

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ANDRÉ VINÍCIUS CONTRI PAZ

Padronização de método de imunodeteção em células SH-SY5Y diferenciadas para avaliação da atividade da Fosfatase homóloga a tensina (PTEN)

PORTO ALEGRE
MAIO/2014

ANDRÉ VINÍCIUS CONTRI PAZ

Padronização de método de imunodeteção em células SH-SY5Y diferenciadas para avaliação da atividade da Fosfatase homóloga a tensina (PTEN)

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Clarissa Severino Gama

Co-orientadora: Bianca Wollenhaupt de Aguiar

PORTO ALEGRE

MAIO/2014

Agradecimentos

À minha família, pelo apoio prestado mesmo em momentos difíceis e ao incentivo dado.

À minha namorada, Daniele Leal Textor, pelas discussões teóricas e pelo apoio durante a execução deste trabalho.

À minha orientadora, professora Dr^a Clarissa Severino Gama, pela confiança e ensinamentos prestados ao longo da minha trajetória.

À minha co-orientadora, Bianca Wollenhaupt de Aguiar, pelos ensinamentos e discussões científicas que renderam muitas idéias.

Aos demais integrantes do Laboratório de Psiquiatria Molecular, que me ensinaram a ser pesquisador.

Ao professor Dr. Fábio Klamt, que disponibilizou seu conhecimento e laboratório, sem os quais não seria possível a execução deste projeto.

Aos colegas de graduação e professores, que me proporcionaram momentos inesquecíveis.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela minha graduação.

Sumário

1. Resumo	4
2. Introdução	6
2.1 Transtorno de Humor Bipolar	6
2.2 Transtorno de Humor Bipolar e a via da PI3K/Akt	6
2.3 PTEN	8
2.4 Valproato	9
2.5 Valproato, via da PI3K e a PTEN	10
2.6 Transtorno de Humor Bipolar e Cultura Celular	10
2.7 Western blot.....	11
3. Justificativa.....	14
4. Objetivos.....	15
5. Artigo Científico	16
Abstract	18
1. Introduction	19
2. Materials and Methods.....	21
3. Results	24
4. Discussion	27
5. References.....	29
6. Conclusão	37
7. Perspectivas	38
8. Referências Adicionais.....	39

1. Resumo

A fosfatase homóloga à tensina (PTEN) é uma proteína fundamental na regulação de vários processos celulares no sistema nervoso central, tais como plasticidade, formação de sinapses e sobrevivência neuronal. Dentre as vias controladas por ela, destaca-se a via da PI3K/Akt que está altamente relacionada aos transtornos de humor, em especial o Transtorno de Humor Bipolar (THB). O valproato (VPA), um dos principais fármacos utilizados no tratamento do THB, é capaz de modular sua atividade, porém os mecanismos responsáveis permanecem desconhecidos. Com isso, estudar o mecanismo de ação do VPA pode ser de grande importância clínica, podendo fornecer novos alvos farmacológicos para o tratamento do THB.

O objetivo principal deste trabalho é padronizar uma técnica de imunodeteção para avaliar a atividade da PTEN em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos, com o objetivo secundário de avaliar se o VPA é capaz de modular sua atividade.

As células da linhagem SH-SY5Y foram diferenciadas em neurônios dopaminérgicos com 10 μ M de ácido retinóico durante 7 dias e utilizadas na padronização da técnica de Western blot. A padronização incluiu tempo de eletroforese, tempo de transferência, tempo de bloqueio da membrana, concentração de anticorpos primários anti- β -actina, anti-PTEN e anti-fosfo-PTEN, concentração de anticorpo secundário e tempo de exposição em filmes de raio-X. Também foi realizada uma curva de dose-resposta do VPA em células SH-SY5Y diferenciadas com as doses de 50, 80, 100, 120, 300 e 1000 μ g/mL por 24 horas, sendo avaliada a viabilidade celular pela técnica de MTT. Após a dose ideal ser definida, foi realizado Western blot da PTEN para ver os efeitos do VPA sobre sua atividade, inferida pela razão entre PTEN total e PTEN fosforilada.

A técnica de Western blot foi padronizada com sucesso, sendo possível identificar PTEN total, fosforilada e β -actina nas diluições de anticorpo primário de 1:1000, 1:10000 e 1:20000, respectivamente. O anticorpo secundário foi padronizado na diluição de 1:20000. A curva de dose-resposta do VPA mostrou que a dose de 100 μ g/mL seria a mais

adequada, uma vez que além de não reduzir a viabilidade celular, encontra-se na faixa terapêutica para o tratamento de episódios maníacos do THB. O VPA foi capaz de induzir a inibição da atividade da PTEN ($p=0,043$).

Este achado é de grande importância, pois o mecanismo pelo qual o VPA modula a atividade da via PI3K/Akt pode ser explicado através da inibição da PTEN. Além disso, a PTEN pode ser um novo alvo farmacológico para o tratamento do THB.

2. Introdução

2.1 Transtorno de Humor Bipolar

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é um transtorno mental crônico e multifatorial caracterizado por mudanças comportamentais episódicas, sendo uma das dez principais causas de incapacitação no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Lopez e Murray, 1998). O THB pode ser subdividido em dois subtipos conforme o tipo de episódios vivenciados pelo indivíduo: THB tipo 1, onde ocorrem episódios depressivos, episódios maníacos e períodos de remissão (eutimia), e THB tipo 2, onde ocorrem episódios depressivos, episódios hipomaníacos e períodos de eutimia. Em ambos os tipos pode haver a presença de sintomas psicóticos ou episódios com sintomas mistos (Goodwin e Jamison, 1990). A intensidade dos sintomas é variável, podendo levar a déficits cognitivos e comprometimento do desempenho de atividades diárias. Cada vez mais evidências têm apontado a presença de um acentuado declínio cognitivo (Martínez-Áran et al., 2007) e funcional em pacientes com THB, os quais parecem estar mais acentuados durante os episódios agudos da doença, e persistindo em menor grau durante os períodos de remissão (Rosa et al., 2010).

A etiologia do THB ainda não está completamente esclarecida, porém muitos avanços já foram feitos e sabe-se que há o envolvimento de fatores sócio-ambientais e genéticos que possuem um papel importante no desenvolvimento da doença (Kaplan, Sadock e Grebb, 1997; Vieta, Colon e Martinez-Arán, 1999).

2.2 Transtorno de Humor Bipolar e a via da PI3K/Akt

Vários estudos mostram alterações no volume de estruturas neuroanatômicas em pacientes portadores de THB, principalmente em áreas envolvidas com a regulação do humor. Os resultados mais consistentes

apontam redução do volume do córtex pré-frontal (CPF) subgenual e do hipocampo, assim como aumento do volume da amígdala e do estriado (Hajek et al., 2005; Strakowski et al., 2005). Estes resultados sugerem que o THB pode estar relacionado a uma redução de plasticidade e resiliência neuronal. A via da PI3K/Akt é uma das principais vias de sinalização celular responsáveis pela regulação destes processos (Wymann et al., 2003; Downward, 2004). Quando esta via é ativada, a enzima fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) fosforila o fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP2), convertendo-o em fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato (PIP3). O PIP3 formado irá interagir com o domínio pleckstrina (PH) de diversas proteínas, ancorando-as na membrana plasmática da célula. Dentre estas proteínas, podemos destacar a Akt, que é a principal enzima ativada na via da PI3K/Akt. A Akt possui três isoformas, sendo que a Akt-1 e Akt-3 são expressas no encéfalo. A proteína dependente de fosfoinositóis 1 (PDK1) fosforila a Akt no sítio treonina-308, enquanto o complexo 2 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2), a cinase ligada a integrina (ILK) e a proteína cinase ativada por proteína cinase de mitógeno 2 (MAPKAPK2) são capazes de fosforilar a Akt no sítio serina-473. Estes dois sítios são fundamentais para a ativação completa da Akt. Quando ativa, a Akt fosforila várias proteínas, dentre elas a glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β).

A ativação da via da PI3K/Akt estimula a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), pois aumenta a atividade de ligação ao DNA da proteína ligante ao elemento responsivo a AMP cíclico (CREB) através da inibição da GSK-3 β (Grimes e Jope, 2001). Alguns estudos com pacientes portadores de THB mostram a redução dos níveis séricos de BDNF somente durante os episódios agudos da doença, havendo correlação negativa com a intensidade dos sintomas (Cunha et al., 2006; Tramontina et al., 2009; Shimizu et al., 2003). Além disso, o uso de estabilizadores de humor é capaz de normalizar os níveis séricos de BDNF (Frey et al., 2006).

Por esta razão, o estudo de mecanismos celulares que regulem a via da PI3K/Akt é de grande importância, visto que esta é uma das principais vias que inibem a atividade da enzima GSK-3 β . Existem evidências de que o aumento da atividade da GSK-3 β pode estar relacionado ao

desenvolvimento de várias doenças psiquiátricas, inclusive o THB (Kaidanovich-Beilin et al., 2009; Polter et al., 2010). Um estudo mostrou uma redução na fosforilação do sítio serina-9 da GSK-3 β em linfócitos de pacientes com THB, sugerindo que a atividade, ao menos desta isoforma, esteja aumentada (Polter et al., 2010). Além disso, outro estudo evidenciou existir uma associação entre uma variante genética do gene da PI3K com o THB (Carrard et al., 2011).

Uma das principais formas de regulação da via PI3K/Akt é feita pela proteína fosfatase homóloga a tensina (PTEN).

2.3 PTEN

A PTEN é uma proteína que possui 403 aminoácidos e pertence à família das proteínas tirosina-fosfatases (PTP). Ela é composta por dois domínios estruturais principais: o domínio C2, responsável pelo acoplamento à membrana por um mecanismo independente de cálcio, e o domínio fosfatase, que é responsável pela ligação ao fosfatidilinositol e ao domínio PDZ (Gericke, Munson e Ross, 2006).

A atividade de fosfatase da PTEN remove o fosfato localizado na posição 3' do PIP3, convertendo-o em PIP2, antagonizando a função da PI3K. Desta forma, a PTEN acaba por inibir a via da PI3K/Akt, diminuindo a atividade da Akt e consequentemente aumentando a atividade da GSK-3 β (Cantley, 2002).

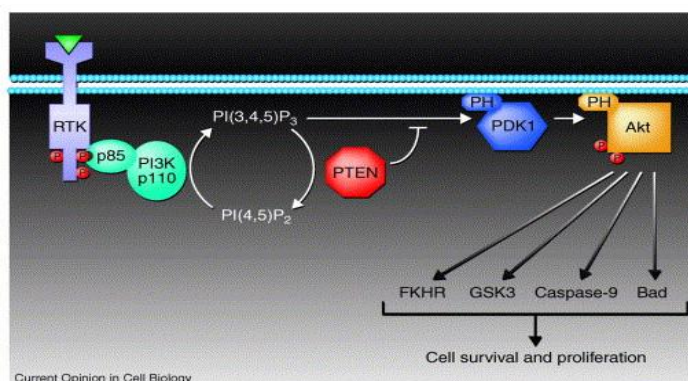


Figura 1. Via da PTEN. Fonte: Matthew J Wishart, et al. PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench.

A PTEN possui várias formas de regulação, como sítios para fosforilação, acetilação, ubiquitinação, sítios responsivos ao estado redox celular, regulação por miRNAs, entre outros (Song, Salmena e Pandolfi, 2012). No domínio C2, existem três aminoácidos responsáveis pela regulação da atividade de fosfatase da PTEN, são eles a serina-380, a treonina-382 e a treonina-383. Quando fosforilada nestes sítios, a proteína sofre mudanças conformacionais que impedem seu recrutamento para a membrana, inibindo assim sua atividade de fosfatase. Este mecanismo é responsável pela facilitação da ativação da Akt e da PDK1, pois o PIP3 formado pela PI3K se mantém disponível (Das et al, 2003).

Devido a sua importância na regulação da via da PI3K, a PTEN pode apresentar um grande potencial como alvo para o tratamento do THB.

2.4 Valproato

O valproato (VPA) é um anticonvulsivante utilizado como tratamento em algumas doenças do sistema nervoso central (SNC), como a epilepsia e o THB. Dentre seus efeitos no sistema nervoso central, encontram-se o aumento da neurotransmissão mediada por ácido γ -aminobutírico (GABA) e a inibição da succinato semialdeído desidrogenase, succinato semialdeído redutase e da GABA transaminase, todas sendo enzimas do metabolismo do GABA. Além disso, o VPA é um inibidor da enzima histona desacetilase (HDAC), o que leva a alterações no padrão da expressão de alguns genes que podem ser importantes em seu mecanismo de ação. Além destes efeitos, sabe-se que o VPA induz alterações nos níveis de diversos fatores de crescimento, hormônios e interfere em processos celulares, como sinaptogênese, apoptose, sobrevivência celular, dentre outros (Chiu et al, 2013).

No THB, o VPA é utilizado principalmente para controle de episódios maníacos. A dose terapêutica no plasma para episódios maníacos varia de 80-125 $\mu\text{g/mL}$ (Allen et al., 2006).

Um dos mecanismos pelo qual se acredita que o VPA seja eficaz no tratamento do THB é através da modulação da via PI3K/Akt (De Sarno e Joje, 2002).

2.5 Valproato, via da PI3K e a PTEN

Vários estudos sugerem que o VPA age na via PI3K/Akt, pois é capaz de ativar a Akt e inibir a GSK-3 β (De Sarno e Joje, 2002). Porém, o mecanismo pelo qual o ele exerce estes efeitos ainda não foi elucidado (Chen et al, 1999).

Uma das possíveis formas pela qual o VPA pode modular a atividade da via da PI3K é através da PTEN. Existem evidências de que este fármaco seja capaz de modular a expressão de alguns microRNAs que agem nas vias de sinalização da PTEN (Zhou et al., 2009). Porém, até o momento este é o primeiro estudo a sugerir uma relação entre o VPA e a atividade da PTEN. Desta forma, sugere-se que parte de seus efeitos pode estar ligado à capacidade de modular esta via através desta enzima.

2.6 Transtorno de Humor Bipolar e Cultura Celular

Cada vez mais os pesquisadores têm procurado por modelos experimentais mais eficazes para o estudo dos transtornos psiquiátricos, tendo se buscado alternativas experimentais para o estudo de doenças que acometem o SNC, como o THB. Em vista disso, recentemente foi padronizada *in vitro* uma técnica de diferenciação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Lopes et al., 2010). Essas células são obtidas de uma linhagem celular isolada de um neuroblastoma humano e por isso, originalmente, possuem características oncogênicas, proliferativas e apresentam um estágio de diferenciação precoce caracterizado pela baixa presença de marcadores neuronais. Contudo, após o desenvolvimento do protocolo de diferenciação esta linhagem tem sido utilizada com sucesso no estudo de vias moleculares e bioquímicas envolvidas na fisiopatologia de várias doenças que acometem o SNC (Lopes et al., 2012; Xie et al., 2010). A

padronização do protocolo de diferenciação garantiu a possibilidade de se estabelecer uma linhagem de células com características morfológicas e bioquímicas de neurônios dopaminérgicos (Lopes et al., 2010). Com a implementação dessa ferramenta, está sendo possível desenvolver novos trabalhos com uma metodologia mais adequada para o estudo de doenças relacionadas ao SNC, visto que este modelo utiliza células de origem humana e com características neuronais, diminuindo assim as limitações inerentes ao estudo de transtornos que afetam o cérebro, como o THB.

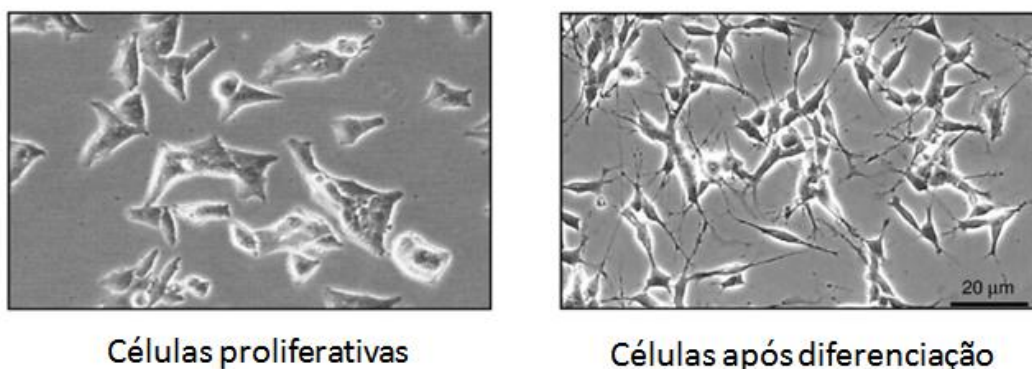


Figura 2. Comparação morfológica de células SH-SY5Y proliferativas e após diferenciação (adaptado de Lopes et al., 2010).

2.7 Western blot

A técnica de Western blot é baseada na imunodeteção de uma proteína de interesse. Para isso, as células a serem estudadas são lisadas e misturadas ao tampão de amostra (tampão de Laemmli), que contém glicerol, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol. O glicerol garante peso à amostra, fazendo com que esta precipite no poço do gel. O azul de bromofenol é uma molécula de cor azulada e carga negativa, que não se liga às proteínas da amostra e que, devido ao seu tamanho, acompanha as menores proteínas da amostra, ou seja, serve para monitorar a corrida eletroforética. O SDS cria uma camada de cargas negativas nas proteínas, fazendo com que todas as proteínas da amostra adquiram carga negativa, fazendo com que a separação se dê apenas pela diferença de peso molecular. O β -mercaptoetanol quebra as

pontes dissulfeto, desfazendo estruturas quaternárias e auxiliando na desnaturação das proteínas (Mahmood e Yang, 2012).

Assim, as amostras são aquecidas a 95°C para desnaturação e são então separadas em um gel de poliacrilamida, feito na concentração adequada para a proteína de interesse. Nesta etapa, é gerado um campo elétrico entre as extremidades do gel, responsável pela separação das proteínas. Com a adição do SDS, todas migram para o polo positivo, sendo que as menores proteínas passarão mais facilmente pelos poros do gel. Esta é a razão pela qual ocorre a separação por peso molecular.

Após a separação, as proteínas são transferidas para uma membrana, que dentre as mais comuns encontram-se as de nitrocelulose e as de PVDF. O método de transferência também varia, sendo os tipos mais comuns o úmido ou semi-seco. O tempo de transferência é afetado pelo tamanho da proteína de interesse, pois quanto menor a proteína, mais rápida é sua transferência para a membrana. Logo após a transferência, as membranas são bloqueadas com alguma solução rica em proteínas (por exemplo, solução com albumina sérica bovina (BSA) ou leite desnatado) e com Tween-20, para impedir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana (Kurien e Scofield, 2006).

Depois do bloqueio, é feita a incubação com anticorpo primário, que irá se ligar especificamente à proteína de interesse. Após isso, é feita a incubação com um anticorpo secundário, que irá se ligar ao primário. O anticorpo secundário será o emissor de sinal, que pode ser na forma de fluorescência, radiação, luz ou cor. Nos dois últimos casos, o anticorpo secundário é conjugado a uma enzima que, uma vez fornecido o substrato, irá catalisar uma reação gerando o sinal.

O western blot é considerado uma técnica semi-quantitativa e possui várias alternativas de execução para quase todas as etapas, o que torna o protocolo muito variável, exigindo padronização de acordo com o objetivo de seu uso. Por exemplo, no caso de estudar proteínas fosforiladas, o ideal é bloquear a membrana com BSA, pois o leite possui altos níveis de caseína, uma fosfo-proteína que normalmente causa ligação inespecífica de anticorpos que ligam a proteínas fosforiladas. Além disso, a quantidade de proteínas carregadas no gel, o controle endógeno, o tempo de corrida, a

concentração do gel, o tipo de membrana, o tempo de transferência e a concentração dos anticorpos e o tampão nos quais estes são diluídos são outras variáveis que exigem padronização para resultados otimizados, reproduzíveis e confiáveis (Kurien e Scofield, 2006).

Esta técnica tem sido usada por anos como uma ferramenta para inferir a atividade de proteínas caso estas possuam sítios caracterizados como fundamentais para sua inibição ou ativação, como no caso da PTEN, sendo que sua atividade pode ser inferida através do cálculo da razão entre PTEN total e fosforilada (Vazquez et al., 2000).

3. Justificativa

Pouco se sabe sobre a etiologia do THB, porém a via da PI3K/Akt parece ter um papel fundamental no curso da doença, pois está envolvida em uma série de processos celulares que parecem estar alterados no THB, como a resiliência e plasticidade neuronal. Apesar de vários estudos mostrarem que o VPA exerce efeitos nesta via, ainda não se tem conhecimento de quais alvos poderiam ser responsáveis por tais efeitos. Por isso, estudar como os fármacos utilizados no THB regulam esta via é de grande relevância para a melhor compreensão de seus efeitos terapêuticos. Além disso, nenhum estudo até o momento verificou diretamente o possível envolvimento da PTEN no mecanismo de ação do VPA.

Para poder avaliar esta questão, se faz necessário a utilização de um método confiável e classicamente reconhecido. Por isso, a padronização da técnica de Western blot é uma etapa fundamental para nosso estudo, pois através dela é possível verificar os possíveis efeitos do VPA na atividade da PTEN, além de oferecer uma nova abordagem para futuros estudos desenvolvidos no Laboratório de Psiquiatria Molecular e outros que tenham o mesmo objetivo.

4. Objetivos

Objetivo Geral:

- Padronizar a técnica de Western blot, de forma que seja possível avaliar proteínas de interesse na área, como a PTEN;
- Avaliar se o valproato é capaz de modular a atividade da PTEN em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos.

Objetivos específicos:

- Estabelecer as melhores condições para a imunodeteção da PTEN em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos;
- Avaliar a viabilidade celular após o tratamento das células SH-SY5Y com o valproato nas doses de 50, 80, 100, 120, 300 e 1000 µg/mL comparado ao controle, com a finalidade de definir a dose ideal para realizar o estudo;
- Avaliar a atividade da PTEN após tratamento com valproato em relação ao controle para verificar a modulação que este fármaco pode realizar neste ponto específico da via da PI3K/Akt.

5. Artigo Científico

Os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho foram organizados na forma de artigo científico, a ser submetido ao periódico "*Journal of Neuroscience Methods*".

Establishment of an immunodetection method for the evaluation of PTEN activity in differentiated SH-SY5Y cells

André Vinícius Contri Paz¹, Bianca Wollenhaupt de Aguiar^{1,2}, Clarissa Severino Gama^{1,3}

1. Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Programa de Pós-graduação em Medicina: Psiquiatria, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author:

* André Vinícius Contri Paz

Laboratory of Molecular Psychiatry

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Centro de Pesquisa Experimental

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Prédio Anexo

CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: andrecontri@hotmail.com

Abstract

Background: Bipolar disorder (BD) is a multifactorial mental illness. Biochemical studies have shown abnormalities in cellular signaling pathways in the brain of BD patients, and one of the most reported is the PI3K/Akt pathway, which is regulated by phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein. It is well known that valproate (VPA) can activate this pathway, but the mechanism is still unknown. We hypothesize that VPA acts inhibiting PTEN activity, thus promoting activation of PI3K/Akt pathway. The main objective of this study was to standardize the western blot technique for evaluation of PTEN activity in differentiated SH-SY5Y cells. Additionally, we assessed the effects of VPA on PTEN activity.

Methods: The SH-SY5Y cells were differentiated in DMEM/F12 medium containing 1% fetal bovine serum and 10 μ M of retinoic acid and then were harvested and prepared for western blot assay. All variables of western blot, such as time of transfer and concentration of primary and secondary antibodies were tested until optimal results were obtained. The cell viability was verified by MTT after 24 hours of treatment with 50, 80, 100, 120, 300 and 1000 μ g/mL of VPA.

Results: Based on MTT results, we used the 100 μ g/mL dose of VPA for western blot analysis. We successfully established western blot technique and we also showed that VPA induced an inhibition of PTEN activity ($p=0.043$).

Conclusion: This finding could explain, at least in part, how VPA acts to increase the activity of PI3K/Akt pathway and could make PTEN a new target for drug development for BD.

Keywords: PTEN; Valproate; SH-SY5Y; Western blot.

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a chronic and multifactorial mental disorder that is characterized by mood episodes. It could be divided in two types: BD type I, with maniac and depressive episodes; and BD type II, with hypomanic and depressive episodes. The intensity of symptoms is variable, but there are evidences that the number of episodes and time of disease could lead to impairment in cognitive capabilities of the individuals with BD (Martínez-Áran et al., 2007; Rosa et al., 2010). In fact, several studies showed alterations in the volume of brain structures involved in mood regulation, such as hippocampus, prefrontal cortex and the amygdala (Hajek et al., 2005; Strakowski et al., 2005). These findings suggest that the neuronal plasticity and resilience could be altered in the brain of BD patients.

The main molecules responsible for the maintenance of these cellular processes are the neurotrophins. There are many studies showing reduction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), the most abundant neurotrophic factor in nervous system, in blood samples of the patients during acute episodes, becoming similar to controls when the patients enter in remission (euthymia)(Cunha et al., 2006). Also, the treatment with mood stabilizers increased the levels of BDNF in BD patients (Tramontina et al., 2009). The neurotrophins are responsible for the activation of neurotrophic pathways and one of the most studied is the PI3K/Akt pathway.

The PI3K/Akt pathway regulates many cellular processes, such as cellular survival, apoptosis, metabolism, synaptogenesis and synthesis of neurotrophic factors (Wymann et al., 2003; Downward, 2004). Once BDNF binds to its Tyrosine kinase receptor, the enzyme PI3K is activated and phosphorylates the phosphatidylinositol-(4,5) bisphosphate (PIP₂) to phosphatidylinositol-(3,4,5) trisphosphate (PIP₃). The PIP₃ allows Akt to migrate to the cell membrane, where it is activated. Once activated, Akt controls several cellular processes through inhibition of glycogen synthase kinase -3 β (GSK-3 β). The inhibition of GSK-3 β allows the binding of cAMP response element-binding protein (CREB) in DNA, promoting the transcription of different proteins, including BDNF (Cantley, 2002; Grimes e Jope, 2001). There are studies that showed increased activity of GSK-3 β and

decreased activity of Akt in peripheral mononuclear cells of patients with BD during acute episodes, thus indicating that this could be related to the reduction of BDNF levels (Polter et al., 2010). The main regulatory enzyme of the PI3K/Akt pathway is the phosphatase and tensin homologue (PTEN) protein.

PTEN is a phosphatase protein with 403 aminoacids in its structure. It antagonizes the PI3K action, in other words, it dephosphorylates the PIP3 generating PIP2, inhibiting the Akt binding in the membrane. This leads to activation of GSK-3 β and reduction of BDNF synthesis and promotion of synthesis of apoptotic factors (Cantley, 2002). PTEN activity can be modulated in many different ways, like phosphorylation, acetylation, ubiquitination and by redox status (Song, Salmena e Pandolfi, 2012). There are three main sites of phosphorylation that regulates the phosphatase activity of PTEN: serine-380, threonine-382 and threonine-383. When phosphorylated at these residues, PTEN is inhibited because it can't bind to PIP3 (Das et al, 2003).

Valproate (VPA), an anticonvulsant drug, is used in the treatment of BD patients, mainly in maniac episodes. Its mechanism of action remains unknown, but there are some clues regarding its intracellular targets. VPA is a histone deacetylase inhibitor, and it is believed that some of its therapeutic effects are due to alterations in transcriptional activity of DNA, increasing the expression of antiapoptotic and neurotrophic factors. VPA is also related to the PI3K/Akt pathway and studies have shown that VPA promotes activation of Akt, inhibition of GSK-3 β and increases BDNF levels (Chiu et al, 2013).

In this study, we hypothesize that VPA exerts its effects on PI3K/Akt pathway through modulation of PTEN activity. To accomplish our goal, we established an immunodetection method to access the activity of PTEN. Our secondary objective was access the effect of VPA on PTEN activity. The chosen method was Western blot, and the activity was determined by the ratio of total PTEN/ PTEN phosphorylated in residues Ser-380/Thr-382/383.

2. Materials and Methods

Antibodies and Reagents

The western blot equipment and HRP-conjugated secondary antibody was purchased from Bio-Rad (Cod. 1706515). The monoclonal antibodies anti- β -actin (Cod. 8457), anti-PTEN (Cod. 9559) and anti-phospho-PTEN (Cod. 9549) were purchased from Cell Signaling Technology. The substrate used was the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce.

Cell culture

The SH-SY5Y cells (ATCC, USA) were cultivated in DMEM/F12 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBV), 2mM glutamine, 100 μ g/ μ L gentamycin and 0,25 μ g/mL amphotericin B and were kept in an humidified environment with 5% CO₂ at 37 °C. The cellular differentiation was induced with the reduction of FBV to 1% plus the addition of 10 μ M retinoic acid for 7 days. After this protocol, the cells acquire the morphological and biochemical characteristics of dopaminergic neurons, as described by Lopes et al. (2010).

Dose-response curve of VPA and treatment

We used a 10 mg/mL stock solution of VPA (sigma) diluted in sterile water. The experiments were performed with diluted VPA to the desired concentrations in the same medium used for the cell differentiation. After differentiation, in a 96-wells plate, the cells were treated with VPA in concentrations of 50, 80, 100, 120, 300 and 1000 μ g/mL for 24 hours for determination of the dose-response curve, determined by cell viability assessed by MTT assay. These concentrations were chosen based on the therapeutic dose range, except the 50, 300 and 1000 μ g/mL concentrations (Chiu et al., 2013). The cells in the control group didn't receive any treatment and it was just added the differentiation medium. After the treatment, the cells were incubated with MTT for 1 hour and then the formazan crystals were solubilized with DMSO. The absorbance was read at 560 and 630 nm for

further calculations. After the definition of the ideal concentration, cells were differentiated and treated with VPA for 24 hours for western blots.

Sample preparation for western blot

The cells were harvested and washed with PBS and centrifuged two times at 250 x g for 5 minutes. The pellet was lysated with NP-40 buffer followed by sonication. In all samples it was added protease and phosphatase inhibitors (Sigma). The total protein content was determined by Bradford assay and the Laemmli buffer was added in 1:1 proportion.

Western blot standardization and measurement of PTEN activity

First, the western blot technique was standardized. It was tested the levels of protein loaded in gel, time of electrophoresis, time of transfer to nitrocellulose membrane, time of blocking, and dilution of primary and secondary antibody. For the standardization, differentiated cells without any treatment were used.

After the standardization, 20 µg of protein in the samples were separated in 10% SDS-PAGE. Then the proteins were transferred to the nitrocellulose membrane and blocked for 1.5 hours. After this, the membrane was cut in two parts, one was incubated with antibody anti-β-actin and the other with anti-PTEN or anti-phospho-PTEN overnight at 4°C. The membranes were washed and incubated with secondary antibody (1:20000) for 1 hour at RT. The membranes were incubated with substrate for 5 minutes and their fluorescence was immediately read in X-ray films (during the standardization) or in ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare lifesciences).

The activity of PTEN was inferred by the ratio of the densitometry of bands of total PTEN by phospho-PTEN. Both values of densitometry were previously normalized by the values of β-actin. The software used to calculate the densitometry was the ImageJ by NIH.

Statistical analysis

Due to the small sample size, it was conducted non-parametric analysis. In all experiments, every sample was analyzed in duplicate. All experiments were conducted at least four times. The comparison among all doses of MTT was conducted with Friedman's test. Other comparisons were conducted with Wilcoxon test. $P < 0.05$ was considered significant. All tests were analyzed in SPSS 18.0 software. The graphics were made in GraphPad Prism 5 software.

3. Results

Establishment of western blot assay

The standardization of western blot began with the determination of the gel concentration. The molecular weight of β -actin is 46 kDa and the PTEN/phospho-PTEN is 54 kDa, so it was decided that the 10% percentage would allow us to separate the two proteins and make blotting of both in the same membrane. After this step, we determined the time of electrophoresis. We loaded 20 μ g of protein in each well for these initial tests and we verified that the electrophoresis was completed in approximately 50 minutes in the recommended settings of Bio-Rad's Mini-Protean owner's manual (200v constant).

After the electrophoresis, we determined the time needed to transfer the proteins of our interest to the nitrocellulose membrane. We started with the recommended time and voltage suggested by the Bio-Rad's Mini-Trans-Blot owner's manual (1 hour at 100v constant) at 4°C. To access the transfer efficiency, we stained the membrane with Ponceau S after transfer and we verified that the transfer time was insufficient because the membrane was poorly stained with Ponceau S. When we tried 3 hours of transfer, the result was acceptable. In these last experiments, we used two membranes of nitrocellulose together, to verify if the proteins were trespassing the membrane and being lost.

Once the time of transfer was determined, we started the tests with the dilutions of primary antibody. We followed the blocking buffer recipe as suggested by Cell Signaling Technologies protocols. The blocking time suggested was 1 hour at RT. In these tests, we made the revelations in a dark room with X-ray films, and the time of exposition was variable. The secondary antibody dilution was used as suggested by Bio-Rad (1:3000). The initial test was made for β -actin antibody in the dilutions of 1:1000, 1:5000 and 1:10000.

As we can see in figure 1, the test revealed a few problems. First, there was a lot of background, the antibodies had unspecific bindings, the secondary antibody precipitated (black dots), the entire lanes were marked

and the exposition time was excessive. Analyzing this result, we extended the blocking time to 1.5 hours and increased dilution of antibodies: primary antibody to 1:10000 and the secondary antibody to 1:6000 and 1:9000. The exposition was reduced too. As we can see in figure 2, the unspecific binding was reduced, there were no black dots and the exposition time was improved. But this isn't an ideal result, so we tested another concentration for primary (1:10000 and 1:15000) and secondary (1:20000) antibodies. In figure 3, we can see that the western blot worked fine for β -actin, with no unspecific binding or background and no black dots. So, we defined that the ideal β -actin dilution was 1:15000 and the secondary antibody dilution was 1:20000.

After the β -actin, we tested the antibody for total PTEN. We used the recommended dilution (1:1000) and other three dilutions (1:3000, 1:5000 and 1:10000). The secondary antibody was used at dilution of 1:20000 (figure 4a). The signal was ideal in the dilution of 1:1000, as confirmed in the second test, when we tried 1:1000, 1:2000 and 1:3000 dilutions (figure 4b) and in the third test, when we tried 1:1000 and 1:2000 dilutions (figure 5b). The time of exposition needed for optimal results was 10 minutes.

The last antibody to define the ideal dilution was phospho-PTEN. The concentrations tested were the recommended (1:1000) and other four dilutions (1:2000, 1:3000, 1:5000 and 1:10000) (figure 5a). The phospho-PTEN antibody normally gives an unspecific band at approximately 47 kDa, but since this doesn't interfere in our experiment, we disregarded this fact. So, the ideal dilution defined for phospho-PTEN was 1:10000, as confirmed in the second test, when we tried 1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:20000 and 1:25000 (figure 5b). The time of exposition needed for optimal results was 10 minutes. Once established the best conditions for the immunodetection of PTEN, we decided to determine the dose-response curve for VPA.

Dose-response curve of VPA

We verified the effect of different concentrations of VPA in the cell viability by MTT assay. The doses evaluated were 50, 80, 100, 120, 300 and 1000 μ g/mL and the time of treatment was 24 hours. The dose 50 μ g/mL is

below the therapeutic dose and the 300 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ are above (Allen et al., 2006). In the figure 6, we can see that the cell viability wasn't affected by any concentration of VPA tested. So, we chose the dose 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to conduct our experiment, since it is in the middle of the therapeutical range of VPA and didn't reduce the cell viability.

PTEN activity assay

After the establishment of the western blot and the cell viability experiments, we assessed the effect of VPA on the activity of PTEN. The densitometry analysis showed that the VPA at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced inhibition of PTEN activity ($p=0.043$) (figure 7b).

4. Discussion

Western blot is a very reliable and precise technique, and it was used to analyze proteins for decades. In this study, our main objective was to standardize an efficient method for evaluation of the activity of PTEN, a phosphoprotein responsible for the modulation of the PI3k/Akt pathway, in differentiated SH-SY5Y cells. PTEN has three residues that regulate its stability and activity, when phosphorylated at Ser-380, Thr-382 and Thr-383 a conformational change leads to its inactivation and increases the PIP3 pool in the cell membrane, allowing the activation of Akt and inactivation of GSK-3 β . Given the importance of these three residues on the activity of PTEN, we are able to deduce its activity by the total PTEN/phospho-PTEN ratio. GSK-3 β and Akt are implicated in the pathophysiology of BD, and the main drugs used in the treatment of BD are able to modulate their activities. VPA is one example, but its mechanism of action remains unknown.

We tested different settings in every step of western blot to find the ideal conditions for our purposes and we concluded that we should load 20 μg of protein in each well, run the electrophoresis in 50 minutes, transfer for 3 hours and block the membrane for 1.5 hours. The optimal dilutions of the antibodies were 1:1000 for PTEN, 1:10000 for phospho-PTEN, 1:15000 for β -actin and 1:20000 for secondary antibody. This protocol allowed us to have a reliable way of evaluation of PTEN activity.

We also determined a dose-response curve with different concentrations of VPA on SH-SY5Y cells differentiated in dopaminergic neurons. As start point, we searched in the literature for the therapeutic range of VPA for mania treatment. VPA is one of the main drugs used in BD and is very useful in the manic episodes, but is not so efficient for depressive episodes (Chiu et al., 2013). The range suggested was between 80-120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for mania. For this reason, we treated the cells with 80, 100 and 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of VPA. To extend the range of our results, we included a dose below (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and two above (300 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to evaluate the effects. Our results showed that any doses tested affected the cellular viability. To our further experiments, we selected the 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose,

because it is an intermediary value in the therapeutic range of VPA and because it didn't reduce the cell viability.

Our last finding is that PTEN was inhibited by the treatment with 100 $\mu\text{g/mL}$ of VPA compared to control ($p=0.043$). This could explain, at least in part, how VPA acts to increase the activity of Akt and decrease the activity of GSK-3 β *in vivo*, since the concentration used was in the therapeutic range. Furthermore, this finding could make PTEN a new target for drug development for BD.

In summary, in this study we standardize a technique to evaluate PTEN activity in SH-SY5Y cells differentiated in dopaminergic neurons. Additionally, we found that VPA, one of the main drugs used in BD, induced a reduction of PTEN activity at the therapeutic concentration (100 $\mu\text{g/mL}$).

The authors would like to thank Professor Fábio Klamt for the support and the materials and reagents shared.

5. References

Martinez-Aran A et al.. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar Disord*. 2007 Feb-Mar;9(1-2):103-13.

Rosa AR, et al.. Functional impairment and disability across mood states in bipolar disorder. *Value Health*. 2010 Dec;13(8):984-8

Hajek T, et al.. Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder. *Bipolar disorders*, 2005; 7:393-403.

Strakowski SM, et al.. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Molecular Psychiatry*, 2005; 10:105-116.

Cunha AB, et al.. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci lett*. 2006; 398(3):215-9.

Tramontina JF, et al.. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment of acute mania. *Neurosci lett*. 2009; 452:111-113.

Wymann MP, et al.. Phosphoinositide 3-kinase signaling - which way to target? *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24:366–376

Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*. 2004; 15:177–182

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296:1655–1657.

Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem*. 2001; Sep;78(6):1219-32.

Polter A, et al.. Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology*, 2010; Jul;35(8):1761-74.

Song MS, et al.. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 2012; 13, 283-296.

Das S, et al.. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7491-6.

Lopes FM, et al.. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res*. 2010 Jun 14;1337:85-94.

Chiu CT, et al.. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev*. 2013 Jan 8;65(1):105-42.

Figure Legends

Fig. 1. X-ray film showing β -actin. The primary antibody was in dilutions of 1:1000, 1:5000 and 1:10000. The dilution of secondary antibody was 1:3000. The time of exposition was 20 minutes and the time of blocking was 1 hour.

Fig. 2. X-ray film showing β -actin. The primary antibody was in dilution of 1:10000. The dilution of secondary antibody was in dilutions of 1:6000 and 1:9000. The time of exposition was 1 minute and the time of blocking was 1.5 hours.

Fig. 3. X-ray film showing β -actin. The primary antibody was in dilutions of 1:10000 and 1:15000. The dilution of secondary antibody was 1:20000. The time of exposition was 1 minute and the time of blocking was 1.5 hours.

Fig. 4. X-ray film showing PTEN. The primary antibody was in dilutions of 1:1000, 1:3000, 1:5000 and 1:10000. The dilution of secondary antibody was 1:20000 (a). In the second test, we tried the dilutions of 1:1000, 1:2000 and 1:3000. The dilution of secondary antibody was 1:20000 (b). The time of exposition in these tests was 10 minutes.

Fig. 5. X-ray film showing phospho-PTEN. The primary antibody was in dilutions of 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000 and 1:10000. The dilution of secondary antibody was 1:20000 (a). In the second test, we tried the dilutions of 1:5000, 1:10000, 1:15000, 1:20000 and 1:25000. The dilution of the secondary antibody was 1:20000 (b). The time of exposition in these tests was 10 minutes.

Fig. 6. MTT assay showing the cell viability of untreated cells (CTRL) and cells treated with 50, 80, 100, 120, 300 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of VPA after 24 hours (Friedman's test; $n=4$; $p=0.260$).

Fig. 7. Illustrative western blot for total PTEN, phospho-PTEN and β -actin in untreated cells (CTRL) and cells treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of VPA for 24 hours

(a). Activity of PTEN in untreated cells (CTRL) and cells treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of VPA for 24 hours (Wilcoxon test; $n=5$, $p=0.043$) (b).

Figure 1.

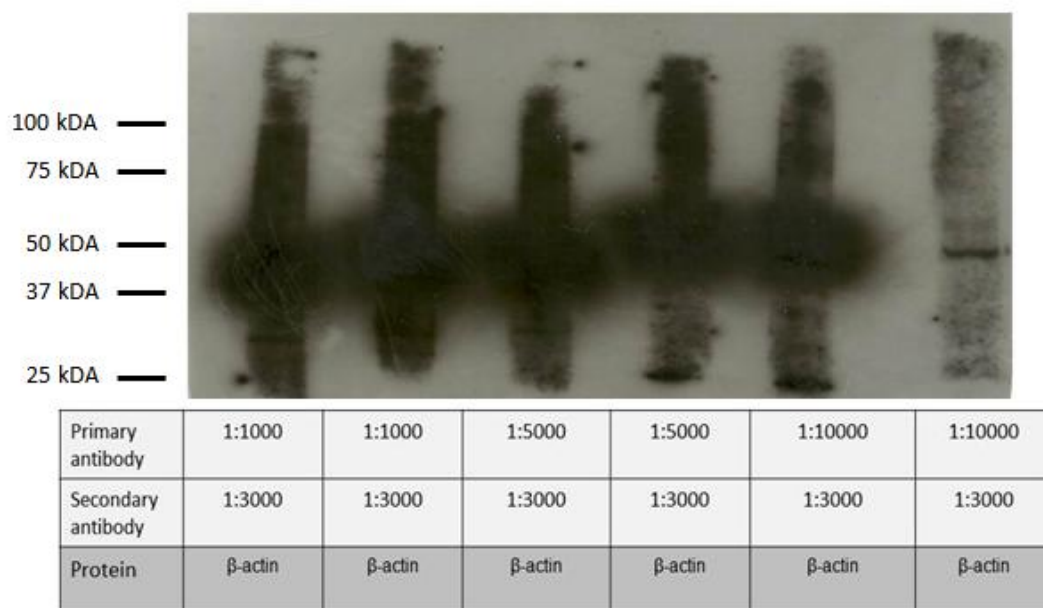


Figure 2.

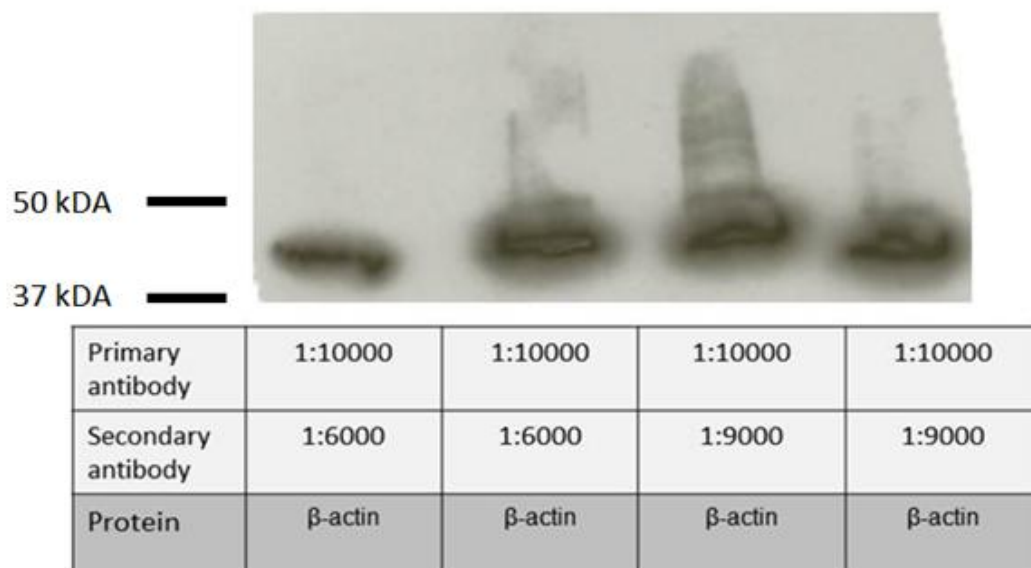


Figure 5.

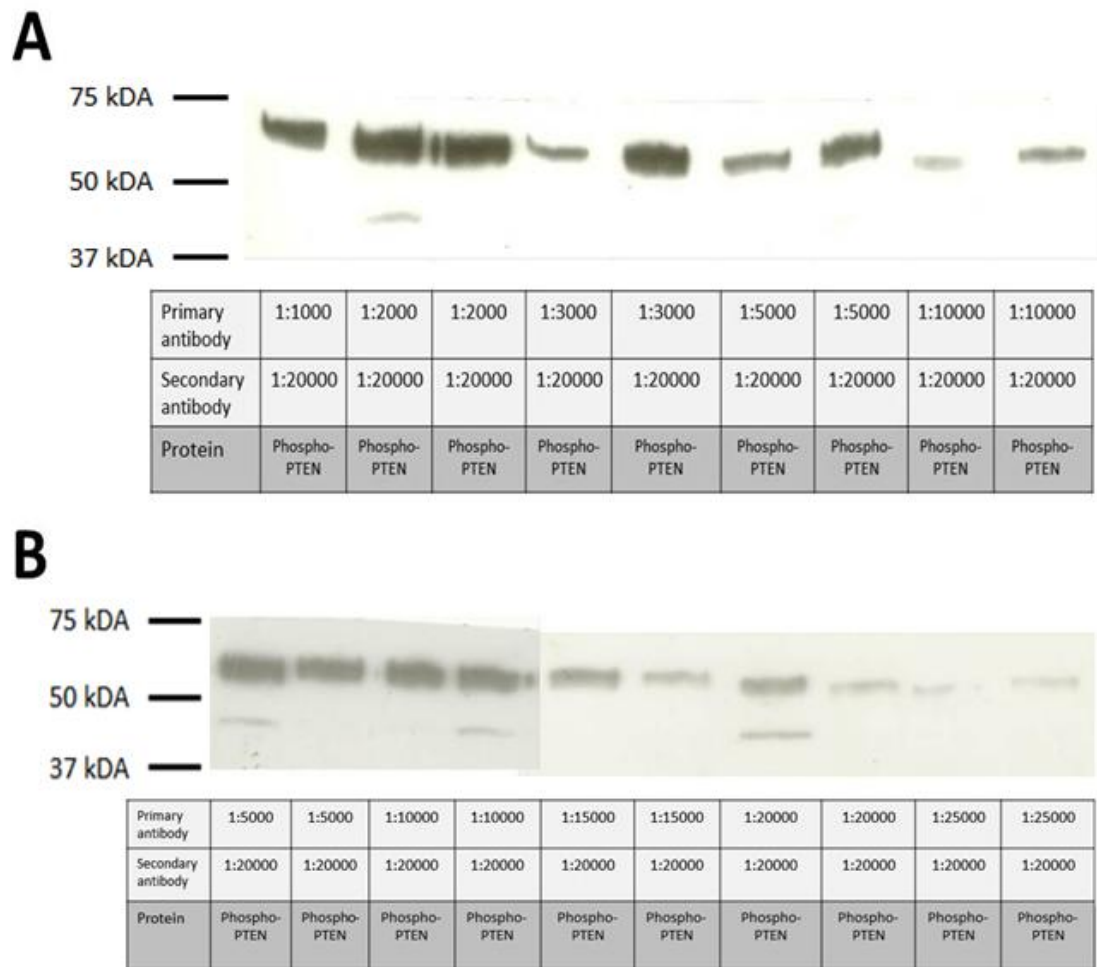


Figure 6.

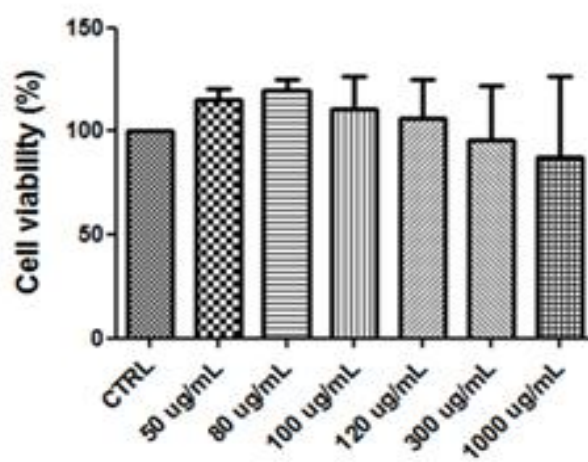
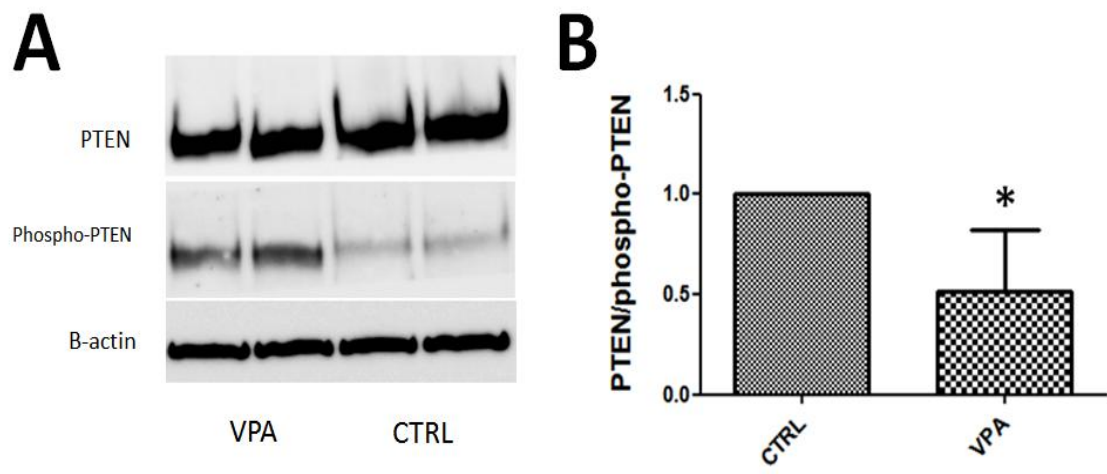


Figure 7.



6. Conclusão

Neste trabalho, conseguimos padronizar a técnica de Western blot com sucesso. Esta técnica ampliará os recursos metodológicos disponíveis no Laboratório de Psiquiatria Molecular e também será fundamental para a continuidade deste estudo.

Também conseguimos avaliar que as doses utilizadas de VPA não reduziram a viabilidade celular. Assim, foi definida uma dose ideal para futuros experimentos com VPA e células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos.

O último resultado obtido neste trabalho mostra que o VPA, quando administrado na dose de 100 µg/mL, é capaz de inibir a atividade da PTEN quando comparado ao controle ($p=0,043$). Este resultado vai de acordo com nossa hipótese e pode explicar, ao menos em parte, como o VPA leva a ativação da Akt e inibição da GSK-3 β , duas proteínas altamente relacionadas ao THB. Além disso, este resultado amplia nossos conhecimentos sobre o mecanismo de ação do VPA e faz da PTEN um candidato a novo alvo farmacológico para o THB.

7. Perspectivas

Baseado em nossos resultados, pretendemos dar continuidade ao estudo do papel da PTEN nos efeitos do VPA. Para isso, iremos avaliar mais detalhadamente como o VPA induz a inibição na PTEN e as vias de sinalização celular que podem ser afetadas por esta alteração de atividade. Assim, daremos início ao estudo dos efeitos da inibição da PTEN sobre as atividades da GSK-3 β e Akt utilizando a técnica de western blot.

Também iniciamos estudos para avaliar se esta inibição ocorre quando as células são submetidas a insulto com 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A 6-OHDA é uma neurotoxina similar à dopamina com alta afinidade por transportadores dopaminérgicos. Uma vez dentro da célula, a 6-OHDA se acumula no citosol, sofre uma auto-oxidação não enzimática promovendo a formação de radicais livres (Bladini et al., 2008). Essa neurotoxina também inibe a atividade do complexo I mitocondrial devido ao aumento na geração de espécies reativas (Lehmensiek et al., 2006; Inden et al., 2006; Chin et al., 2008). Estudos recentes sugerem a existência de uma disfunção dopaminérgica nos pacientes com THB, propondo que uma neurotransmissão excessiva de dopamina estaria envolvida no desenvolvimento dos sintomas maníacos (Kapczinski et al., 2008). Com base nestas evidências, e com o objetivo de mimetizar na cultura celular o insulto que o paciente com THB apresenta a cada episódio de humor, tem se utilizado o tratamento com 6-OHDA como modelo celular. Assim, estamos realizando experimentos com células tratadas com 6-OHDA e co-tratadas com VPA e 6-OHDA para verificar como o VPA atuaria modulando a atividade da PTEN durante o insulto.

Além disso, está em andamento um projeto com o objetivo de analisar a PTEN em linfócitos de pacientes com THB, visando observar se existe alguma alteração na atividade basal desta enzima.

Por fim, também há interesse em saber se outros fármacos, como o lítio, também agem na via da PI3K/Akt através da PTEN, a fim de definir se este mecanismo é exclusivo do VPA.

8. Referências Adicionais

Allen MH, Hirschfeld RM, Wozniak PJ, Baker JD, Bowden CL. 2006. Linear relationship of valproate serum concentration to response and optimal serum levels for acute mania. *Am J Psychiatry*; 163(2):272-5.

Bladini, F., Armentero, M.T., Martignoni, E. 2008. The 6-hydro-xydopamine model: news from the past. *Parkinsonism. Relat Disord*; 14: 124–129.

Carrard A, Salzmann A, Perroud N, Gafner J, Malafosse A, Karege F. 2011. Genetic association of the Phosphoinositide-3 kinase in schizophrenia and bipolar disorder and interaction with a BDNF gene polymorphism. *Brain Behav*; 1(2): 119–124.

Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK. 1999. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem*; 72(3):1327-30.

Chin MH, Qian WJ, Wang H, Petryuk VA, Bloom JS, Sforza DM, Lacán G, Liu D, Khan AH, Cantor RM, Bigelow DJ, Melega WP, Camp 2nd DG, Smith RD, Smith DJ. 2008. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis revealed by proteomic and transcriptomic analyses of the striata in two mouse models of Parkinson's disease. *J. Proteome Res*; 7: 666–677.

De Sarno P, Li X, Jope RS. 2002. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology*; 43(7):1158-64.

Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. 2006. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences*, 79(3), 281-286.

Gericke A, Munson M, Ross AH. 2006. Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene*;374:1-9

Goodwin FK, Jamison, KR. Manic-Depressive Illness. 1990. New York: Oxford University Press.

Inden M, Taira T, Kitamura Y, Yanagida T, Tsuchiya D, Takata K, Yanagisawa D, Nishimura K, Taniguchi T, Kiso Y, Yoshimoto K, Agatsuma T, Koide-Yoshida S, Iguchi-Arigo SM, Shimohama S, Ariga H. 2006. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol Dis*; 24: 144–158.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina TV, Takao K, van Eede M, Hattori S, Laliberte C, Khan M, Okamoto K, Chambers JW, Fletcher PJ, MacAulay K, Doble BW, Henkelman M, Miyakawa T, Roder J, Woodgett JR. 2009. Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice. *Mol Brain* 2: 35.

Kapczinski F, Anna MKS, Malhi GS, Dodd S, Berk M. 2008. Dopamine and bipolar disorder –reply. *Acta Psychiatrica Scandinavica*.;117:398–9.

Kaplan, H.; Sadock, B. 1997. Compendio de Psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica. Porto Alegre: Artes Médicas.

Kurien BT, Scofield RH. 2006. Western blotting. *Methods*;38(4):283-93.

Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, Li Y, Baker SJ, Parada LF. 2006. Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron*. 4;50(3):377-88.

Lehmensiek V, Tan EM, Liebau S, Lenk T, Zettlmeisl H, Schwarz J, Storch A. 2006. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of 6-hydroxydopamine in vitro depends on expression of mutant α -synucleins related to Parkinson's disease. *Neurochem Int*; 48: 329–340.

Lopes FM, Londero GF, de Medeiros LM, da Motta LL, Behr GA, de Oliveira VA, Ibrahim M, Moreira JC, de Oliveira Porciúncula L, da Rocha JB, Klamt F. 2012. Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. *Neurotox Res*; 22(2):138-49.

Lopez AD, Murray CC - The global burden of disease, 1990-2020. 1998. *Nat Med*. 4(11):1241-3.

Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. 2003. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1):70-5.

Vieta E, Martínez-De-Osaba MJ, Colon F, Martínez-Arán A, Benabarre A, Gastó C. 1999. Enhanced corticotropin response to corticotropin-releasing hormone as a predictor of mania in euthymic bipolar patients. *Psychol Med*.;29(4):971-8.

Xie HR, Hu LS, Li GY. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*. 20;123(8):1086-92.

Zhou R, Yuan P, Wang Y, Hunsberger JG, Elkahloun A, Wei Y, Damschroder-Williams P, Du J, Chen G, Manji HK. 2009. Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers. *Neuropsychopharmacology*; 34(6):1395-405.

Mahmood T, Yang P. 2012. Western blot: technique, theory and troubleshooting. *N Am J Med Sci*. Sep 2012; 4(9): 429–434.

Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. 2000. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(14):5010-8.