

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**PERFIL TEMPORAL DE MARCADORES
BIOQUÍMICOS E PARÂMETROS PURINÉRGICOS
NO LÍQUOR E SORO DE RATOS EM MODELOS
ELETROCONVULSIVOS CRÔNICO E AGUDO**

JOÃO VICENTE BUSNELLO

Orientador: Prof. Dr. Flávio P. Kapczinski

Co-orientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-

Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de

Doutor em Bioquímica - 2006

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores;

Professor Dr. Flavio Kapczinski, meu orientador desde os primeiros momentos de iniciação científica, passando pela residência médica e pós-graduação. Um Homem para todas as épocas, sempre presente, cuja visão reforça diariamente minha crença que a Pós-Graduação e a Educação Continuada são instrumentos que não visam apenas o crescimento pessoal, mas o de nossa Sociedade e País;

Professor Dr. João Luciano de Quevedo, incentivador incansável, filho querido desta casa, cuja energia materializa-se num dos currículos mais impressionantes dentre os doutores da nova geração. Sua biografia aponta, inequivocamente, o caminho para a construção de um País livre e próspero, baseado nos mais altos valores humanos;

Professor Dr. Diogo Souza, o Diogão, cuja grandeza transcende o nome. Sua doação a este Curso, à Educação, à Formação Acadêmica, somada a singular personalidade são objeto da minha maior e mais sincera admiração. Um homem de fortes ideologias, sendo a maior o amor ao Brasil e as suas pessoas. Bastaria apenas o estímulo e inspiração que essas suas qualidades suscitam para que ele fosse objeto destes agradecimentos, mas a ele devo também o apoio na busca de recursos, a intermediação de contato com colegas, a amizade e amadurecimento como pessoa e cientista;

Professor Dr. Luis Valmor Portela, pela presença constante e disposição imperturbável de aperfeiçoamento de nossos trabalhos. Qualidade só encontrada naqueles que tem profundo conhecimento da área e a teimosia de não rejeitar desafios;

Professor Dr. João José de Freitas Sarkis, por ter aberto as portas de seu laboratório e proporcionado um ambiente de colaboração no mais virtuoso sentido da palavra.

Aos colegas da Bioquímica, Rosane Souza da Silva, Ana Eliza Böhmer, Renata Leke, e em especial ao Jean Pierre Oses, cujo talento não cabe somente nas suas teses e dissertações e com a qual esta tese foi, com muito orgulho, beneficiada.

A Gustavo Feier, colaborador mais assíduo, que sacrificou momentos preciosos de seu lazer e estudos para que esse trabalho fosse levado a termo.

Aos demais alunos do Curso de Medicina da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Adalisa Reinke, Fabiano Agostinho e Márcio Rodrigo Martins pela ajuda e amizade.

Aos meus pais por apontarem desde cedo esse caminho.

A Luciana, minha esposa, pelo carinho, dedicação, amor e por dar sentido a isso tudo.

As geographers, Sosius, crowd into the edges of their maps parts of the world which they do not know about, adding notes in the margin to the effect, that beyond this lies nothing but the sandy deserts full of wild beasts, unapproachable bogs, Scythian ice, or a frozen sea, so in this work of mine, in which I have compared the lives of the greatest men with one another, after passing through those periods which probable reasoning can reach to and real history find a footing in, I might very well say of those that are farther off: "Beyond this there is nothing but prodigies and fictions, the only inhabitants are the poets and inventors of fables; there is no credit, or certainty any farther."

Plutarco "The Lives"
Traduzido por John Dryden

ÍNDICE

PARTE I

1. Resumos	
1.1 Resumo em Português.....	1
1.2 Resumo em Inglês (abstract).....	2
2. Lista de Abreviaturas	3
3. Introdução	
3.1 Histórico.....	3
3.2 Efetividade da Eletroconvulsoterapia.....	5
3.3 Eletroconvulsoterapia e Dano Cerebral.....	5
3.4 Efeitos Tróficos e Protetores do Choque Eletroconvulsivo.....	6
3.5 Modelos Experimentais de Eletroconvulsoterapia.....	7
3.6 Proteína S100B.....	8
3.7 Proteína NSE.....	9
3.8 Nucleotidasas.....	10
3.9 Sistema Purinérgico.....	13
4. Objetivos do trabalho.....	18

PARTE II

1. Artigo “Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity”.....	21
2. Artigo “Peripheral Nucleotide Hydrolysis in Rats Submitted to a Model of Electroconvulsive-Therapy”.....	43

PARTE III

1. Discussão.....	66
2. Conclusão.....	73
3. Perspectivas.....	73

REFERÊNCIAS.....	76
-------------------------	-----------

PARTE I

1. RESUMOS

1.1. Resumo em Português

A Eletroconvulsoterapia é atualmente o método mais efetivo no manejo dos transtornos depressivos, e sua superioridade frente ao tratamento farmacológico apresenta-se bem documentada. Apesar disso, críticos ainda vêem o método como potencialmente danoso e capaz de provocar lesões cerebrais, fatos que carecem de comprovação científica. Hipóteses quanto aos mecanismos bioquímicos desencadeados pela eletroconvulsoterapia, bem como pelos antidepressivos de um modo geral, voltam-se tradicionalmente para o sistema monoaminérgico como principal envolvido na orquestração subjacente à recuperação dos sintomas de humor. Há algum tempo esforços têm sido direcionados para identificação de outros sistemas que possam estar desempenhando um importante papel. Nesta tese utilizamos um tradicional modelo de choque eletroconvulsivo em ratos para investigar seus efeitos sobre marcadores de lesão neuronal, atividade e consumo energético glial, bem como atividade de ectonucleotidases. Ratos wistar machos com 60 a 90 dias de idade foram alocados a dois tratamentos. No primeiro, denominado agudo, os indivíduos receberam um único choque eletroconvulsivo, sendo posteriormente sacrificados em horários predeterminados. No segundo modelo, crônico, os ratos receberam 8 choques eletroconvulsivos, mimetizando um curso de tratamento de eletroconvulsoterapia. O sacrifício dos ratos no modelo crônico ocorreu após o oitavo choque, também em momentos predeterminados. No primeiro trabalho foi extraído o líquido dos animais 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após terminadas as sessões, sendo medidos os níveis de proteína S100B, enolase específica do neurônio e lactato. Os níveis de S100B apresentavam-se significativamente elevados seis horas após o último choque no modelo crônico ($p < 0,0001$). Enolase específica do neurônio não teve alterações, e os níveis de lactato aumentaram significativamente na primeira medição após o choque, tanto no modelo crônico quanto no agudo ($p < 0,001$, para ambos). No segundo trabalho, o mesmo modelo foi usado, agora com medições nos níveis séricos da hidrólise de nucleotídeos da adenina. Nosso modelo agudo demonstrou uma diminuição significativa da hidrólise de ATP, ADP e AMP, no primeiro momento medido após o choque, 0 horas ($p < 0,05$ para ATP, e $p < 0,01$ para ADP e AMP), enquanto no modelo crônico avaliou-se que a atividade sérica da enzima aumentava significativamente 48 horas após o último choque ($p < 0,05$ para os três nucleotídeos), permanecendo significativamente aumentada 7 dias após ($p < 0,001$ para os três nucleotídeos). Assim, os resultados do primeiro trabalho apóiam a proposta de que o choque eletroconvulsivo não produz dano neural, e que as alterações observadas nos níveis de S100B e lactato, refletem uma reação astrocitária de natureza protetora. No segundo observamos que o modelo crônico de choque eletroconvulsivo é capaz de induzir ativações enzimáticas sustentadas, o que pode apoiar a idéia de que a adenosina esteja associada com os mecanismos bioquímicos envolvidos nas mudanças cerebrais ocasionadas pela eletroconvulsoterapia.

1.2 Abstract

Electroconvulsive therapy is currently the most effective method in the treatment of depressive disorders, and its superiority over the pharmacological approaches is well documented. In spite of that, critics still look at the method as potentially injurious and capable of inducing brain lesions, facts that lack the support of scientific evidence. Hypothesis regarding the biochemical mechanisms unleashed by electroconvulsive therapy, as well as by the pharmacological treatments in general, have traditionally considered the monoaminergic system as the leading player in the orchestration underlying the recovery of depressive mood states. For some time now, efforts have been directed towards the identification of other systems that may have an important role. In this thesis we used a traditional model of electroconvulsive shock in rats to investigate its effects on markers of neuronal lesion, glial activity and energetic consumption, as well as the activity of ectonucleotidases. Wistar male rats of 60-90 days of age were assigned to two treatments. In the first, named acute, the individuals received a single electroconvulsive shock, and were subsequently sacrificed at pre-established times. In the second model, named chronic, the rats received eight shocks, mimicking a therapeutic course of electroconvulsive therapy in humans. In the chronic model sacrifice took place at pre-established times after the eighth shock. In the first study cerebrospinal fluid was extracted from the animals at 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after the sessions were over, and the levels of S100B protein, neuron specific enolase and lactate were measured. S100B levels were significantly elevated six hours after the last shock in the chronic model ($p < 0.0001$). Neuron specific enolase was not altered, and the levels of lactate increased significantly in the first measurement after the shock in both models ($p < 0.001$, for both). In the second trial the same model was used, now measuring serum levels of adenine nucleotide hydrolysis. Our acute model demonstrated a significant inhibition of the hydrolysis of ATP, ADP and AMP in the first measurement taken after the shock at 0 hour ($p < 0.05$ for ATP and $p < 0.01$ for ADP and AMP), whereas in the chronic model the serum activity of the enzyme increased significantly 48 hours after the last shock ($p < 0.05$ for the three nucleotides), remaining significantly increased after 7 days ($p < 0.001$ for the three nucleotides). Thus, the results of our first experiment support the proposal that the electroconvulsive shock does not produce neural injury, and that the alterations observed in the levels of S100B and lactate, reflect an astrocytic reaction of a protective nature. In the second we observed that the chronic model of electroconvulsive shock is capable of inducing a sustained enzymatic activation, what can support the idea that adenosine is associated with the biochemical mechanisms involved in the cerebral changes brought about by the electroconvulsive therapy.

2. LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CEC – Choque eletroconvulsivo

DAG – Diacilglicerol

ECT – Eletroconvulsoterapia

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

IP3 – Inositol trifosfato

N-CAM – Molécula neuronal de adesão celular

NMDA – N-metil-D-aspartato

NSE – Proteína enolase específica de neurônio

PKC – Proteína cinase C

PTZ – Pentilenotetrazol

RNA – Ácido ribonucleico

SNC – Sistema nervoso central

3. INTRODUÇÃO

3.1 Histórico

Um dos primeiros investigadores a induzir convulsões sistemáticas como método terapêutico no século passado foi Ladislav Joseph von Meduna. Ao examinar os cérebros de pacientes do hospital psiquiátrico de Budapeste acreditou que havia um espessamento da neuroglia de pacientes epiléticos enquanto nos esquizofrênicos parecia ocorrer o oposto. Essa observação nunca comprovada levou-o a postular haver um antagonismo entre

epilepsia e estados psicóticos, e que a indução de crises convulsivas poderia ter um papel terapêutico no manejo desses. Para obtê-las usou uma injeção intramuscular de cânfora o que foi capaz de produzir uma crise do tipo grande mal aproximadamente 45 minutos depois da aplicação, obtendo resultados terapêuticos satisfatórios (Shorter, 1997). A cânfora foi posteriormente substituída por pentilenotetrazol, mas a agonizante fase de espera pela crise convulsiva e o mal estar profundo do paciente nesse período levam a procurar outros métodos de indução da crise convulsiva (Thuillier, 1999). Dessa maneira, Ugo Cerletti, na Universidade de Roma, no dia 18 de abril de 1938, realiza o primeiro procedimento de eletroconvulsoterapia (ECT) em seres humanos, inaugurando um método que, com algumas alterações, permanece em uso até hoje (Dubovski, 1995). No Rio Grande do Sul, Álvaro Murillo da Silveira introduziu em 1942, no Hospital Psiquiátrico São Pedro, a eletroconvulsoterapia usando um aparelho construído pelo engenheiro Olmiro Ilgenfritz. (Busnello, 1995).

Ao longo de sua história as indicações para o uso do ECT têm sido ditadas não pelos resultados que demonstra quando submetido ao escrutínio científico, mas pelas percepções do público, meio cultural aonde ele é empregado e por inclinações dos profissionais que lidam com transtornos mentais graves, além de peculiaridades da legislação local (Winslade et al, 1984). Hoje, mesmo com indicações precisas para diagnósticos definidos, a realização da ECT ainda está sujeita a esses fatores, o que explica taxas altamente discrepantes de utilização entre diferentes populações. Dados demonstram que há, proporcionalmente, uma maior utilização por membros das classes média e alta (Babigian & Guttmacher, 1984), ao contrário do que ocorria na década de 1950 quando classes desprivilegiadas tinham uma maior probabilidade de serem submetidas ao procedimento (Hermann et al, 1995). Negros

são sub-representados entre aqueles que recebem ECT (Thompson et al, 1994). Hospitais privados aplicam mais que os públicos (Thompson & Blaine, 1987) e a presença de um centro acadêmico na área aumenta a chance de aplicação (Hermann et al, 1994).

3.2 Efetividade da Eletroconvulsoterapia

Os mais de sessenta anos de história da ECT foram acompanhados por avanços em diversas áreas da psiquiatria, principalmente no campo diagnóstico e farmacológico (Andreasen, 1985). A organização dessas áreas ofereceu uma base mais sólida para o estudo dos mecanismos biológicos dos transtornos mentais e uma apuração mais precisa da qualidade dos tratamentos disponíveis. A ECT teve sua indicação terapêutica mais direcionada aos casos de depressão maior, vindo a ser comparada com as alternativas farmacológicas de tratamento a depressão, indiscutivelmente o método terapêutico mais utilizado no mundo ocidental nos dias de hoje. Relatos clínicos e observações empíricas apontaram regularmente a ECT como uma estratégia terapêutica superior às demais na resolução de quadros de humor, tanto por conseguir uma diminuição mais acentuada dos sintomas como por alcançá-la em um espaço de tempo significativamente mais curto (Strober et al, 1998; Flint & Rifat, 1998; Folkerts et al, 1997). Essa superioridade às drogas antidepressivas foi novamente confirmada em abrangente estudo metanalítico (UK ECT Review Group, 2003).

3.3. Eletroconvulsoterapia e Dano Cerebral

Apesar de sua efetividade, e de uma diminuição do estigma relacionado a ECT nos últimos anos, ele ainda é visto muitas vezes como uma alternativa terapêutica de exceção, reservada a casos refratários ou severos (Fink, 2005). Críticos persistem exigindo apurações

minuciosas e o debate acerca da relação da ECT e danos no sistema nervoso central (SNC) tornou-se uma polêmica intermitente e crônica (Sterling, 2000; Abrams, 2000) que promete sofrer reavaliações periódicas conforme as exacerbações do ânimo de seus críticos mais loquazes e sua capacidade de reanimar na sociedade antigos preconceitos sobre o método. Todavia, dados científicos têm demonstrado repetidamente que a ECT não produz lesões neuronais, e que dentro dos parâmetros atuais de dose e duração do estímulo elétrico, elas são uma possibilidade remota (Zachrisson et al, 2000; Reisner, 2003). Estudos clássicos em animais avaliaram alterações neuropatológicas usando técnicas de fixação por perfusão e contagem de neurônios. Os resultados indicaram que nas doses atualmente em uso não há uma diminuição no número de neurônios ou alteração patológica (Devanand et al, 1994). Atualmente estudos mais rigorosos (Dwork et al, 2004) e com marcadores mais sensíveis ofereceram novas oportunidades para a avaliação de danos provocados pela ECT (Pellers et al, 2004; Agelink et al, 2001). Os resultados obtidos até agora se alinham com os dos estudos mais antigos apontando uma ausência de dano.

3.4 Efeitos tróficos e protetores do choque eletroconvulsivo

Atualmente já existe um significativo corpo de evidências apontando que o choque eletroconvulsivo é capaz de mobilizar mecanismos cerebrais de natureza protetora e trófica (Ongur & Heckers, 2004; Altar et al, 2004; Stewart & Reid, 2000; Lamont et al, 2001). Madsen e colaboradores foram os primeiros a relatar um possível papel da eletroconvulsoterapia na neurogênese em cérebro de animais adultos (Madsen et al, 2000). Com isso não tardaram em surgir hipóteses propondo que os mecanismos de ação da ECT

poderiam depender, em parte, da estimulação da plasticidade neuronal e sináptica em determinadas áreas do cérebro (Jacobs, 2002).

Relatos de um aumento da molécula neuronal de adesão celular (N-CAM) existem há mais de 20 anos (Jorgensen & Bolwig, 1979). Outros fatores também demonstraram alterações significativas após um curso de CEC, sendo essas alterações, possivelmente, de natureza salutar (Jeon et al, 2005; Strome et al, 2005; Sun et al, 2005; Kim et al, 2005; Barichello et al, 2004; Shen et al, 2003).

3.5 Modelos Experimentais de Eletroconvulsoterapia

O método experimental de eletroconvulsoterapia em ratos vem sendo utilizado em trabalhos de neurociências por mais de duas décadas (Meldrum, 1986). Os modelos de choque eletroconvulsivo (CEC) crônico e agudo são rotineiramente publicados e aceitos como o equivalente animal da ECT em humanos (Cereser et al, 2006; Wennstrom et al, 2006; Hellsten et al, 2005). A técnica mais comum, e também a utilizada neste estudo, consiste da colocação de dois cliques, um em cada orelha do rato. Para que o circuito elétrico seja fechado a corrente tem que necessariamente passar pelo cérebro do animal, tal qual ocorre nas descargas elétricas num procedimento de ECT em humanos. Os parâmetros do estímulo elétrico são 150 volts, 60 hertz em onda sinusoidal, por dois segundos (Barrichelo et al, 2004). Choques dentro dessas especificações são capazes de induzir nos animais uma crise convulsiva tônico-clônica, generalizada, muito semelhante a que o procedimento de ECT induz em humanos.

3.6 PROTEÍNA S100B

A proteína S100B é um membro da família das proteínas implicadas nas atividades intracelulares do Ca^{2+} , sendo esta proteína objeto de extensiva pesquisa nas últimas décadas (Donato, 2001). Ela foi primeiramente descrita em encéfalo bovino, recebendo o nome S100 devido a sua solubilidade em uma solução de sulfato de amônio 100% saturada (Moore, 1965), e definida como sendo específica do encéfalo. Em estudos posteriores, foi demonstrado que o encéfalo bovino consistia de duas proteínas distintas, porém estreitamente relacionadas (Isobe & Okuyama, 1981). Estas duas isoformas consistem de um dímero α - α , denominado S100A1 e um dímero β - β , denominado S100B (Isobe et al, 1981). Existem dezenove membros descritos na família destas proteínas (Donato, 2001).

No SNC a localização da proteína S100A1 é principalmente em neurônios, enquanto que a proteína S100B está em maior concentração nos astrócitos, e em menor grau, nas células de Schwan (Donato, 1991; Donato, 1999). Apesar de ser uma proteína intracelular, alguns membros desta família desempenham funções extracelulares (Shashoua et al, 1984; van Eldick & Zimmer, 1987; Zimmer et al, 1995). O Ca^{2+} liga-se na proteína S100, provocando mudanças estruturais expondo resíduos hidrofóbicos, podendo estes ser os sítios de ligação com a proteína-alvo, resultando em uma resposta celular (Rustandi et al, 1999; Garbuglia et al, 1999).

No meio intracelular, a proteína S100 tem sido relacionada com as seguintes funções biológicas: (i) regulação da fosforilação de proteínas constituintes do citoesqueleto; (ii) modulação da atividade das enzimas ATPase, adenilato ciclase e aldolase; (iii) participação modulatória no ciclo celular; e (iv) manutenção da homeostasia do Ca^{2+} intracelular (Donato, 1991; Zimmer et al, 1995; Schafer & Heizmann, 1996; Gentil et al, 2001). No

meio extracelular, esta proteína é secretada por diferentes tipos celulares exercendo os seguintes efeitos: (i) efeitos tróficos e neuroprotetores, em concentrações de ordem nanomolar; (ii) efeitos tóxicos, em concentrações de ordem micromolar; (iii) indução de apoptose; e (iv) liberação de serotonina (Donato, 2001).

Dentre as proteínas da família S100, a S100B é o membro mais estudado. Diversos estudos sugerem que a S100B no soro e líquido pode ser utilizada como marcador de injúrias no SNC. A determinação precoce das concentrações de S100 no soro e líquido em pacientes com lesão cerebral, poderia refletir a extensão da lesão, desse modo podendo ser considerada um marcador prognóstico (Aurell et al, 1991). Apesar de estudos demonstrarem que a proteína S100B está alterada em diversas situações patológicas (Ingebrigtsen & Romner, 1996; Rosen et al, 1998; Abraha et al, 1997), dados sobre a proteína S100B são controversos. Existem estudos apontando um aumento nos níveis de S100B em pacientes com epilepsias intratáveis e pacientes que apresentaram um único episódio convulsivo (Steinhoff et al, 1999; Otto et al, 1999). Por outro lado, diversos estudos não conseguiram demonstrar aumento nos níveis de S100B nestas mesmas situações (Buttner et al, 1999; Palmio et al, 2001; Leutmezer et al, 2002).

3.7 PROTEÍNA NSE

A enolase é uma enzima da via glicolítica sendo conhecidos três tipos de subunidades e cinco isoenzimas ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$, $\alpha\beta$ e $\alpha\gamma$). A distribuição destas isoenzimas é bem conhecida: células gliais contêm somente a $\alpha\alpha$ -enolase, enquanto a $\gamma\gamma$ -enolase é específica de neurônios. Dentre as proteínas ácidas presentes no encéfalo, a mais abundante em

neurônios, é a proteína enolase específica de neurônio (NSE). Inicialmente fora denominada proteína 14-3-2, porém devido a ser específica de neurônios e à sua atividade enolásica, foi denominada enolase específica de neurônio (Kaiser et al, 1989). Esta enzima da via glicolítica foi descrita na década de 80 como marcador em diversos tipos tumorais, e recentemente, tem sido utilizada como marcador de injúria de SNC (Kaiser et al, 1989; Lamers et al, 2003; Guan et al., 2003).

Estudos demonstram que a NSE está aumentada em diversas patologias do SNC (Rodríguez-Nuñez et al, 2003; Guan et al, 2003; Ko et al, 1990). Estes estudos demonstram principalmente, que a NSE apresenta-se aumentada somente quando há dano que provoca morte neuronal (Lamers et al, 2003). Em convulsões, pacientes que apresentaram uma febre convulsiva não apresentaram aumento nos níveis de NSE, enquanto que pacientes que apresentaram uma convulsão devido a outro fator que não a febre, apresentaram altos níveis de NSE (Ko et al, 1990).

3.8 NUCLEOTIDASES

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas localizadas nas membranas celulares ou presentes na forma solúvel nos meios intra e extracelulares. Uma vez liberados no espaço extracelular, os nucleotídeos exercem diversos efeitos como moléculas sinalizadoras, e têm suas funções terminadas pela ação das nucleotidases (Zimmermann, 2001). Assim, as nucleotidases desempenham um importante papel no controle da homeostasia dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares.

Diversas enzimas estão envolvidas no controle dos níveis dos nucleosídeos trifosfatados e difosfatados, sendo as principais enzimas envolvidas neste processo aquelas que são membros da família das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), da família das E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfato/ fosfodiesterase) e da família das fosfatases alcalinas. Nucleosídeos monofosfatados estão sujeitos a ação da ecto-5'-nucleotidase, porém podem também ser hidrolisados pela fosfatase alcalina (Zimmermann, 2001).

O nosso grupo vem estudando basicamente as enzimas da família das NTPDases e 5'-nucleotidase, caracterizando estas enzimas de diferentes origens biológicas, além de demonstrar alterações nestas enzimas em diversas situações fisiológicas e patológicas (Battatini et al, 1991; Battastini et al, 1995; Sarkis & Salto, 1991; Bonan et al, 2000a; Bonan et al, 2000b; Bonan et al, 2000c; Bruno et al, 2002; Bruno et al, 2003).

As NTPDases são classificadas como: NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3, NTPDase4, NTPDase5 e NTPDase6. As NTPDase1-3 são enzimas ancoradas na membrana celular pelos terminais N-terminal e C-terminal e um extensivo “loop” transmembrana onde estão localizadas as cinco regiões conservadas da apirase. Estas NTPDases hidrolisam os nucleotídeos das purinas e pirimidinas, as enzimas estão adaptadas ao meio extracelular e requerem cátions divalentes como o Ca^{++} ou Mg^{++} e um pH alcalino. O valor do K_m para o ATP está na faixa micromolar (Goding, 2000).

A principal diferença entre estas três enzimas (NTPDase 1, 2 e 3) é a especificidade pelo substrato. A NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção da hidrólise destes dois substratos de 1:1, e é conhecida também como CD39, ecto-apirase ou ecto-ATP difosfohidrolase. A NTPDase2 tem uma preferência trinta vezes maior pelo ATP

do que pelo ADP (30:1), sendo a mesma considerada uma ecto-ATPase. A NTPDase3 tem uma preferência maior para o ATP do que o ADP. A NTPDase3 hidrolisa o ATP aproximadamente três vezes mais que o ADP, sendo considerada uma CD39, ecto-apirase ou ecto-ATP difosfohidrolase. Embora existam estas diferenças na especificidade pelo substrato entre esses três membros das NTPDases, suas especificidades por células ou tecidos ainda é pouco compreendida (Zimmermann, 2001). Espera-se que a diferença na especificidade destas três enzimas tenha um distinto impacto na ativação dos receptores purinérgicos. Devido ao fato da NTPDase1 hidrolisar ATP e ADP igualmente bem, resulta, conseqüentemente, a inativação dos receptores P2X (ativados exclusivamente por ATP) e P2Y (ativados por ATP, ADP, UDP e UTP), gerando nucleotídeos monofosfatados (Zimmermann 2001).

A NTPDase4, embora possua uma estrutura como a das NTPDases 1, 2 e 3, tem, em humanos, uma localização celular completamente diferente. Elas têm sido descritas no complexo de Golgi (UDPase, NTPDase4 β) e em vacúolos lisossômicos e autofágicos (NTPDase4 α). A NTPDase4 α tem uma alta preferência por UTP e TTP, enquanto que a NTPDase4 β apresenta alta preferência por CTP e UDP. A função das NTPDases1 e 2 parece ser a de hidrolisar ATP no sentido de terminar com o processo de neurotransmissão e ao mesmo tempo evitar a ligação do nucleotídeo a receptores citotóxicos (Kukulski & Komoszynski, 2003).

A NTPDase5 e a NTPDase6 apesar de apresentarem as regiões conservadas das apirases, apresentam propriedades diferentes das outras NTPDases. Elas estão ancoradas na membrana celular somente pela porção N-terminal, não havendo ancoragem no domínio C terminal. A NTPDase5 de humanos apresenta alta preferência por nucleotídeos

difosfatados, principalmente GDP e UDP. A NTPDase6 também seria uma enzima secretada solúvel, porém a origem desta enzima seria no complexo de Golgi. Acredita-se que essas enzimas, apesar de possuírem um terminal ligado à membrana, seriam facilmente liberadas para o meio extracelular. Como as outras NTPDases, a NTPDase5 e a NTPDase6 são ativadas por cátions divalentes, e tem uma preferência maior por nucleotídeos difosfatados.

Diversos estudos vêm demonstrando a importância das NTPDases em diversas situações patológicas, inclusive em epilepsia e convulsão (Schetinger et al, 1999; Braun et al, 1998; Frassetto et al, 2000; Bonan et al, 2000a; Bonan et al, 2000b; Bruno et al, 2002; Bruno et al, 2003), indicando que estas enzimas estão envolvidas na formação de adenosina extracelular, um importante neuromodulador e neuroprotetor (Cunha, 2001; Rebola et al, 2003). Além disso, recentes trabalhos tem proposto o desenvolvimento de inibidores específicos para as NTPDases, o que possibilitaria uma melhor compreensão do papel fisiológico desempenhado por estas enzimas, possibilitando assim o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Gendron, 2002).

3.9 SISTEMA PURINÉRGICO

Purinas, principalmente ATP e adenosina, desempenham uma ação ampla e específica na sinalização extracelular, regulando assim diversas funções em tecidos de vertebrados e invertebrados. Adicionalmente, desempenham um papel chave no desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular (Abbracchio & Burnstock, 1999). Os efeitos extracelulares das purinas são exercidos através de sua interação com receptores extracelulares ligados à membrana citoplasmática. Os receptores de purinas foram sub-

divididos baseados com suas propriedades farmacológicas como receptores P1 (seletivos para adenosina), e receptores P2 (seletivos para ATP) (Gendron et al, 2002).

Contudo, os primeiros trabalhos demonstrando a ação extracelular do ATP atuando como um neurotransmissor, surgiram na década de 50, no qual foi demonstrada a liberação de ATP em nervos sensoriais (Holton & Holton, 1954; Holton, 1959). Em estudos posteriores, foi demonstrado que além das transmissões colinérgicas e adrenérgicas existe uma transmissão puramente purinérgica, no qual o ATP é o principal neurotransmissor (Burnstock, 1972) e a existência de receptores específicos para nucleosídeos e nucleotídeos (Burnstock, 1978).

O ATP é armazenado em vesículas nos terminais nervosos, e co-liberado com noradrenalina, acetilcolina e serotonina (von Kuegelgen & Starke, 1991; Richardson & Brown, 1987). Esta liberação é realizada de uma forma Ca^{2+} -dependente (Phillis & Wu, 1981).

Assim que é liberado para o espaço extracelular o ATP exerce suas funções através de sua interação direta com os receptores P2, sendo que estes estão subdivididos em duas famílias distintas: a família P2X ligada a um canal ionotrópico, esta envolvida na transmissão excitatória rápida, e a família P2Y metabotrópica, ligada em uma proteína-G. A família P2X está dividida em 8 membros e aproximadamente 11 membros da família P2Y têm sido clonados e caracterizados. Sete receptores P2X (P2X1-7) e seis receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 e P2Y12) são farmacologicamente distintos e possuem suas respostas funcionais descritas (Burnstock & Williams, 2000).

A estimulação dos receptores P2X causa um influxo dos cátions Ca^{2+} e Na^{+} , despolarização e geração do potencial de ação. A ativação de receptores P2Y estimula a

fosfolipase C via proteína-G; esta enzima, por um lado, irá catalisar as sínteses de inositol trifosfato (IP3), e de diacilglicerol (DAG). IP3 vai ativar receptores específicos no retículo endoplasmático, causando a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático no citosol, finalmente mediando uma inibição dos canais de K^{+} tipo M. DAG vai ativar a proteína cinase C (PKC), gerando potenciais de ação.

Além disso, o ATP é capaz de inibir pré-sinápticamente a liberação de glutamato no hipocampo, estimular a liberação do ácido γ -aminobutírico (GABA) e glicina no hipocampo e no corno da medula espinhal, respectivamente (Inoue, 1998).

A adenosina é um nucleosídeo que desempenha múltiplas funções na modulação de diferentes atividades do SNC (Moreau & Huber, 1999). Seu primeiro efeito extracelular foi descrito na década de 80, quando foi demonstrado um efeito depressor nas atividades neuronais (Dunwiddie, 1985). Contudo, em baixas concentrações, foram descritas ações estimulatórias da adenosina em fatias de hipocampo (Okada et al, 1992). Estudos posteriores demonstraram que a adenosina exerce diversos efeitos como: diminuir a liberação de aminoácidos excitatórios, hiperpolarizar a membrana neuronal, conter a ativação do N-metil-D-aspartato (NMDA), limitar o influxo de Ca^{2+} , inibir a formação de radicais livres, exercer efeitos modulatórios nas células gliais e bloquear a liberação de neurotransmissores (Mendonça et al, 2000).

A adenosina pode aparecer no meio extracelular de duas maneiras: i) sendo liberada diretamente sob a forma de adenosina, via transportadores bidirecionais de nucleosídeos; ou ii) de uma maneira indireta, via ação de nucleotidasas, através da degradação dos nucleotídeos da adenina liberados para o meio extracelular (Latini & Pedata, 2001).

Ao ser liberada para o meio extracelular, a adenosina desempenha suas funções através da interação com receptores P1 (Gendron et al, 2002). Todos os receptores de adenosina são receptores ligados a uma proteína G com sete domínios transmembrana, e estão ligados a uma variedade de mecanismos de transdução (Dunwiddie & Masino, 2001). Os receptores P1 estão divididos em quatro subtipos: A1, A2A (receptores de alta afinidade), A2B e A3 (receptores de baixa afinidade) (Dunwiddie & Masino, 1997). Os receptores A1 são amplamente distribuídos no encéfalo e estão ligados à ativação dos canais de K⁺ (Trussell & Jackson, 1985) e inibição dos canais de Ca²⁺ (Macdonald et al, 1986), ambos podendo inibir a atividade neuronal. Os receptores A2A são expressos em altos níveis somente em poucas regiões do encéfalo, sendo primariamente ligados à ativação da adenilil ciclase. O antagonismo dos receptores A1 e A2A são os responsáveis pelos efeitos estimulantes dos antagonistas de adenosina, embora a estimulação da atividade motora seja primariamente devido a um efeito dos receptores A2A (Ongini et al, 1997; El Yacoubi et al, 2000). Os receptores A2B, que também ativam a adenilil ciclase, têm sido propostos como ativadores da proteína netrin-1, controlando o alongamento axonal e guiando a ligação axonal (Ribeiro et al, 2003). A localização e função dos receptores A3, no SNC, ainda é pouco conhecida, embora recentemente tenha sido proposto um possível papel neuroprotetor desempenhado por este receptor (Ribeiro et al, 2003).

A adenosina é um importante modulador da excitabilidade neuronal no SNC (Kostopoulos et al, 1989), e sua ação se dá através da ativação dos receptores pré-sinápticos A1 de adenosina, reduzindo a liberação de neurotransmissores, deprimindo a atividade neuronal no SNC (Fredholm & Dunwiddie, 1988; Phillips & Wu, 1981). Diversos estudos têm demonstrado um envolvimento do sistema purinérgico nos processos de epilepsia e

convulsão (Dragunow, 1988; Dunwiddie et al, 1997). Alguns estudos demonstram que a resposta anticonvulsivante de adenosina é predominantemente mediada por mudanças nos receptores A1 (Malhotra & Gupta, 1997), estando aumentados após um abrasamento com pentilenotetrazol (PTZ). Ainda, outros estudos demonstraram um aumento significativo dos receptores A1 de adenosina em diferentes regiões cerebrais (Angelatou et al., 1990) e uma “upregulation” nos receptores A1 de adenosina foi observada 1 hora após a convulsão induzida por PTZ, sendo que este estado permaneceu por 14 dias (Pagonopoulou & Angelatou, 1998; Pagonopoulou et al, 1993; Angelatou et al., 1990). Além disso, estudos experimentais têm demonstrado um aumento nos níveis de adenosina após convulsão (Pasini et al, 2000; Berman et al, 2000), e em muitas situações patológicas estão associadas com um rápido aumento dos níveis de adenosina no plasma e líquido (Pasini et al, 2000; Rodriguez-Nuñez et al, 2001). Os níveis de adenosina na fenda sináptica aumentam durante períodos de demanda metabólica, como as convulsões (Dunwiddie et al, 1997).

A neuromodulação mediada pela adenosina não envolve somente a liberação deste nucleosídeo per se, mas também o catabolismo extracelular do ATP pelas nucleotidases presentes no SNC (Bonan et al, 2000a).

4. OBJETIVOS DO TRABALHO

Considerando que:

- ✓ Os mecanismos de ação da ECT ainda permanecem por ser estabelecidos;
- ✓ Criticas ainda existem quanto à possibilidade desse tratamento ocasionar lesões cerebrais;
- ✓ Novas evidencias sugerem um importante papel da astroglia na recuperação de estados depressivos;
- ✓ Estudos do nosso grupo demonstraram que a proteína S100B pode ser um marcador de dano glial ou astrogliose reativa dependendo da intensidade de suas alterações;
- ✓ Poucos estudos existem avaliando o papel do sistema purinérgico na depressão;
- ✓ Foi demonstrado por estudos deste departamento que as enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, particularmente a NTPDase, estão alteradas em diferentes modelos animais de epilepsia e convulsão;
- ✓ Também descrevemos, a presença de NTPDases solúveis no soro de ratos, e propomos que estas enzimas podem ser uma ferramenta promissora em doenças do SNC.

Tendo estas informações, pretendemos neste trabalho:

- ✓ Avaliar os níveis da proteína S100B líquórica de ratos, em diferentes tempos após uma única administração de CEC e após uma série de oito choques mimetizando o um curso de ECT em humanos;
- ✓ avaliar os níveis da NSE líquórica, um clássico marcador de morte neuronal, em diferentes tempos após uma única administração de CEC e após uma série de oito choques mimetizando o um curso de ECT em humanos;
- ✓ Avaliar os níveis de lactato, em diferentes tempos após uma única administração de CEC e após uma série de oito choques mimetizando o um curso de ECT em humanos;
- ✓ investigar o envolvimento da atividade NTPDásica no soro de ratos quando submetidos a estes modelos de CEC.

PARTE II

1. Artigo “Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity”
2. Artigo “Peripheral Nucleotide Hydrolysis in Rats Submitted to a Model of Electroconvulsive-Therapy”

1. “Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity”

Artigo aceito para publicação no periódico Life Sciences. A formatação do artigo obedece às normas da revista.

Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity

João Vicente Busnello^{1,2}, Renata Leke¹, Jean Pierre Oses¹, Gustavo Feier³, Ricardo S. Bruch⁴, João Quevedo³, Flávio Kapczinski², Diogo O. Souza¹, Luis Valmor Cruz Portela¹.*

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

² Laboratório de Psiquiatria Experimental, Centro de Pesquisa, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2350 90035-000 Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil.

⁴ Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, FUC, Porto Alegre, 90620-001

***Corresponding Author:**

João Vicente Busnello

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo

CEP 90035-003 Porto Alegre – RS – Brasil

Telephone number: + 55 51 3316 5558

FAX: + 55 51 3316 5540

E-mail: joaovi@terra.com.br

Abstract

Electroconvulsive therapy (ECT) is considered one of the most effective treatments of major depression, but controversy still exists on whether it may be brain damaging. The aim of this work was to evaluate the cerebrospinal fluid (CSF) levels of neuron specific enolase (NSE), protein S100B and lactate of rats submitted to acute and chronic models of Electroconvulsive shock (ECS). Rats were submitted to either one shock (acute) or a series of eight shocks, applied one at every 48 hours (chronic). CSF samples were collected at 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after the shock in the acute model and at these same time intervals after the last shock in the chronic model. Neither model produced significant alterations in the levels of NSE. S100B levels were significantly increased at six hours in the chronic model ($p < 0.0001$). There was a significant increase in the levels of lactate at 0 hours in both models ($p < 0.001$). These results support the proposition that ECS does not produce neural damage, and suggest that the alterations in the levels of S100B and lactate may reflect an astrocytic activity of a protective nature.

Key words: NSE, S100B, lactate, electroconvulsive shock, electroconvulsive therapy

Introduction

Among current anti-depressive treatments electroconvulsive therapy (ECT) has been shown to be an effective and safe method (UK ECT Review Group, 2003). However, the stigmatization related to ECT has kept this method as a last resort alternative in the treatment of patients with mood disorders (Fink, 2005). Critics still argue that ECT may be related to brain damage (Sterlin, 2000). However, current evidence shows that any putative deleterious effect of ECT remains to be proven. Mechanisms underlying antidepressive action tend to emphasize monoamine neurotransmission imbalances. However, novel research has postulated several systems that can have a pivotal implication on symptoms (Wong and Licinio, 2000), among these, glial and neuronal plasticity are candidates who deserve a careful examination (Manev et al., 2003).

Electro Convulsive Shock (ECS)-induced damage in animals has been studied since late in the first half of the last century, after the introduction and popularization of ECT. Classical studies evaluated neuropathological changes using perfusion fixation techniques and neuronal cell counting. Overall their results indicated that electric doses of ECS in the therapeutic range were safe (Devanand et al., 1994). For some time now, cerebral markers have been used to assess ECT-induced injuries at neuronal and glial levels. These have also failed to evidence damage (Zachrisson et al., 2000). Research evidence from other studies with these markers postulated that their peripheral levels may not only be expressing injury but adaptive brain alterations as well (Portela et al., 2002; Dietrich et al., 2003; Van Eldik and Wainwright, 2003).

S100B, a calcium binding protein is physiologically expressed and secreted by astrocytes. Its extra cellular concentrations in the nanomolar range exert a pro-survival effect on

neurons and astrocytes, whereas micromolar concentrations may induce neuronal death via apoptosis (Van Eldik and Wainwright, 2003). Various intracellular activities of this protein have been described, such as modulation of enzyme activity, protein phosphorylation, cytoskeletal integrity and dynamics, interaction with transcription factors, regulation in exocytosis and cell cycle. Its extracellular activities are particularly relevant to understanding the potential of the protein in mediating neuropathological outcomes after brain injury (Donato, 2003). However, independently from its roles, the peripheral levels of S100B have been used as marker of brain injury or as marker of astrocytic responses to neuronal injury (Donato, 2003; Van Eldik and Wainwright, 2003; Vos et al., 2004) and the efficacy of strategies of neuroprotection (Kogel et al., 2004).

Neuron specific enolase (NSE) is a glycolytic pathway enzyme, and its $\gamma\gamma$ isoform is predominantly neuronal (Heizman, 2004; Kaiser et al., 1989). Since NSE is not physiologically secreted, increases in its peripheral levels have been specifically related to neuronal injury, as reported in traumatic brain injury (Herrmann et al., 1999), stroke (Persson et al., 1987) and epileptic seizures (Rabinowicz et al., 1996).

Glial cells, which have long been assigned trophic functions, seem to play a pivotal role in meeting the energy requirements of active neurons (Deitmer, 2001; Fillenz, 2005). The astrocyte–neuron lactate shuttle hypothesis proposes that, in addition to the simple glucose diffusion from capillaries to neurons through the intercellular spaces or its transport via the astrocytes, glucose is converted inside the astrocytes into lactate, which in turn, is transferred to neurons to be used as energy substrate (Bouzier-Sore et al., 2003). It has been postulated that under neuronal stress, astrocytes exert a pivotal role to help neurons to obtain energy and survive (Bouzier-Sore et al., 2003; Pellerin, 2005). Thus, the levels of

lactate have been used as an index of astrocytic responses to high neuronal necessity (Makoroff et al, 2005).

The present study was designed to assess the effect of acute and chronic electroconvulsive shock (ECS) on cerebrospinal fluid (CSF) levels of markers of neuronal damage (enolase) and astrocytic activity/damage (S100B and lactate).

Materials and Methods

Chemicals

S100B immunoluminescent assay kit, LIA-mat®, was obtained from Sangtec Medical (Dietzembach, Germany). NSE electrochemiluminescent assay kit was purchased from Roche Diagnostics Corporation® (Indianapolis, USA) and lactate from Katal Biotecnologica®(MG, Brazil). All other reagents were of analytical grade.

Animals, CSF samples and study design

The study protocol consisted of two models of electroconvulsive shock, using male Wistar rats (250-300 g). The first model (ACUTE) consisted of the application of a single electroconvulsive shock and subsequent collection of cerebral-spinal fluid (CSF) samples at specific points of time (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 hours), after which individuals were immediately sacrificed. In the CHRONIC model a series of 8 ECS's were applied to each rat. There was a 48 hour interval between each application. CSF samples collection occurred 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after the last shock.

The rats were anesthetized with 40 mg/kg of sodium thiopental (Cristalia, Itapira, SP, Brazil), i.p., and the CSF was drawn (80 - 100 µl per rat), by direct puncture of the cisterna magna with an insulin syringe (27 gauge 31/20 length). Individual samples that presented visible blood contamination were discarded. After sampling, the samples were centrifuged at 4500 x g at 5 °C for 5 min, to obtain cell-free supernatants (see Cruz Portela et al., 2002). CSF samples were stored at -70 °C and defrosted only when measurements were carried out.

Every time group consisted of an average of five rats. In the sham groups, rats were handled in the exact same way, with the ECT apparatus momentarily placed on them, but no electric current was applied.

Electroconvulsive shock (ECS)

Electroconvulsive shock was applied via bilateral clip electrodes. The stimulus parameters were 150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds. Each stimulation elicited tonic-clonic seizures. We have chosen these procedures due to its resemblance to ECT treatment in clinical practice, be it in the number of shocks applied or in the intensity of the stimulus. This protocol was performed as approved by the Ethics Committee of the Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Measurement of NSE protein levels

An electrochemiluminescent assay kit was used to measure NSE. It consists of a double sandwich assay that use an antibody anti-NSE bound with ruthenium, which is the

luminescent molecule. Reactions and quantification were performed by Elecsys-2010 (Roche Diagnostics Corporation®) (Kulpa et al., 2002). NSE is expressed as ng/ml (mean \pm S.D.). The coefficient of variation was less than 5% for samples and standard.

Measurement of Lactate levels

Lactate was assayed in serum and standard using a lactate oxidase methodology manufactured by Katal Biotecnologica, MG, Brazil. All samples and standard were carried out in duplicate in the same experiment. A calibration factor was determined using a standard of lithium lactate (4.44 mmol/L). The coefficient of variation was less than 5% for samples and standard.

Measurement of S100B protein levels

Measurements of S100B were performed in a Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold) using an immunoluminescent assay kit, which use an antibody labeled with isoluminol (Portela et al., 2002). S100B standard curve was linear up to 20 ng/ml and the variation coefficient of duplicates in all range levels of standards and samples were within 5%. S100B levels are expressed as ng/ml (mean \pm S.D.).

Statistical Analysis

The data are expressed as means and standard deviations (S.D.). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze different time groups in the same model. Data

were considered statistically different when $p < 0.05$. All tests were performed with SPSS statistical package version 11.0 for Windows.

Results

NSE levels did not show any statistically significant difference in both acute and chronic models. Mean levels in the sham group were virtually identical for both chronic and acute models at 0.121 ng/ml. Standard deviations were 0.015 and 0.016 for acute and chronic models, respectively.

Lactate peaked immediately after the ECS. Sham group levels were $1.77 \text{ nmol/L} \pm 0.20$ in the acute model and $1.57 \text{ nmol/L} \pm 0.34$ in the chronic model. The 0 hour groups in both models showed a roughly twofold increase, as compared to sham group: 3.18 ± 0.52 ($p < 0.001$) and 2.82 ± 0.49 ($p < 0.001$) for acute and chronic models, respectively. Measurements descended to control levels in the very next time group taken at three hours (Fig. 1).

S100B levels in the acute and chronic sham groups were 4.03 ± 1.95 and 4.03 ± 2.73 ng/ml, respectively. In the chronic model there was an increase in S100B levels, which started at 0 min, and reached significant levels of 19.22 ± 7.61 at its peak at 6 hours ($p < 0.0001$, Fig. 2). ANOVA of the levels of S100B acute model did not show difference between groups.

Discussion

As the intercellular space in the brain is in direct contact with the CSF, biochemical changes in brain tissue may be reflected in the CSF (Zachrisson et al., 2000). As far as we are aware this is the first study which has compared the effects of acute and chronic ECS models on CSF levels of S100B, NSE and lactate in rats. Two clinical studies have assessed peripheral levels of NSE and S100B in patients who underwent a course of ECT, aiming to evaluate if current standard ECT procedures are capable of inducing brain damage. In the first one NSE, S100B along with tau protein were measured in CSF samples taken two days before and one day after a course of six ECT sessions in a group of patients with major depressive disorder. Levels of NSE and S100B did not change after the treatment, which lead the authors to conclude that no biochemical evidence of neuronal or glial damage could be demonstrated after a therapeutic course of ECT (Zachrisson et al., 2000). One possible shortcoming of this work might have been the limited amount of timed-CSF samples the authors had access due to the clinical nature of their protocol. The second sample was taken one day after the last ECT session. In our study a significant peak of S100B occurred 6 hours after the last ECS session, decreasing to baseline levels 12 hours after the last session. Therefore, if S100B CSF levels, in a clinical sample, peak during the first six hours after the last ECT session remains to be established. The second study measured serum samples of NSE and S100B in a group of patients with a diagnosis of resistant major depression and schizodepressive psychosis. Participants were also submitted to cognitive tests. Serum samples were taken on the day before the series of ECT was started, 6, 24 and 48 hours after the first to third ECT, and 24 hours after the fourth, fifth,

sixth and last ECT. At no point during the course of ECT and after its completion there were significant increases in either NSE or S100B levels in peripheral blood serum. Moreover, NSE levels did not correlate with cognitive performance (Agelink et al., 2001). Again we cannot rule out the hypothesis that elevations of serum S100B levels may have occurred during the time interval between the last ECT session and the last serum sample collection 24 hours after that. Another study measured only NSE serum levels. Samples were taken even more frequently than in the other studies, both during and after the course of ECT, and, consonantly with those works, no increases were found (Berrouschot et al., 1997).

Two animal studies by the same group measured, among other markers, the levels of NSE in specific brain areas, but not in the CSF. They induced seizures by ECS and also through the infusion of lidocaine. Samples were measured in different limbic areas; namely the hippocampus, amygdala and piriform cortex. Either method of seizure induction failed to elevate NSE levels (Kragh et al., 1993). A subsequent paper revealed a significant, albeit small, elevation of NSE levels in the piriform cortex only, concluding that such a selective alteration is more likely to reflect increased gene transcription or a trophic role of NSE in enhancing ECS induced synaptic remodeling (Rasmussen et al., 1994). Our study showed that NSE levels in rat CSF remained steady throughout all measurements in both acute and chronic models. This study is in line with the above mentioned works suggesting that ECS does not cause neural injuries, and, therefore, adds to the body of evidence pointing that ECT is not brain damaging.

Moderate concentrations of S100B have been associated with neurite outgrowth (Haglid et al., 1997), neurotrophic and protective activities (Brewton et al., 2001), whereas highly

increased levels can enhance the production of pro-inflammatory cytokines (Koppal et al., 2001), stimulate the production of inducible nitric oxide synthase (Hu et al., 1996) or reflect direct brain damage (Leviton and Dammann, 2002; Van Eldik and Wainwrigth, 2003). Other types of antidepressive treatments have also been shown to increase S100B levels in experimental models (Manev et al., 2001). Roles for glia in the actions of ECT have been proposed. Post-mortem studies have consistently supported the proposition that depressive states are related to decreased numbers of glial cells (though without reduction in neuronal numbers) and that ECT may induce compensatory cellular changes (Öngur and Heckers, 2004). Moreover, an elevation in the concentration of hippocampal glial fibrillary acidic protein (GFAP), a specific astrocytic protein, in response to intense neuronal activity is a well-established phenomenon (Torre et al., 1993). In view of these facts, the increased levels of S100B in the chronic, but not in the acute model, seen in our work may also represent a valuable glial activation.

Acute and chronic models of ECS have shown to induce enhancement in brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor trk B gene expression in the rat brain (Lindfors et al., 1995). A previous study measured regional changes of BDNF mRNA levels in the rat dentate gyrus and piriform cortex by in situ hybridization histochemistry following acute and chronic models of ECS (Zetterstrom et al., 1998). Elevations were observed in both models. This phenomenon may lead to the speculation that ECS could enhance astrocytic and neuronal trophic activities during the course of an antidepressive response, and that the higher rate of efficacy of ECT as compared to other treatments could be due to its capacity to more fully mobilize brain mechanisms.

Differently from the observed with S100B, the increase in lactate levels presented very acute changes in both models. This fact may reflect the well-established acute increase in energy consumption during and immediately after a generalized seizure (Ingvar and Siesjo, 1983), which would induce astrocytic responses resulting in the increase of lactate production aiming to help the neuronal metabolism. However, in spite of the predominant contribution of astrocytic cells, neuronal anaerobic metabolism, which increases in hypoxic conditions, may also participate in the increment of CSF lactate levels. Therefore, due to the multiple mechanisms that may be related to increases in lactate in the CSF, we consider that lactate is a less specific marker than S100B level.

Conclusion

The present study indicated that acute and chronic ECS triggers astrocytic responses, as evidenced by lactate and S100B levels. While lactate levels increased after both ECS models, S100B varied only after the chronic model. All these data, together with the absence of variations in the levels of NSE, support the hypothesis that ECS-induced astrocytic responses may be of a neuronal protective nature. If these evidences are, or are not, related to the previously demonstrated therapeutic effect of ECT remains to be answered.

Acknowledgements

This work was supported with grants from CNPq, CAPES, FAPESC, UNESC and Instituto Cérebro e Mente.

References

1. Agelink, M.W., Andrich, J., Postert, T., Wurzinger, U., Zeit, T., Klotz, P., Przuntek, H., 2001. Relation between electroconvulsive therapy, cognitive side effects, neuron specific enolase, and protein S-100. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 71 (3), 394-396.
2. Berrouschot, J., Rolle, K., Kuhn, H.J., Schneider, D., 1997. Serum neuron-specific enolase levels do not increase after electroconvulsive therapy. *Journal of Neurological Sciences* 150 (2), 173-176.
3. Bouzier-Sore, A.K., Serres, S., Canioni, P., Merle, M., 2003. Lactate involvement in neuron-glia metabolic interaction: ¹³C-NMR spectroscopy contribution. *Biochimie* 85 (9), 841-848.
4. Brewton, L.S., Haddad, L., Azmitia, E.C., 2001. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100beta. *Brain Research* 912 (1), 9-16.
5. Cruz Portela L.V., Oses J.P., Silveira A.L., Schmidt A.P., Lara D.R., Oliveira Battastini A.M., Ramirez G., Vinade L., Freitas Sarkis J.J., Souza D.O., 2002. Guanine and adenine nucleotidase activities in rat cerebrospinal fluid. *Brain Research* 950(1-2),74-78
6. Deitmer, J.W, 2001. Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respiration Physiology* 129 (1-2), 71-81.
7. Devanand, D.P., Dwork, A.J., Hutchinson, E.R., Bolwig, T.G., Sackeim, H.A., 1994. Does ECT alter brain structure? *American Journal of Psychiatry* 151 (7), 957-970.

8. Dietrich, M.O., Tort, A.B., Schaf, D.V., Farina, M., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., Portela, L.V., 2003. Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Canadian Journal of Applied Physiology* 28 (5), 710-716.
9. Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique* 60 (6), 540-551.
10. Fillenz, M., 2005. The role of lactate in brain metabolism. *Neurochemistry International* 20; [Epub ahead of print].
11. Fink, M., 2005. Psychobiology of electroshock in *Biology of Depression*, ed. Julio Licinio, Wiley-VCH.
12. Haglid, K.G., Yang, Q., Hamberger, A., Bergman, S., Widerberg, A., Danielsen, N., 1997. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Research* 753 (2), 196-201.
13. Heizmann, C.W., 2004. S100B protein in clinical diagnostics: assay specificity. *Clinical Chemistry* 50 (1), 249-251.
14. Herrmann, M., Curio, N., Jost, S., Wunderlich, M.T., Synowitz, H., Wallesch, C.W., 1999. Protein S-100B and neuron specific enolase as early neurobiochemical markers of the severity of traumatic brain injury. *Restorative Neurology and Neuroscience* 14 (2-3), 109-114.
15. Hu, J., Castets, F., Guevara, J.L., Van Eldik, L.J., 1996. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 271 (5), 2543-2547.

16. Ingvar, M., Siesjo, B.K., 1983. Local blood flow and glucose consumption in the rat brain during sustained bicuculline-induced seizures. *Acta Neurologica Scandinavica* 68 (3), 129-144.
17. Kaiser, E., Kuzmits, R., Pregant, P., Burghuber, O., Worofka, W., 1989. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clinica Chimica Acta* 183 (1), 13-31.
18. Kogel, D., Peters, M., Konig, H.G., Hashemi, S.M., Bui, N.T., Arolt, V., Rothermundt, M., Prehn, J.H., 2004. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience* 127 (4), 913-920.
19. Koppal, T., Lam, A.G., Guo, L., Van Eldik, L.J., 2001. S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochemistry International* 39 (5-6), 401-407.
20. Kragh, J., Bolwig, T.G., Woldbye, D.P., Jorgensen, O.S., 1993. Electroconvulsive shock and lidocaine-induced seizures in the rat activate astrocytes as measured by glial fibrillary acidic protein. *Biological Psychiatry* 33 (11-12), 794-800.
21. Kulpa, J., Wojcik, E., Reinfuss, M., Kolodziejcki, L., 2002. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clinical Chemistry* 48 (11), 1931-1937.
22. Leviton, A., Dammann, O., 2002. Brain damage markers in children. Neurobiological and clinical aspects. *Acta Paediatrica* 91 (1), 9-13.

23. Lindfors, N., Brodin, E., Metsis, M., 1995. Spatiotemporal selective effects on brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNA in rat hippocampus by electroconvulsive shock. *Neuroscience* 65 (3), 661-670.
24. Makoroff, K.L., Cecil, K.M., Care, M., Ball Jr., W.S., 2005. Elevated lactate as an early marker of brain injury in inflicted traumatic brain injury. *Pediatric Radiology*. 35 (7), 668-676.
25. Manev, H., Uz, T., Manev, R., 2003. Glia as a putative target for antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders* 75 (1), 59-64.
26. Manev, R., Uz, T., Manev, H., 2001. Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 420 (2-3), R1-R2.
27. Ongur, D., Heckers, S., 2004. A role for glia in the action of electroconvulsive therapy. *Harvard Review of Psychiatry* 12(5), 253-262.
28. Pellerin, L. 2005. How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular Neurobiology* 32 (1), 59-72.
29. Persson, L., Hardemark, H.G., Gustafsson, J., Rundstrom, G., Mendel-Hartvig, I., Esscher, T., Pahlman, S., 1987. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 18 (5), 911-918.
30. Portela, L.V., Tort, A.B., Schaf, D.V., Ribeiro, L., Nora, D.B., Walz, R., Rotta, L.N., Silva, C.T., Busnello, J.V., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., Souza, D.O., 2002. The serum S100B concentration is age dependent. *Clinical Chemistry* 48 (6 Pt 1) 950-952.

31. Rabinowicz, A.L., Correale, J., Boutros, R.B., Couldwell, W.T., Henderson, C.W., DeGiorgio, C.M., 1996. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia* 37 (2), 122-125.
32. Rasmussen, C.V., Kragh, J., Bolwig, T.G., Jorgensen, O.S., 1994. Repeated electroconvulsive shock selectively increases the expression of the neuron specific enolase in piriform cortex. *Neurochemical Research* 19 (12), 1527-1530.
33. Sterling, P., 2000. ECT damage is easy to find if you look for it. *Nature* 403 (6767), 242.
34. Torre, E.R., Lothman, E., Steward, O., 1993. Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures. *Brain Research* 631 (2), 256-264.
35. UK ECT Review Group., 2003. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361 (9360), 799-808.
36. Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience* 21 (3-4), 97-108.
37. Vos, P.E., Lamers, K.J., Hendriks, J.C., van Haaren, M., Beems, T., Zimmerman, C., van Geel, W., de Reus, H., Biert, J., Verbeek, M.M., 2004. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology* 62 (8), 1303-1310.
38. Wong, M-L., Licinio, J., 2000. Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews. Neuroscience* 2, 343-351.

39. Zachrisson, O.C., Balldin, J., Ekman, R., Naesh, O., Rosengren, L., Agren, H., Blennow, K., 2000. No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Research* 96 (2), 157-165.
40. Zetterstrom, T.S., Pei, Q., Grahame-Smith, D.G., 1998. Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration. *Brain Research. Molecular Brain Research* 57 (1), 106-110.

Legends

Fig. 1. CSF levels of lactate after ECS (0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours) in acute and chronic models, as well as in the sham group. The data represent means \pm S.D. Chronic (* $p < 0.001$) and acute (# $p < 0.001$) models show a significant peak of lactate at 0 hours, as compared to the sham group, according to ANOVA.

Fig. 2. CSF levels of S100B after ECS (0, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours) in acute and chronic models, as well as in the sham group. The data represent means \pm S.D. Chronic model shows a significant peak of S100 levels at 6 hours (* $p < 0.0001$), as compared to the sham group, according to ANOVA.

Figure 1.

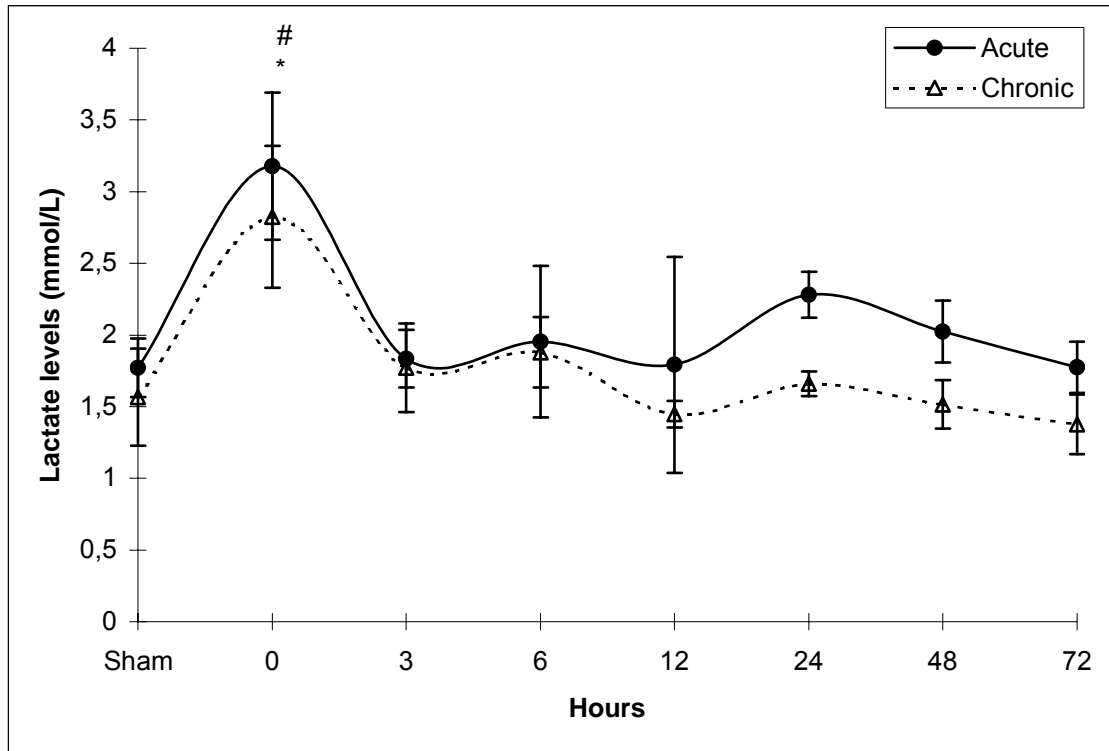
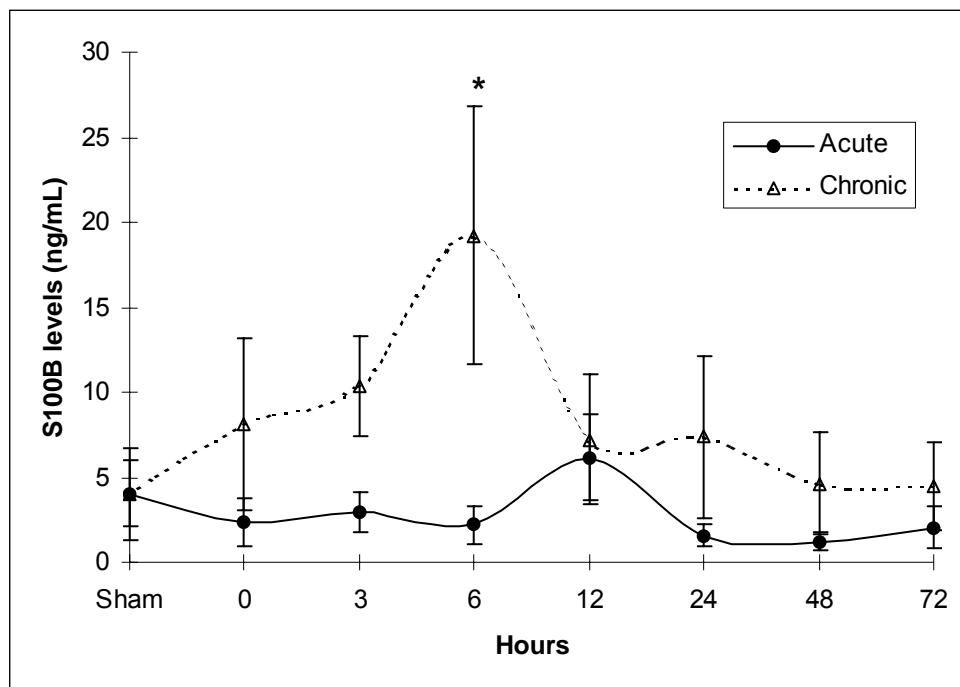


Figure 2.



2. Artigo “Peripheral Nucleotide Hydrolysis in Rats Submitted to a Model of Electroconvulsive-Therapy”

Artigo submetido para publicação no periódico Biological Psychiatry. A formatação do artigo obedece às normas da revista.

Peripheral Nucleotide Hydrolysis in Rats Submitted to a Model of Electroconvulsive-Therapy

João Vicente Busnello^{a,b,*}, Jean Pierre Oses^a, Rosane Souza da Silva^d, Gustavo Feier^c, João Quevedo^c, Luis Valmor Portela^a, Flávio Kapczinski^b, Diogo O. Souza^a, João José Freitas Sarkis^a.

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2600-Anexo 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Psiquiatria Experimental, Centro de Pesquisa, Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2350 90035-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

^d Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

João Vicente Busnello,
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre-RS-Brasil.
Tel.: +55 51 3316 5558; fax: +55 51 3316 5540.
Email address: joaovi@terra.com.br (J.V.Busnello)

Key words: electroconvulsive shock, electroconvulsive therapy, rats, adenosine, ecto-NTPDase, 5'-nucleotidase, ATP, ADP, AMP

Number of words in Abstract: 186

Number of words in Text: 2.209

Number of figures: 02

Number of tables: zero

Number of supplementary material: zero

Abstract

Electroconvulsive therapy (ECT) is an efficacious and safe method for the treatment of mood disorders. Its utilization is accompanied by a myriad of biochemical and cellular changes, which are far from fully understood. The present work investigates in rat serum the effects of seizures induced by electroconvulsive shocks (ECS), an animal model of ECT, on enzymes that hydrolyze ATP, ADP and AMP to adenosine. Two different models of ECS were used, consisting in the application of one or eight ECS sessions, and named acute or chronic respectively. Serum samples were collected at several time points after the single shock in the acute and after the eighth and last shock in the chronic model. A single shock produced a sudden and short-lived inhibition of enzymatic activity ($p < 0.05$ for ATP and $p < 0.01$ for ADP and AMP), whereas in the chronic model significant increases were noticed 48 hours ($p < 0.05$ for ATP, ADP and AMP) and 7 days ($p < 0.01$ for ATP, ADP and AMP) after the last ECS. These results support the idea that adenosine nucleotides may be involved in the biochemical mechanisms leading to cerebral changes associated with ECT.

Introduction

Electroconvulsive therapy (ECT) has been shown effective and safe for the treatment of Major Depression (MD) (The UK ECT Review Group 2003), but no definite answers exist regarding its mechanisms of action. Current theories still emphasize monoamine neurotransmission imbalances. Several other systems are likely to play an important role on the amelioration of symptoms (Wong et al 2001), and efforts to direct research away from the “monoaminergic hypothesis” are proving to be rewarding (Manev et al 2003). Electroconvulsive shock (ECS) is a widely used animal model of ECT which has contributed to explain its therapeutic and side effects profiles (Newman et al 1998; Barichello et al 2004).

Adenosine is an endogenous nucleoside known to be involved in physiological and pathological conditions of brain metabolism. It is significantly increased in ischemia, seizures and hypoxia induced by experimental manipulation, and these increases have shown relevant neuroprotective properties (Bonan et al 1998; Dunwiddie et al 2001). It possesses well established presynaptic inhibitory actions leading to the reduction in excitatory neurotransmitter release, including that of glutamate, dopamine, serotonin and acetylcholine (Ribeiro 1995; Brundage et al 1997). It may diffuse locally and exert effects on other areas, such as in the hippocampus, where it can modulate synaptic plasticity (de Mendonca et al 1997), a phenomena also observed under ECS treatment (Stewart et al 2000).

One of the principal sources of adenosine is its formation in the extracellular space from adenine nucleotides (Dunwiddie et al 1997). Once adenine nucleotides reach the extracellular space, they are subsequently converted to adenosine through the action of ecto-enzymes (Zimmermann 1996; Bonan et al 1998). We have demonstrated that ATP is hydrolyzed to adenosine in the synaptic cleft by the conjugated action of an ecto-NTPDase (ATP diphosphohydrolase, apyrase, ATPDase, EC 3.6.1.5) and a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Sarkis et al 1991; Battastini et al 1995). Ecto-NTPDases are a group of enzymes able to hydrolyze adenine triphosphonucleoside (ATP) and adenine diphosphonucleoside (ADP) to its equivalent monophosphonucleoside (AMP) and inorganic phosphate (Zimmerman 1996). Then, this AMP can produce adenosine by the action of an ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann 1996). The ecto-NTPDase is expressed in neurons and astrocytes (Wang et al 1997), presenting a wide distribution in cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, glial and endothelial cells (Wang et al 1998; Kukulski et al 2004).

ATP is stored in nerve terminals and co-released at the synaptic cleft with several neurotransmitters and also has a neurotransmitter role (Di Iorio et al 1998; Rathbone et al 1999). Extracellular ATP evokes responses through two general classes of extracellular receptors, the ionotropic P2X receptors and the metabotropic P2Y (Ralevic et al 1998; Burnstock 2004). After the release, the inactivation of ATP signaling occurs via step-by-step hydrolysis through the above mentioned ecto-nucleotidases pathway, resulting in the production of adenosine.

The effects of adenosine are mediated through four types of specific G-protein-coupled receptors: A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ (Fredholm et al. 2001).

It is well established that the breakdown of ATP is mediated by membrane-bound ectonucleotidases. Recent studies, however, indicate that soluble nucleotidases, probably released from sympathetic nerves, are also involved in ATP breakdown to adenosine (Yegutkin et al 2000, Todorov et al 1997). It has been suggested that changes observed in these plasmatic enzymes may be related to altered processes in the rat brain (Bruno et al 2003). In this work we propose to evaluate the activities of NTPDase and 5'-nucleotidase in rat serum after the acute and chronic administration of ECS, thus providing grounds to assess the involvement of parts of the purinergic system in the biochemical mechanisms underlying the therapeutic properties of ECT.

Materials and Methods

Animals and Ethical Considerations

Male Wistar rats 60-90 days (250-300 g) were used (around 60 animals). Animals were kept on 12/12 hour dark/light cycle (lights off at 7 pm), in a room at constant temperature (22 ± 1°C) with *ad libitum* food and water. Housing was in plastic cages with 5 rats per cage. Institutional protocols were observed in order to minimize suffering and limit the number of individuals sacrificed. The study was

performed as approved by the Ethics Committee of the Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Study Design

The study protocol had two models of electroconvulsive shock. The first model, named acute, consisted of the application of a single electroconvulsive shock and subsequent collection of serum samples at specific points of time, after which individuals were immediately sacrificed. In the second or chronic model, a series of 8 ECSs were applied to each rat. There was a 48 hour interval between each application and samples were collected at specific points of time after the eighth and last ECS application.

Serum samples were obtained at 0, 12, 24, 48, 72 hours and 7 days after the ECS in the acute model, and at 48 hours and 7 days after the ECS in the chronic model. Independent control groups were used for both the acute and chronic models.

Electroconvulsive shock (ECS)

Electroconvulsive shock was applied via bilateral clip electrodes. The stimulus parameters were 150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds. Each stimulation elicited tonic-clonic seizures. These parameters, along with the 48-hour interval between every ECS application in the chronic model, were chosen to maintain a resemblance to ECT treatment in clinical practice, preserving a similar number of shocks applied and intensity of the stimulus.

Sampling and isolation of blood serum

Blood was drawn after the decapitation of the rats. Samples were centrifuged in plastic tubes for 5 min at 5000g and 20 °C and the serum was stored at -70 °C until analysis.

Measurement of serum ATP and ADP hydrolysis

Serum ATP and ADP hydrolysis was determined using a method described by Oses et al. (Oses et al 2004). The reaction mixture containing ADP or ATP (3.0 mM) as a substrate, in 112.5 mM Tris–HCl, pH 8.0, was incubated 40 min with 1.0–1.5 mg serum protein per tube at 37 °C in a final volume of 0.2 ml. The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml 10% trichloroacetic acid (TCA). The absorbance was measured at 630 nm using a Spectrophotometer Genesis 20. Inorganic phosphate (Pi) released was determined as previously described by Chan et al. (Chan et al 1986). Controls to correct for non-enzymatic hydrolysis were performed by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. All samples were assayed in triplicate. Enzyme activities were expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

Measurement of serum AMP hydrolysis

The reaction mixture containing AMP (3.0 mM) as a substrate in 100 mM Tris–HCl, pH 7.5, was incubated 40 min with 1.0–1.5 mg serum protein per tube at 37.8 °C in a final volume of 0.2 ml. All other procedures were the same as for ATP and ADP hydrolysis, as described above.

Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method, according to Bradford (Bradford 1976), using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The data obtained are expressed as means \pm standard deviation of at least five animals. One way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze different groups in the same model. A *P* value of less than 0.05 was considered to represent a significant difference.

Results

In the acute model serum hydrolysis of ATP, ADP and AMP were significantly decreased immediately after the single ECS reaching their respective lowest levels at 0.77 ± 0.40 , 0.39 ± 0.14 and 0.57 ± 0.20 nmol Pi/min/mg ($p < 0.05$, 0.01 and 0.01 respectively). This decrease was transitory with all time groups returning to control levels (control levels were 2.01 ± 0.86 , 1.89 ± 0.65 and 2.97 ± 1.08 for ATP, ADP and AMP, respectively) by the following measure taken 12 hours after the ECS (Fig. 1).

In the chronic model serum ATP, ADP and AMP hydrolysis showed control levels of 1.43 ± 0.24 , 1.63 ± 0.40 and 2.00 ± 0.53 , respectively, and were found to be significantly increased 48 hours after the last ECS reaching 2.96 ± 1.25 , 3.16 ± 1.23 ,

2.89±1.21 nmol Pi/min/mg, ($p < 0.05$ for all three nucleotides). This increase was further incremented by the 7th day reaching 4.31±0.53, 3.16±1.23 and 2.89±1.21 nmol Pi/min/mg respectively ($p < 0.01$ for ATP and ADP and $p < 0.05$ for AMP) (Fig. 2).

Discussion

Seizure-induced biochemical alterations in the brain are prominent (DeGiorgio et al 1996), and, although not as striking and as widely documented, so are morphological alterations (Lado et al 2002). The later is pronounced at the microscopic level, where evidence of neurite outgrowth, collateral sprouting of nerve processes and an overall increase in plasticity have been reported (Duman et al 1998; Kempermann et al 2003). This trophic phenomenon requires the stimulation of the target tissues for periods longer than the milliseconds involved in neurotransmission and is a process likely to underlie the resolution of pathological mood states. Effective pharmacological antidepressant treatments are notorious for taking long periods of time to demonstrate clinical improvement (Katz et al 1996), and this lag has been related to the time required to set in motion plastic changes (Santarelli et al 2003). Under this rationale it becomes important to search systems that demonstrate sustained alterations after the therapies are initiated.

In the present study we reported for the first time peripheral changes in adenine nucleotides hydrolysis induced by ECS, a validated animal model of an effective

anti-depressive treatment (McKinney 1986). Our results with acute model showed an abrupt inhibition of hydrolysis immediately after a single ECS with recuperation to basal levels shortly after. Stimulation through repeated shocks in the chronic model lead to a sustained increase in the hydrolysis of all nucleotides, which remained increased at the last time point assayed one week after the last ECS. This data suggests first; that repeated stimulation is necessary to achieve an increased hydrolysis, and second; that this repeated stimulation is able to uphold increased levels for a significant period of time. Our data precludes us from establishing when, exactly, nucleotide hydrolysis returns to control levels in the chronic model, and if the inhibition of hydrolysis that occurs right after the stimulation in the acute model is a phenomenon also observed in the chronic one.

Our group has previously shown that repeated seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) stimulate this nucleotidase pathway activity in serum, with elevations sustained 48 hours after the last application of PTZ (Bruno et al 2003), whereas a single convulsive injection could not maintain the stimulation for longer than 24 hours (Bruno et al 2002). The similar findings in the present work using another type of convulsive technique support the idea that the stimulation of NTPDase and 5'-nucleotidase is secondary to the seizures per se and not to the convulsive method used. Looking at these facts under the notion that seizures, and not the electric current, are considered the anti-depressive element of ECT (Fink 1991), one is enticed to conceive adenosine and its nucleotides as one of the mediators of the antidepressant properties of repeated seizures.

The temptation to view the changes in plasmatic enzymes as related to altered processes in the rat brain has to be carefully looked at, as changes in body temperature, hemodynamics and the sheer muscular stress of the seizure can result in altered enzymatic activity. On the other hand, the preservation of increased activity for a period far beyond the time frame where these acute changes take place is somewhat more likely to attribute their origin to chronic brain alterations. Moreover, these peripheral changes may find equivalent counterparts in the central nervous system (CNS). Pronounced increases in adenosine brain levels in rats after ECS have been established for a long time (Lewin et al 1981) as well as adenosine anticonvulsant properties (Dragunow 1988; Zhang et al 1993). The former can be correlated to the increase in convulsive threshold induced by repeated applications of ECT. Overall the increased hydrolysis of all three adenosine nucleotides found in our study could ultimately lead to an increase in adenosine levels in serum. One could speculate that the same may occur in the CNS.

Recently, Calkner and Biber proposed a role for glial adenosine receptors in the pathophysiology of mood disorders. Their stimulation would be responsible for the release of neurotrophic factors such as NGF, S100B and cytokines, substances known to activate plastic processes (van Calkner et al 2005). Using the same model of the present study, our group demonstrated that repeated ECS applications are capable of triggering astrocytic responses while preserving neuronal integrity

(Busnello et al 2006), adding evidences that support an active participation of glial cells in the trophic changes associated with antidepressant treatment. Moreover, the present study demonstrated that the repeated stimulation was able to maintain increased levels of nucleotide hydrolysis for a period of at least seven days, a kind of stimulation that suits the continuous activation required to unleash trophic activity.

In conclusion, our results show that repeated stimulation by ECS can boost the activity of soluble forms of NTPDase and 5'-nucleotidase and sustain this increase for a period that extends up to one week after the cessation of the stimulus. The characteristics of this activation are compatible with the long lasting processes required to mobilize plastic changes. If adenine nucleotides and adenosine are playing a leading or supporting role in the biochemical processes unleashed by ECS, is something that should be the focus of further studies.

Acknowledgements

This work was supported with grants from CNPq, CAPES, FAPESC, UNESC and Instituto Cérebro e Mente.

References

- Barichello T, Bonatto F, Agostinho FR, Reinke A, Moreira JC, Dal-Pizzol F, et al (2004): Structure-related oxidative damage in rat brain after acute and chronic electroshock. *Neurochem Res* 29(9): 1749-53.
- Battastini AM, Oliveira EM, Moreira CM, Bonan CD, Sarkis JJ, Dias RD (1995): Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem Mol Biol Int* 37(2):209-19.
- Bonan CD, Dias MM , Battastini AM, Dias RD, Sarkis JJ (1998): Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidases activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochem Res* 23(7): 977-82.
- 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: 248-54.
- Brundege JM, Dunwiddie TV (1997): Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 39: 353-91.
- Bruno AN, Oses JP, Amaral O, Coitinho A, Bonan CD, Battastini AM, et al (2003): Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. *Brain Res Mol Brain Res* 114(2): 140-5.

- Bruno AN, Oses JP, Bonan CD, Walz R, Battastini AM, Sarkis JJ (2002): Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentyletetrazol. *Neurosci Res* 43(3): 283-8.
- Burnstock G (2004): Introduction P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 4(8): 793-803.
- Busnello JV, Leke R, Oses JP, Feier G, Bruch R, Quevedo J, et al (2006): Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: Effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity. *Life Sci* 2006 Jan 11; [Epub ahead of print]
- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986): A direct colorimetric assay for Ca²⁺ - stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157(2): 375-80.
- de Mendonca A, Ribeiro JA (1997): Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci* 60(4-5): 245-51.
- DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD (1996): Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia* 37(7): 606-9.
- Di Iorio P, Ballerini P, Caciagli F, Ciccarelli R (1998): Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacol Res* 37(3): 169-78.
- Dragunow M (1988): Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog Neurobiol* 31(2): 85-108.
- Duman RS, Vaidya VA (1998): Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Ect* 14(3): 181-93.

- Dunwiddie TV, Diao L , Proctor WR (1997): Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17(20): 7673-82.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001): The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31-55.
- Fink M (1991): What is an adequate treatment in convulsive therapy? *Acta Psychiatr Scand* 84(5): 424-7.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001): International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53(4): 527-52.
- Katz MM, Koslow SH, Frazer A (1996): Onset of antidepressant activity: reexamining the structure of depression and multiple actions of drugs. *Depress Anxiety* 4(6): 257-67.
- Kempermann G, Kronenberg G (2003): Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54(5): 499-503.
- Kukulski F, Sevigny J, Komoszynski M (2004): Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Res* 1030(1):49-56.
- Lado FA, Laureta EC, Moshe SL (2002): Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord* 4(2): 83-97.

- Lewin E, Bleck V (1981): Electroshock seizures in mice: effect on brain adenosine and its metabolites. *Epilepsia* 22(5): 577-81.
- Manev H, Uz T, Manev R (2003): Glia as a putative target for antidepressant treatments. *J Affect Disord* 75(1): 59-64.
- McKinney WT (1986): Electroconvulsive therapy and animal models of depression. *Ann N Y Acad Sci* 462: 65-9.
- Newman ME, Gur E, Shapira B, Lerer B (1998): Neurochemical mechanisms of action of ECS: evidence from in vivo studies. *J Ect* 14(3): 153-71
- Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstenau CR, et al (2004): Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 74(26): 3275-84.
- Ralevic V, Burnstock G (1998): Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3): 413-92.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, et al (1999): Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59(6): 663-90.
- Ribeiro JA (1995): Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol* 77(5): 299-305.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al (2003): Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634): 805-9.

- Sarkis JJ, Salto C (1991): Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res Bull* 26(6): 871-6.
- Stewart CA, Reid IC (2000): Repeated ECS and fluoxetine administration have equivalent effects on hippocampal synaptic plasticity. *Psychopharmacology (Berl)* 148(3): 217-23.
- The UK ECT Review Group (2003) Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361(9360): 799-808.
- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA et al (1997): Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387(6628):76-9.
- van Calker D, Biber K (2005): The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. *Neurochem Res* 30(10): 1205-17.
- Wang TF, Ou Y, Guidotti G (1998): The transmembrane domains of ectoaprase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* 273(38): 24814-21.
- Wang TF, Rosenberg PA, Guidotti G (1997): Characterization of brain ectoaprase: evidence for only one ecto-aprase (CD39) gene. *Brain Res Mol Brain Res* 47(1-2): 295-302.
- Wong ML, JLicinio (2001): Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2(5): 343-51.

Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G (2000): Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 129(5):921-6.

Zhang G, Franklin PH, Murray TF (1993): Manipulation of endogenous adenosine in the rat prepiriform cortex modulates seizure susceptibility. *J Pharmacol Exp Ther* 264(3): 1415-24.

Zimmermann H (1996): Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol* 49(6): 589-618.

Legends to figures:

Figure 1. Effects of one ECS (acute model) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat blood serum. Bars represent means \pm S.D. of a group of at least five animals. Time groups represent the interval between the ECS and animal sacrifice and subsequent blood sampling. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ according to one-way ANOVA.

Figure 2. Effects of eighth consecutive ECS's (one at every 48 hours - chronic model) on ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat blood serum. Bars represent means \pm S.D. of a group of at least five animals. Time groups represent the interval between the eighth ECS and animal sacrifice and subsequent blood sampling. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ according to one-way ANOVA.

Figure 1.

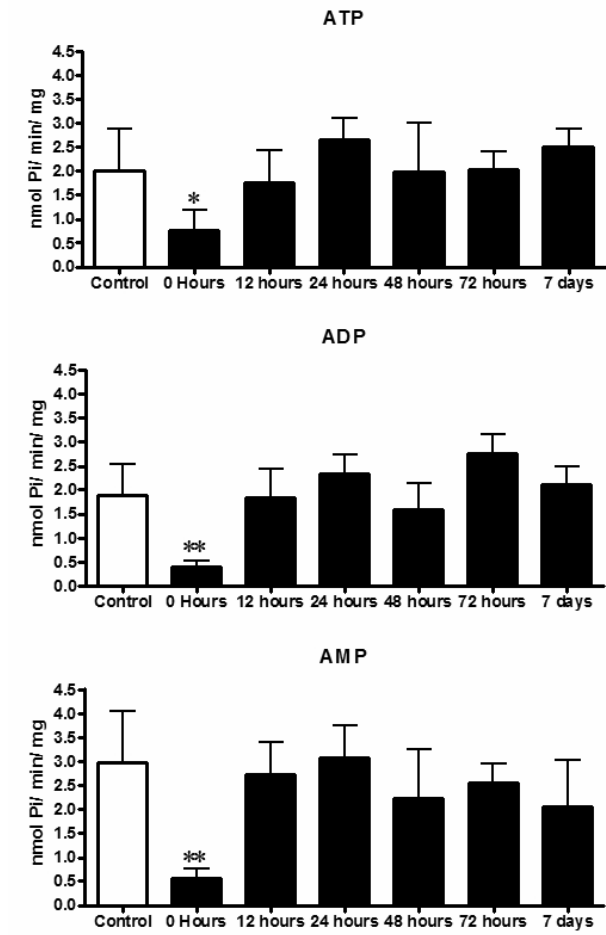
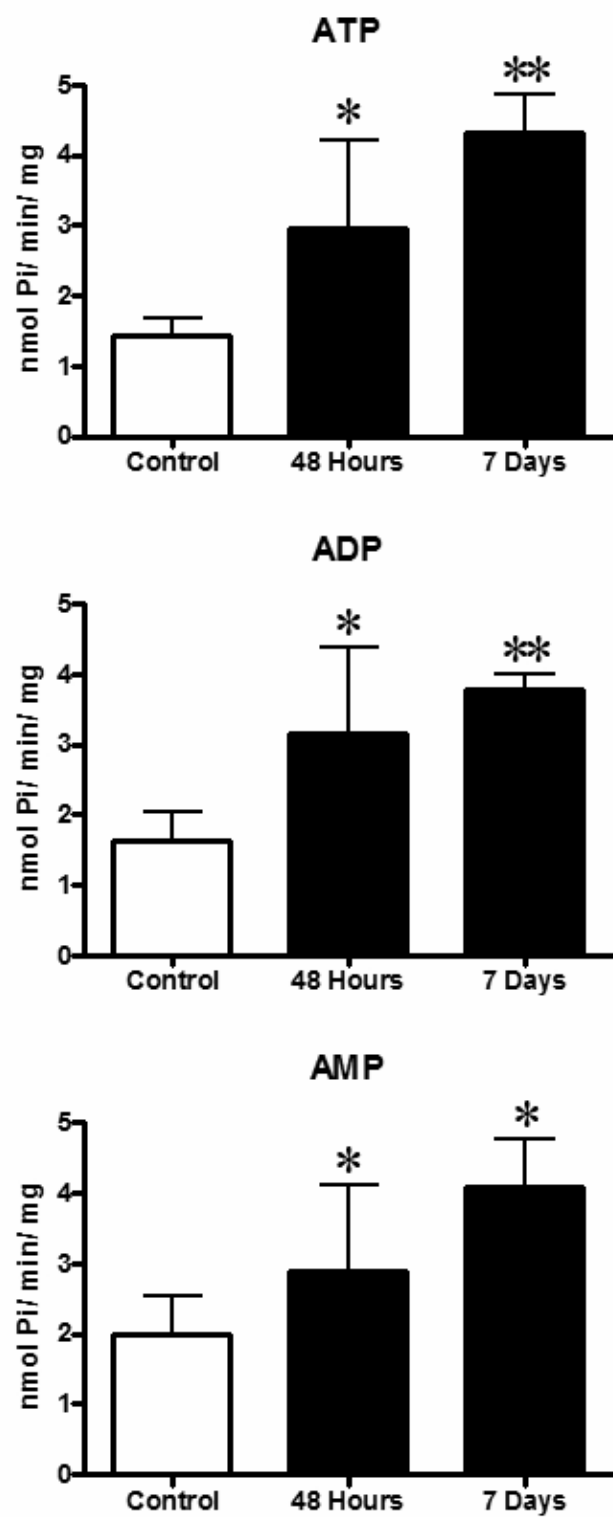


Figure 2.



PARTE III

1. DISCUSSÃO

Quando primeiro li as palavras do historiador Plutarco, citadas no início dessa tese e escritas no primeiro século da era Cristã foi chocante a propriedade com que elas poderiam ter sido aplicadas para observar a psiquiatria contemporânea. A mim, particularmente, cujos mentores e o destino situaram numa realidade aonde minha vida profissional e estudos acadêmicos orbitavam entre os aspectos bioquímicos, a neurociência básica, e a lida diária com pacientes com transtornos mentais da mais variada intensidade, fazia-se explícito o desejo que essas duas áreas estivessem mais próximas do que a atual realidade as apresenta. Com uma quantidade de dados grandiosa, mas ainda com limitadas aplicações na prática médica, a neurociência básica foi interpretada de maneira livre por diversos profissionais da área de saúde mental que ofereceram explicações demasiado simplistas para um problema muito complexo e pouco conhecido. A realidade do cotidiano clínico mostra como pacientes tem noções erradas das bases sobre as quais são instituídos os tratamentos biológicos dos transtornos mentais. Nossa realidade atual é a mesma do historiador quando fala de um período aonde se encontram a história escrita e a pré-história. Ao contrário desse exemplo, porém, apesar dos elos entre a ciência básica e a psicologia clínica permanecerem obscuros, a pesquisa e o tempo o tornam lentamente mais claro e preciso.

A ECT apresenta-se como uma rica oportunidade para começar a construir um entendimento mais sólido entre a neurociência e a psiquiatria clínica. Nenhum outro método antidepressivo apresenta um início de ação tão rápido e uma melhora tão dramática

quanto ela. Portanto, as sutis alterações cerebrais que representam a mudança de humor têm uma chance consideravelmente superior de serem vistas se a procurarmos numa situação como esta, aonde as manifestações clínicas são tão evidentes. Para isso utilizamos o modelo de CEC em ratos para observar sua influência sobre importantes marcadores de atividade e dano cerebrais que poderiam apontar sistemas aonde há influência da ECT.

Nosso primeiro trabalho avaliou os efeitos do CEC sobre marcadores neuronais e astrocitários. O que nos permitiu observar se o método era capaz de induzir alterações compatíveis com dano, ou se as alterações vistas poderiam representar processo celulares benéficos. Mudanças bioquímicas no líquido já foram descritas como um reflexo do que ocorre no espaço intercelular do cérebro (Zachrisson et al, 2000). Assim desenhamos um primeiro estudo utilizando em conjunto os marcadores S100B, NSE e lactato num modelo animal de ECT. Dois estudos clínicos apontando o uso desses marcadores já haviam sido realizados em pacientes submetidos a tratamento com ECT. O primeiro deles usou NSE e S100B em um trabalho que ainda não admitia que alterações de S100B poderiam refletir efeitos benéficos associados ao tratamento. Não foram relatadas alterações nos marcadores estudados, o que levou os autores à conclusão de que a ECT não é capaz de causar dano cerebral (Zachrisson et al, 2000). Por questões éticas o estudo teve acesso a um limitado número de amostras de sangue, o que pode ter impedido que alterações importantes entre os intervalos de coleta fossem vistas. O nosso trabalho encontrou um significativo aumento de S100B seis horas após o último de oito CECs, com níveis já semelhantes ao controle 12 horas após o último choque. Nossos dados sugerem que estudos clínicos devem considerar um intervalo mais freqüente de amostragem, a fim de que possam identificar mudanças temporárias, mas significativas nos marcadores. Um segundo estudo avaliou amostras de

S100 e NSE em pacientes com quadros depressivos graves ou psicóticos, realizando também testes cognitivos. Seu regime de amostragem foi mais intenso do que o previamente citado, porém só ocorreram amostragens de sangue periférico. Não foram evidenciadas alterações nos marcadores e também não houve uma correlação de seus níveis com a performance cognitiva dos pacientes (Agelink et al, 2001). Um terceiro estudo que avaliou somente os níveis de NSE não detectou elevações (Berrouscho et al, 1997).

Um estudo em animais utilizando o mesmo método de CEC descrito nessa tese, além de um modelo de indução de convulsões com o uso de lidocaína, mediu os níveis de NSE nas seguintes áreas cerebrais; amígdala, hipocampo e córtex piriforme. Ambos métodos de indução de convulsões falharam em induzir alterações de NSE (Kragh et al, 1997). Outro trabalho identificou alterações somente no córtex piriforme, porém de pequena magnitude, concluindo que ela estaria mais provavelmente relacionada com um aumento de transcrição gênica, ou um possível papel trófico da NSE na remodelação sináptica (Rasmussen et al, 1994). Os nossos achados alinham-se com os desses estudos, demonstrando que o CEC não ocasiona danos neuronais, apoiando dados que indicam que a ECT é incapaz de lesar neurônios.

Como já discutido, concentrações moderadas de S100B tem sido associadas com processos tróficos, como crescimento de processos neuronais (Haglid et al, 1997), e atividades neuroprotetoras e neurotróficas (Brewton et al, 2001), enquanto níveis altamente elevados estimulam a ação de citocinas pró-inflamatórias (Koppal et al, 2001) ou refletem diretamente dano cerebral (Leviton & Damman, 2002; Van Eldik & Wainwright, 2003). Outro tipos de tratamento antidepressivo também se mostraram capazes de elevar os níveis

de S100B em modelos experimentais (Manev et al, 2001). Um envolvimento da glia nos mecanismos de ação da ECT já foi sugerido. Ativação astrocitária, então chamada gliose astrocítica reativa, foi descrita após a ECT já na década de 1940 (Riese, 1948). Estudos em cérebros de cadáveres têm indicado de forma consistente que estados depressivos estão relacionados com um aumento do número de células gliais, mas não do número de neurônios, sendo que o ECT é capaz de induzir mudanças que restabeleçam o equilíbrio entre esses dois tipos de células (Ongur & Heckers, 2004). Além disso, concentrações elevadas de GFAP, um marcador especificamente astrocitário, são um fenômeno intimamente relacionado a uma intensa atividade neuronal (Torre et al, 1993). Assim, as elevações de S100B vistas no nosso trabalho podem representar uma valiosa ativação glial.

Os modelos de CEC crônico e agudo também demonstraram serem capazes de induzir elevações do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da expressão de seu gene receptor, trk B, no cérebro de ratos (Lindfors et al, 1995). Os níveis de RNA mensageiro do BDNF mostraram-se elevados no giro denteado e córtex piriforme de ratos após os modelos crônico e agudo, conforme hibridização *in situ* (Zetterstrom et al, 1998). Esses resultados, quando observados conjuntamente com nossos achados, podem sugerir que a estimulação eletroconvulsiva mobiliza não apenas atividade trófica glial, mas também neuronal. Sua maior eficácia frente aos demais tratamentos antidepressivos pode ser resultado dessa capacidade de mobilizar diferentes mecanismos cerebrais.

As alterações nos níveis de lactato provocadas pelo CEC foram rápidas e transitórias, provavelmente refletindo o aumento de consumo energético que ocorre durante uma convulsão tônico-clônica generalizada (Ingvar & Siesjo, 1983). Outros mecanismos podem

levar a esse aumento, como também o podem as condições de hipoxia que acompanham a crise. Desse modo ele deve ser observado como um marcador menos específico do que a S100B.

Em nosso segundo trabalho avaliamos os efeitos dos dois modelos de CEC sobre a atividade de ectonucleotidases, mais especificamente a NTPDase e a 5'-nucleotidase. Apesar de não serem tão fartamente documentadas quanto as alterações bioquímicas, as alterações morfológicas induzidas pelo CEC já estão amplamente descritas (Lado et al, 2002). Seu pronunciamento é maior ao nível microscópico, manifestando-se como crescimento de dendritos e axônios e um aumento global da plasticidade (Duman et al, 1998; Kempermann et al, 2003). Efeitos tróficos dessa natureza requerem a estimulação dos tecidos alvo por períodos de tempo superiores aos milisegundos envolvidos na neurotransmissão, e uma estimulação continuada e um provável fenômeno subjacente à resolução dos estados de humor patológicos. Os tratamentos antidepressivos farmacológicos são conhecidos pelo longo período de tempo necessário para obterem uma resposta terapêutica e ainda maior para ocasionarem a remissão do quadro de humor (Katz et al, 1996). Esse intervalo já foi relacionado com o período de tempo necessário para colocar em andamento alterações plásticas (Santarelli et al, 2003). Sob esse aspecto, é importante identificar sistemas que apresentem alterações sustentadas após o início do tratamento.

Nosso trabalho é o primeiro a relatar as alterações periféricas na hidrólise de nucleotídeos ocasionada pelo CEC. Os resultados do modelo agudo demonstraram aqui uma importante inibição da hidrólise imediatamente após o choque. No segundo momento de coleta, 12 horas após o choque, as medidas retornaram aos níveis basais. O modelo crônico mostrou

alterações prolongadas após o término das oito sessões de CEC, sendo que ao final de sete dias os níveis permaneciam significativamente aumentados, e, por limitações do protocolo, não podemos descartar a hipótese de que eles permaneçam em elevação após esse período. Esses achados sugerem que choques repetidos são necessários para que ocorra um aumento da hidrólise e que essa estimulação repetida é capaz de manter níveis elevados por longo período de tempo. Os dados atuais impedem-nos de determinar quanto tempo é necessário para que a hidrólise retorne a níveis comparáveis ao controle, mas são suficientes para que consideremos que um processo independente é desencadeado após repetidas estimulações, e que este consegue manter-se por longo período após o término dos estímulos elétricos. Ou seja, um fenômeno compatível com a estimulação continuada que se postula ser necessária para o desencadeamento de processos tróficos.

Trabalhos de nossos laboratórios utilizando o agente farmacológico PTZ como método de indução de convulsões demonstraram que uma única crise convulsiva era capaz de manter um aumento da atividade das nucleotidases séricas por até vinte e quatro horas (Bruno et al, 2002), enquanto o mesmo método induzindo repetidas convulsões foi capaz de provocar alterações que permaneciam evidentes mesmo quarenta e oito horas após o fim dos estímulos (Bruno et al, 2003). Esses achados semelhantes aos encontrados quando a estimulação por CECs foi utilizada nessa tese, apóia a idéia de que o aumento da estimulação da NTPDase e da 5'-nucleotidase são ocasionados pela convulsão em si, e não pela corrente elétrica ou propriedades inerentes ao PTZ. Considerando-se que a convulsão é um elemento indispensável para que a ECT exerça seus efeitos antidepressivos (Fink, 1991), e que a hidrólise de nucleotídeos da adenosina encontra-se elevada, independente do método de indução da convulsão, nossos dados colocam esse aumento da atividade

nucleotidásica, juntamente com o aumento na concentração de adenosina que ela ocasiona, como possíveis mediadores das propriedades antidepressivas das convulsões repetidas.

As especulações autorizadas por esses resultados devem ser olhadas com cuidado. Mudanças na temperatura corporal, hemodinâmica e o próprio estresse muscular ocasionado pela ECT podem alterar as atividades enzimáticas. De outro lado, o fato da atividade permanecer aumentada mesmo dias após o fim da estimulação, nos leva a crer que os fenômenos agudos relacionados ao choque e a crise convulsiva em si já foram superados. Assim as alterações persistentes podem ser vistas como candidatos responsáveis pelos processos tróficos desencadeados pelo tratamento.

Os nossos achados podem ser correlacionados com características tipicamente encontradas na prática clínica. A adenosina possui importante ação anticonvulsiva (Dragunow 1988; Zhang et al 1993). A ECT induz um aumento no limiar convulsivante, que requer muitas vezes o aumento da dose de energia aplicada no procedimento para que se alcance a convulsão necessária para o efeito terapêutico. Níveis elevados de adenosina no líquido foram observados há muito tempo (Lewin et al, 1981). As alterações periféricas da hidrólise dos três nucleotídeos por nós relatadas irão levar, em última análise, a um aumento da adenosina sérica. Apesar desses resultados não nos permitirem afirmar, é interessante sugerir que tais alterações periféricas possam também estar ocorrendo no SNC. Um artigo recente propôs um papel para receptores gliais de adenosina na patofisiologia dos transtornos de humor. Sua estimulação seria responsável pela liberação de fatores neurotróficos como NGF, citocinas e a própria S100B, sendo que elas ativariam processos tróficos (van Calker et al, 2005). Os dados de nosso primeiro trabalho apóiam esta asserção que coloca a S100B como um dos estimulantes neurotróficos. Nosso segundo trabalho,

demonstra que os CECs repetidos são capazes de manter níveis sustentados de ativação enzimática, estes seriam necessários para desencadear mudanças plásticas das células do SNC .

2. Conclusão

O CEC é capaz de disparar respostas astrocitárias como observado pelos níveis de S100B e lactato. As alterações de S100B foram observadas apenas no modelo agudo enquanto os níveis de NSE permaneceram inalterados durante todo o estudo. Esses dados sugerem que as alterações astrocitárias demonstradas são provavelmente neuroprotetoras.

Em nosso Segundo trabalho foi demonstrado que o CEC pode estimular a atividade das formas solúveis de NTPDase e 5'-nucleotidase, sustentando esses incrementos por um período que pode ir até sete dias após cessadas as sessões de choque. As características dessa ativação são compatíveis com os processos de longa duração necessários para mobilizar alterações plásticas. Se os nucleotídeos da adenosina desempenham um papel principal ou secundário nos processos bioquímicos desencadeados pela ECT, é algo que deve ser esclarecido por estudos futuros.

3. Perspectivas

Existem diversas alterações já descritas ocasionadas por CECs em sistemas cerebrais, e certamente muitas outras ainda serão relatadas. Os resultados dos estudos desta tese contribuem com dados preliminares, em um modelo experimental bem estabelecido de CEC. Apesar de hoje existir uma noção de que os processos neurotróficos são manifestações saudáveis da fisiologia cerebral, futuramente evoluiremos para uma visão

mais detalhada desse processo. Dentro da própria pesquisa sobre quadros convulsivos, já existem autores descrevendo alterações neurotróficas benéficas e outras que podem perpetuar quadros patológicos, como quando alterações plásticas determinam a perpetuação de um quadro epilético (fenômeno “kindling”) ou quando a neurogênese ocasionada por convulsões poderia dar origem a células disfuncionais (Meldrum, 2001).

Nossos trabalhos também deixam abertas algumas perguntas que poderiam ser respondidas por estudos subseqüentes. A mais evidente seria a complementação de nosso segundo estudo. Primeiramente a inibição da atividade enzimática observada logo após o término da crise convulsiva no modelo agudo poderia ser avaliada com mais detalhes. Nossas medidas foram feitas no momento imediato após o sacrifício dos ratos num grupo, tendo o grupo seguinte contribuído com amostras transcorridas doze horas do estímulo. Alterações importantes poderiam ter ocorrido entre esses dois pontos. De forma semelhante, ainda fica por ser esclarecido o tempo necessário para que a ativação enzimática ocasionada pelo modelo crônico retorne a níveis basais. Essa ativação surpreende pela sua prolongada duração, e pode ser um mecanismo bioquímico cujas alterações são suficientemente prolongadas a ponto de ainda estarem presentes quando começamos a notar melhoras no quadro de humor de indivíduos recuperando-se de episódios depressivos.

Outro passo natural seria a medição dos níveis de atividade enzimática em amostras mais intimamente ligadas ao funcionamento cerebral. O líquido seria um material no qual poder-se-ia fazer um próximo ensaio. Alterações semelhantes aí encontradas refletiriam com mais precisão eventos do SNC. Além disso, poder-se-ia aferir diretamente os níveis de adenosina, e relacioná-lo com os dois modelos de CEC.

As alterações nos níveis de S100B aqui encontradas dificilmente poderiam refletir dano cerebral. Os efeitos de nosso tratamento sobre os neurônios foram praticamente nulos, e as alterações agudas nos níveis de lactato, devem estar refletindo somente o apetite neuronal estimulado pela caótica e intensa descarga neuronal da crise convulsiva. A elevação dos níveis de S100B de ordem nanomolar, falam a favor de efeitos tróficos. Aqui poderíamos realizar estudos medindo os níveis de S100B em áreas específicas da anatomia cerebral. Seria interessante medir seus níveis, antes e após o CEC, em áreas aonde foi relatada importante neurogênese.

REFERÊNCIAS

- Abbracchio, M.P. & Burnstock, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 78(2): 113-45, 1999.
- Abraha, H.D.; Butterworth, R.J.; Bath, P.M.; Wassif, W.S.; Garthwaite, J.; Sherwood, R.A. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem* 34 (Pt 4):366-70, 1997.
- Abrams, R. And there's no proof of lasting brain damage. *Nature* 403(6772):826, 2000.
- Agelink, M.W.; Andrich, J.; Postert, T.; Wurzinger, U.; Zeit, T.; Klotz, P.; Przuntek, H. Relation between electroconvulsive therapy, cognitive side effects, neuron specific enolase, and protein S-100. *J Neurol Neurosurg and Psych* 71(3),394-396, 2001.
- Altar, C.A.; Laeng, P.; Jurata, L.W.; Brockman, J.A.; Lemire, A.; Bullard, J.; Bukhman, Y.V.; Young, T.A.; Charles, V.; Palfreyman, M.G. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J Neurosci* 17;24(11):2667-77, 2004.
- Andreasen, N. *The Broken brain.* Harper & Row, Publishers Inc. 1985.
- Angelatou, F.; Pagonopoulou, O.; Kostopoulos, G. Alterations of A1 adenosine receptors in different mouse brain areas after pentylentetrazol-induced seizures, but not in the epileptic mutant mouse 'tottering'. *Brain Res* 534(1-2):251-6, 1990.

- Aurell, A.; Rosengren, L.E.; Karlsson, B.; Olsson, J.E.; Zbornikova, V.; Haglid, K.G. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke* 22 (10): 1254-8, 1991.
- Babigian, H.M.; Guttmacher, L.B.; Epidemiologic considerations in electroconvulsive therapy. *Arch Gen Psychiatry* 41:246-53, 1984.
- Barichello, T.; Bonatto, F.; Feier, G.; Martins, M.R.; Moreira, J.C.; Dal-Pizzol, F.; Izquierdo, I.; Quevedo, J. No evidence for oxidative damage in the hippocampus after acute and chronic electroshock in rats. *Brain Res* 16;1014(1-2):177-83, 2004.
- Battastini, A.M.; da Rocha J.B.; Barcellos C.K.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 16 (12): 1303-10, 1991.
- Battastini, A.M.; Oliveira, E.M.; Moreira, C.M.; Bonan, C.D.; Sarkis, J.J.; Dias, R.D. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem Mol Biol Int* ;37(2):209-19, 1995.
- Berman R.F.; Fredholm B.B.; Aden U.; O'Connor W.T. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res* 872 (1-2): 44-53, 2000.
- Berrouschot, J.; Rolle, K.; Kuhn, H.J.; Schneider, D. Serum neuron-specific enolase levels do not increase after electroconvulsive therapy. *J Neuro Sci* 150(2),173-176, 1997.

- Bonan C.D.; Schetinger, M.R.C.; Battastini, A.M.O.; Sarkis, J.J.F.. Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Dev Res* 52: 57-65, 2001.
- Bonan, C.D.; Amaral, O.B.; Rockenbach, I.C.; Walz, R.; Battastini, A.M.; Izquierdo, I.; Sarkis, J.J. Altered ATP hydrolysis induced by pentylenetetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res*; 25 (6): 775-9, 2000a.
- Bonan, C.D.; Walz, R.; Pereira, G.S.; Worm, P.V.; Battastini, A.M.; Cavalheiro, E.A.; Izquierdo, I.; Sarkis, J.J. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 39 (3): 229-38, 2000b.
- Brewton, L.S.; Haddad, L.; Azmitia, E.C. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100beta. *Brain Res* 912(1),9-16, 2001.
- Bruno, A.N.; Oses, J.P.; Amaral, O.; Coitinho, A.; Bonan, C.D.; Battastatini, A.M.; Sarkis, J.J. Changes in nucleotide hydrolysis in rat blood serum induced by pentylenetetrazol-kindling. *Brain Res Mol Brain Res* 114 (2): 140-5, 2003.
- Bruno, A.N.; Oses, J.P.; Bonan, C.D.; Walz, R.; Battastatini, A.M.; Sarkis, J.J. Increase of nucleotidase activities in rat blood serum after a single convulsive injection of pentylenetetrazol. *Neurosci Res* 43 (3): 283-8, 2002.
- Burnstock, G. & Willians, M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 295 (3): 862-9, 2000.
- Burnstock, G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol* 11 (3-4): 205-22, 1978.
- Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24 (3): 509-81, 1972.

- Busnello E. Eletroconvulsoterapia. In: Taborda, J.G.; Prado-Lima, P.; Busnello, E. Rotinas em Psiquiatria. Artes Médicas, Porto Alegre 1995
- Buttner, T.; Lack, B.; Jager, M.; Wunsche, W.; Kuhn, W.; Muller, T.; Przuntek, H.; Postert, T. Serum levels of neuron-specific enolase and s-100 protein after single tonic-clonic seizures. *J Neurol* 246(6):459-61, 1999.
- Cereser, K.M.; Frey, B.N.; Bernardes, F.B.; Costa, S.C.; Andreazza, A.C.; Feier, G.; Souza, D.; Tramontina, F.; Gonçalves, C.A.; Kapczinski, F.; Quevedo, J. Glial fibrillary acidic protein expression after electroconvulsive shocks in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 2006. [Epub ahead of print]
- Cunha, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38 (2): 107-25, 2001.
- Devanand, D.P.; Dwork, A.J.; Hutchinson, E.R.; Bolwig, T.G.; Sackeim, H.A. Does ECT alter brain structure? *Am J Psychiatry* 151(7), 957-970, 1994.
- Donato, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450 (3): 191-231, 1999.
- Donato, R. Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium* 12 (10): 713-26, 1991.
- Donato, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33 (7): 637-68, 2001.
- Dragunow, M. Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog Neurobiol* 31 (2): 85-108, 1988.

- Dubovski, L. Electroconvulsive therapy. In: Kaplan, H.I.; Sadock, B.J. Comprehensive Textbook of Psychiatry – 6th edition. Williams & Wilkins, Baltimore 1995.
- Duman, R.S.; Vaidya, V.A. Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Ect* 14(3):181-93, 1998.
- Dunwiddie, T.V. & Masino, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31-55, 2001.
- Dunwiddie, T.V.; Diao, L.; Kim H.O.; Jiang, J.L.; Jacobson, K.A. Activation of hippocampal adenosine A₃ receptors produces a desensitization of A₁ receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci* 17 (2): 607-14, 1997.
- Dwork, A.J.; Arango, V.; Underwood, M.; Ilievski, B.; Rosoklija, G.; Sackeim, H.A.; Lisanby, S.H. Absence of histological lesions in primate models of ECT and magnetic seizure therapy. *Am J Psychiatry* 161:576–578, 2004.
- El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Menard, J.F.; Parmentier, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J.M. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A_{2A} receptors. *Br J Pharmacol* 129 (7): 1465-73, 2000.
- Fink M. What is an adequate treatment in convulsive therapy? *Acta Psychiatr Scand* 84(5):424-7, 1991.

- Fink, M. Psychobiology of electroshock In: *Biology of Depression*, ed. Julio Licinio, Wiley-VCH, 2005.
- Flint, A.J. & Rifat, S.L. The treatment of psychotic depression in later life: a comparison of pharmacotherapy and ECT. *Int J Geriatr Psychiatry* 13(1):23-8, 1998.
- Folkerts, H.W.; Michael, N.; Tolle, R.; Schonauer, K.; Mucke, S.; Schulze-Monking, H. Electroconvulsive therapy vs. paroxetine in treatment-resistant depression - a randomized study. *Acta Psychiatr Scand* 96(5):334-42, 1997.
- Frassetto, S.S.; Schetinger, M.R.; Schierholt, R.; Webber, A.; Bonan, C.D.; Wyse, A.T.; Dias, R.D.; Netto, C.A.; Sarkis, J.J. Brain ischemia alters platelet ATP diphosphohydrolase and 5'-nucleotidase activities in naive and preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res* 33 (11): 1369-77, 2000.
- Fredholm, B.B. & Dunwiddie, T.V. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9 (4): 130-4, 1988.
- Garbuglia, M.; Verzini, M.; Sorci, G.; Bianchi, R.; Giambanco, I.; Agneletti, AL.; Donato, R. The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res* 32 (10): 1177-85, 1999.
- Gendron F.P.; Benrezzak, O.; Krugh, B.W.; Kong, Q.; Weisman, G.A.; Beaudoin, A.R. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets* 3 (3): 229-45, 2002.
- Gentil, B.J.; Delphin, C.; Mbele, G.O.; Deloulme, J.C.; Ferro, M.; Garin, J.; Baudier, J. The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-

binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem* 276 (26): 23253-61, 2001.

- Goding, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukoc Biol* 67(3): 285-311, 2000.
- Guan, W.; Yang, Y.L.; Xia, W.M.; Li, L.; Gong, D.S. Significance of serum neuron-specific enolase in patients with acute traumatic brain injury. *Chin J Traumatol* 6 (4): 218-21, 2003.
- Haglid, K.G.; Yang, Q.; Hamberger, A.; Bergman, S.; Widerberg, A.; Danielsen, N. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res* 753(2),196-201, 1997.
- Hellsten, J.; West, M.J.; Arvidsson, A.; Ekstrand, J.; Jansson, L.; Wennstrom, M.; Tingstrom, A. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry* 1;58(11):871-8, 2005.
- Hermann, R.; Dorwart, R.A.; Hoover, C.W.; Brody, J. Variation in ECT use in the United States. *Am J Psychiatry*. 152: 869-75, 1995.
- Holton F.A. & Holton, P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* 126 (1): 124-40, 1954.
- Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145 (3): 494-504, 1959.
- Ingebrigtsen, T & Rommer, B. Serial S-100 protein serum measurements related to early magnetic resonance imaging after minor head injury. Case report. *J Neurosurg* 85(5) :945-8, 1996.

- Ingvar, M. & Siesjo, B.K. Local blood flow and glucose consumption in the rat brain during sustained bicuculline-induced seizures. *Acta Neurol Scand* 68(3):129-144, 1983.
- Inoue, K. The functions of ATP receptors in the hippocampus. *Pharmacol Res* 38(5):323-31, 1998.
- Isobe, T. & Okuyama, T. The amino acid sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain S-100 protein. *J Neurochem* 37 (2): 522-4, 1981.
- Isobe, T.; Ishioka, N.; Okuyama T. Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. *Eur J Biochem* 115 (3): 469-74, 1981.
- Jacobs, B.L. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain Behav Immun* 16(5):602-9, 2002.
- Jeon, S.; Kim, Y.S.; Park, J.; Bae, C.D. Microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) is activated by electroconvulsive shock in the rat hippocampus. *J Neurochem* 95(6):1608-18, 2005.
- Jorgensen, O.S.; Bolwig, T.G. Synaptic proteins after electroconvulsive stimulation. *Science* 17;205(4407):705-7, 1979.
- Kaiser, E.; Kuzmits, R.; Pregant, P.; Burghuber, O.; Worofka W. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clinica Chimica Acta* 183: 13-32, 1989.
- Katz, M.M.; Koslow, S.H.; Frazer, A. Onset of antidepressant activity: reexamining the structure of depression and multiple actions of drugs. *Depress Anxiety* 4(6):257-67, 1996.

- Kempermann, G.; Kronenberg, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54(5):499-503, 2003.
- Kim, Y.; Seo, M.S.; Kang, U.G.; Yoon, S.C.; Ahn, Y.M.; Kim, Y.S.; Juhn, Y.S. Activation of Cdk2-pRB-E2F1 cell cycle pathway by repeated electroconvulsive shock in the rat frontal cortex. *Biol Psychiatry* 1;57(1):107-9, 2005.
- Ko, F.J.; Chiang, C.H.; Wu, C.C.; Wu, L. Studies of neuron-specific enolase levels in serum and cerebrospinal fluid of children with neurological diseases. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 6 (3): 137-43, 1990.
- Koppal, T.; Lam, A.G.; Guo, L.; Van Eldik, L.J. S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochem Int* 39(5-6),401-407, 2001.
- Kostopoulos, G.; Drapeau, C.; Avoli, M.; Olivier, A.; VILLEMEURE J.G. Endogenous adenosine can reduce epileptiform activity in the human epileptogenic cortex maintained in vitro. *Neurosci Lett* 106 (1-2): 119-24, 1989.
- Kragh, J.; Bolwig, T.G.; Woldbye, D.P.; Jorgensen, O.S. Electroconvulsive shock and lidocaine-induced seizures in the rat activate astrocytes as measured by glial fibrillary acidic protein. *Biol Psychiatry* 33(11-12),794-800 ,1993.
- Kukulski, F & Komoszynski, M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. *Eur J Biochem* 270 (16): 3447-54, 2003.
- Lado, F.A.; Laureta, E.C.; Moshe, S.L. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord* 4(2):83-97. 2002.

- Lamers K.J.; Vos, P.; Verbeek, M.M.; Rosmalen, F.; Van Geel, W.J.; Van Engelen, B.G. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res Bull* 61 (3): 261-4, 2003.
- Lamont, S.R.; Paulls, A.; Stewart, C.A. Repeated electroconvulsive stimulation, but not antidepressant drugs, induces mossy fibre sprouting in the rat hippocampus. *Brain Res* 2;893(1-2):53-8, 2001.
- Latini, S. & Pedata, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Neurochem* 79(3):463-84, 2001.
- Leutmezer, F.; Wagner, O.; Baumgartner, C. Serum s-100 protein is not a suitable seizure marker in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43 (10): 1172-4, 2002
- Leviton, A. & Dammann, O. Brain damage markers in children. Neurobiological and clinical aspects. *Acta Paediatrica* 91(1),9-13, 2002.
- Lewin, E. & Bleck, V. Electroshock seizures in mice: effect on brain adenosine and its metabolites. *Epilepsia* 22(5):577-81, 1981.
- Lindefors, N.; Brodin, E.; Metsis, M. Spatiotemporal selective effects on brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNA in rat hippocampus by electroconvulsive shock. *Neuroscience* 65 (3), 661-670, 1995.
- MacDonald, R.L.; Skerritt, J.H.; Werz, M.A. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. *J Physiol* 370: 75-90, 1986.

- Madsen, T.M.; Treschow, A.; Bengzon, J.; Bolwig, T.G.; Lindvall, O.; Tingstrom, A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 15;47(12):1043-9, 2000.
- Manev, R.; Uz, T.; Manev, H. Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus. *Eur J of Pharmacol* 420(2-3),R1-R2, 2001.
- Meldrum, B.S. Neuropathological consequences of chemically and electrically induced seizures. *Ann N Y Acad Sci* 462:186-93, 1986.
- Meldrum, B.S. Why and when are seizures bad for the brain? *Trends Pharmacol Sci* 22(9):445-6, 2001.
- Mendonça, A.; Sebastião, A.M.; Ribeiro, J.A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev* 33 (2-3): 258-74, 2000.
- Mihaylova-Todorova, S.T.; Todorov, L.D.; Westfall, D.P. Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J Pharmacol Exp Ther* 302 (3): 992-1001, 2002.
- Moore, B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 739-744, 1965.
- Moreau, J.L. & Huber, G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* ;31(1):65-82., 1999
- Okada, Y.; Sakurai, T.; Mori, M. Excitatory effect of adenosine on neurotransmission is due to increase of transmitter release in the hippocampal slices. *Neurosci Lett* 142 (2): 233-6, 1992.

- Ongini E, Adami M, Ferri C, Bertorelli R. Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 825: 30-48, 1997.
- Ongur, D. & Heckers, S. A role for glia in the action of electroconvulsive therapy. *Harv Rev Psychiatry* 12(5):253-62, 2004.
- Pagonopoulou, O. & Angelatou, F. Time development and regional distribution of [3H]nitrobenzylthioinosine adenosine uptake site binding in the mouse brain after acute Pentylenetetrazol-induced seizures. *J Neurosci Res* 53 (4): 433-42., 1998.
- Pagonopoulou, O.; Angelatou, F.; Kostopoulos, G. Effect of pentylenetetrazol-induced seizures on A1 adenosine receptor regional density in the mouse brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 56(3):711-6, 1993.
- Palmio J.; Peltola J.; Vuorinen, P.; Laine, S.; Suhonen, J.; Keranen, T. Normal CSF neuron-specific enolase and S-100 protein levels in patients with recent non-complicated tonic-clonic seizures. *J Neurol Sci* 183 (1): 27-31, 2001.
- Pasini, F.L.; Capecchi, P.L.; Perri, T.D. Adenosine and chronic ischemia of the lower limbs. *Vasc Méd* 5 (4): 243-50, 2000.
- Pelters, M.M.; Hanhoff, T.; Van der Voort, D; Arts, B.; Peters, M.; Ponds, R.; Honig, A.; Rudzinski, W.; Spener, F.; de Kruijk, J.R.; Twijnstra, A.; Hermens, W.T.; Menheere, P.P.; Glatz, J.F. Brain- and heart-type fatty acid-binding proteins in the brain: tissue distribution and clinical utility. *Clin Chem* 50(9):1568-75, 2004.
- Phillis, J.W. & Wu, P.H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 16 (3-4): 187-239, 1981.

- Rasmussen, C.V.; Kragh, J.; Bolwig, T.G.; Jorgensen, O.S. Repeated electroconvulsive shock selectively increases the expression of the neuron specific enolase in piriform cortex. *Neurochem Res* 19(12):1527-1530, 1994.
- Rebola, N.; Coelho, J.E.; Costenla, A.R.; Lopes, L.V.; Parada, A.; Oliveira, C.R.; Soares-da-Silva, P.; de Mendonça, A.; Cunha, R.A. Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *Eur J Neurosci* 18 (4): 820-8, 2003.
- Reisner, A.D. The electroconvulsive therapy controversy: evidence and ethics. *Neuropsychol Rev* 13(4):199-219, 2003.
- Ribeiro, J.A.; Sebastião, A.M.; Mendonça, A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect* 16 (2): 80-6, 2003.
- Richardson, P.J. & Brown, S.J. ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 48(2):622-30, 1987.
- Riese, W. Report of two new cases of sudden death after electric shock treatment with histopathological findings in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 7:98-100, 1948.
- Rodríguez-Nuñez, A.; Cid, E.; Rodrigues-Garcia, J.; Camina, F.; Rodrigues-Segade, S.; Castro-Gago, M. Cerebrospinal fluid purine metabolite and neuron-specific enolase concentrations after febrile seizures. *Brain Dev* 22 (7): 427-31, 2000.
- Rodríguez-Nuñez, A.; Cid, E.; Rodríguez-Garcia, J.; Camina, F.; Rodrigues-Segade, S.; Castro-Gago, M. Neuron-specific enolase, nucleotides, nucleosides, purine bases, oxypurines and uric acid concentrations in cerebrospinal fluid of children with meningitis. *Brain Dev* 25(2):102-6, 2003.

- Rosen, H.; Rosengren, L.; Herlitz, J.; Blomstrand, C. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29 (2): 473-7, 1998.
- Rustandi R.R.; Baldisseri, D.M.; Drohat, A.C.; Weber, D.J. Structural changes in the C-terminus of Ca²⁺-bound rat S100B (beta beta) upon binding to a peptide derived from the C-terminal regulatory domain of p53. *Protein Sci* 8 (9): 1743-51, 1999.
- Santarelli, L.; Saxe, M.; Gross, C.; Surget, A.; Battaglia, F.; Dulawa, S. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634):805-9, 2003.
- Schafer, B.W. & Heizmann, C.W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21 (4): 134-40, 1996.
- Schetinger, M.R.; Bonan, C.D.; Frassetto, S.S.; Wyse, A.T.; Schierholt, R.C.; Webber, A.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J.; NettoETTO, C.A. Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat. *Biochem Mol Biol Int* 47(3): 473-8, 1999.
- Shashoua, V.E.; Hesse, G.W.; Moore, B.W. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem* 42 (6): 1536-41, 1984.
- Shen, H.; Numachi, Y.; Yoshida, S.; Fujiyama, K.; Toda, S.; Awata, S.; Matsuoka, H.; Sato, M. Electroconvulsive shock increases serotonin transporter in the rat frontal cortex. *Neurosci Lett* 1;341(2):170-2, 2003.
- Shorter, E. A history of psychiatry: from the era of the asylum to the age of prozac. John Willey & Sons, Inc. 1997.

- Steinhoff B.J.; Tumani, H.; Otto, M.; et al. Cisternal S100 protein and neuron-specific enolase are elevated and site-specific markers in intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 36 (1): 75-82, 1999
- Sterling, P. ECT damage is easy to find if you look for it. *Nature* 403(6767), 242, 2000.
- Stewart, C.A.; Reid, I.C. Repeated ECS and fluoxetine administration have equivalent effects on hippocampal synaptic plasticity. *Psychopharmacology (Berl)* 148(3):217-23, 2000.
- Strober, M.; Rao, U.; DeAntonio, M.; Liston, E.; State, M.; Amaya-Jackson, L.; Latz, S. Effects of electroconvulsive therapy in adolescents with severe endogenous depression resistant to pharmacotherapy. *Biol Psychiatry* 43(5):335-8, 1998.
- Strome, E.M.; Clark, C.M.; Zis, A.P.; Doudet, D.J. Electroconvulsive shock decreases binding to 5-HT₂ receptors in nonhuman primates: an in vivo positron emission tomography study with [¹⁸F]setoperone. *Biol Psychiatry* 1;57(9):1004-10, 2005.
- Sun, W.; Park, K.W.; Choe, J.; Rhyu, I.J.; Kim, I.H.; Park, S.K.; Choi, B.; Choi, S.H.; Park, S.H.; Kim, H. Identification of novel electroconvulsive shock-induced and activity-dependent genes in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 18;327(3):848-56, 2005.
- Thompson, J.W.; Blaine, J.D.; Use of ECT in the United States in 1975 and 1980. *Am J Psychiatry* 144:557-62, 1987.
- Thompson, J.W.; Weiner, R.D.; Myers, C.P. Use of ECT in the United States in 1975, 1980 and 1986. *Am J Psychiatry* 151:1657-61, 1994.

- Thuillier, J. Ten years that changed the face of mental illness. Martin Dunitz Ltd, United Kingdom, 1999.
- Torre, E.R.; Lothman, E.; Steward, O. Glial response to neuronal activity: GFAP-mRNA and protein levels are transiently increased in the hippocampus after seizures. *Brain Res* 631(2),256-264, 1993.
- Trussell, L.O. & Jackson, M.B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(14):4857-61, 1985.
- UK ECT Review Group. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361(9360), 799-808, 2003.
- van Calker, D. & Biber, K. The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. *Neurochem Res* 30(10):1205-17, 2005.
- Van Eldik L.J. & Zimmer D.B. Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res* 436 (2): 367-70, 1987.
- Van Eldik, L.J. & Wainwright, M.S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21(3-4),97-108, 2003.
- Von Kugelgen, I. & Starke, K. Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 344 (4): 419-29, 1991.
- Wennstrom, M.; Hellsten, J.; Ekstrand, J.; Lindgren, H.; Tingstrom, A. Corticosterone-induced inhibition of gliogenesis in rat hippocampus is counteracted by electroconvulsive seizures. *Biol Psychiatry* 15;59(2):178-86, 2006.

- Winslade, W.J.; Liston, E.H.; Ross, J.W.; Weber, K.D. Medical, Judicial and statutory regulation of ECT in the United States. *Am J Psychiatry* 141:1349-55, 1984.
- Zachrisson, O.C.; Balldin, J.; Ekman, R.; Naesh, O.; Rosengren, L.; Agren, H.; Blennow, K. No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Res* 96(2):157-65, 2000.
- Zetterstrom, T.S.; Pei, Q.; 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(1),106-110, 1998.
- Zhang, G.; Franklin, P.H.; Murray, T.F. Manipulation of endogenous adenosine in the rat prepiriform cortex modulates seizure susceptibility. *J Pharmacol Exp Ther* 264(3):1415-24, 1993.
- Zimmer, D.B.; Cornwall, E.H.; Landar, A.; Song, W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37(4):417-29, 1995.
- Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52: 46-56, 2001.