the rat brain. *Neuroscience* 78, 343-350, 1997.

Picconi,B., Centonze,D., Hakansson,K., Bernardi,G., Greengard,P., Fisone,G., Cenci,M.A., and Calabresi,P., Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat.Neurosci.* 6, 501-506, 2003.

Pongs,O., Lindemeier,J., Zhu,X.R., Theil,T., Engelkamp,D., Krah-Jentgens,I., Lambrecht,H.G., Koch,K.W., Schwemer,J., Rivosecchi,R., and .., Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the Drosophila nervous system. *Neuron* 11, 15-28, 1993.

Potter,W.Z. and Rudorfer,M.V., Electroconvulsive therapy--a modern medical procedure. *N.Engl.J.Med.* 328, 882-883, 1993.

Rozas,G., Liste,I., Guerra,M.J., and Labandeira-Garcia,J.L., Sprouting of the serotonergic afferents into striatum after selective lesion of the dopaminergic system by MPTP in adult mice. *Neurosci.Lett.* 245, 151-154, 1998.

Royal College of Psychiatrists. The practical Administration of Electroconvulsive Therapy (ECT). *Gaskell*, 30pp., 1989

Russell,V.A., de Villiers,A.S., Sagvolden,T., Lamm,M.C., and Taljaard,J.J., Methylphenidate affects striatal dopamine differently in an animal model for attention-deficit/hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.Bull.* 53, 187-192, 2000.

Sackeim,H.A., Central issues regarding the mechanisms of action of electroconvulsive therapy: directions for future research. *Psychopharmacol.Bull.* 30, 281-308, 1994.

Sanacora,G., Mason,G.F., Rothman,D.L., Hyder,F., Ciarcia,J.J., Ostroff,R.B., Berman,R.M., and Krystal,J.H., Increased cortical GABA concentrations in depressed patients receiving ECT. *Am.J.Psychiatry* 160, 577-579, 2003.

Seiden,L.S., Sabol,K.E., and Ricaurte,G.A., Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 33, 639-677, 1993.

Shen,H., Numachi,Y., Yoshida,S., Toda,S., Awata,S., Matsuoka,H., and Sato,M., Electroconvulsive shock regulates serotonin transporter mRNA expression in rat raphe nucleus. *Psychiatry Clin.Neurosci.* 55, 75-77, 2001.

Sippy,T., Cruz-Martin,A., Jeromin,A., and Schweizer,F.E., Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat.Neurosci.* 6, 1031-1038, 2003.

Smialowska,M., Szewczyk,B., Branski,P., Wieronska,J.M., Palucha,A., Bajkowska,M., and Pilc,A., Effect of chronic imipramine or electroconvulsive shock on the expression of mGluR1a and mGluR5a immunoreactivity in rat brain hippocampus. *Neuropharmacology* 42, 1016-1023, 2002.

Smith,S., Lindefors,N., Hurd,Y., and Sharp,T., Electroconvulsive shock increases dopamine D1 and D2 receptor mRNA in the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 120, 333-340, 1995.

Snyder,G.L., Fisone,G., and Greengard,P., Phosphorylation of DARPP-32 is regulated by GABA in rat striatum and substantia nigra. *J.Neurochem.* 63, 1766-1771, 1994.

Staal,R.G., Mosharov,E.V., and Sulzer,D., Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. *Nat.Neurosci.* 7, 341-346, 2004.

Steinbusch,H.W., Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6, 557-618, 1981.

Suo,S., Ishiura,S., and Van Tol,H.H., Dopamine receptors in *C. elegans*. *Eur.J.Pharmacol.* 500, 159-166, 2004.

Svenningsson,P., Nomikos,G.G., and Fredholm,B.B., Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J.Neurosci.* 15, 7612-7624, 1995.

Svenningsson,P., Tzavara,E.T., Liu,F., Fienberg,A.A., Nomikos,G.G., and Greengard,P., DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 99, 3188-3193, 2002.

Svenningsson,P., Nishi,A., Fisone,G., Girault,J.A., Nairn,A.C., and Greengard,P., DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 44, 269-296, 2004.

Thorpe,L.W., Westlund,K.N., Kochersperger,L.M., Abell,C.W., and Denney,R.M., Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *J.Histochem.Cytochem.* 35, 23-32, 1987.

Tsuang,M.T., Taylor,L., and Faraone,S.V., An overview of the genetics of psychotic mood disorders. *J.Psychiatr.Res.* 38, 3-15, 2004.

Tsujimoto,T., Jeromin,A., Saitoh,N., Roder,J.C., and Takahashi,T., Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* 295, 2276-2279, 2002.

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

UK ECT Review group, Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361, 799-808, 2003.

Vallone,D., Picetti,R., and Borrelli,E., Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 24, 125-132, 2000.

Walaas,S.I., Aswad,D.W., and Greengard,P., A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301, 69-71, 1983.

Walton-Hadlock,J.L., Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.* 352, 1386, 2005.

Wielosz,M., Stelmasiak,M., Ossowska,G., and Kleinrok,Z., Effects of electroconvulsive shock on central GABA-ergic mechanisms. *Pol.J.Pharmacol.Pharm.* 37, 113-122, 1985.

Yan,Z., Hsieh-Wilson,L., Feng,J., Tomizawa,K., Allen,P.B., Fienberg,A.A., Nairn,A.C., and Greengard,P., Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat.Neurosci.* 2, 13-17, 1999.

Zetterstrom,T.S., Pei,Q., and Grahame-Smith,D.G., Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 57, 106-110, 1998.