MARINA MINTO CARARO

**SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO E MODULAÇÃO DA
NA⁺,K⁺-ATPASE EM CAMUNDONGOS HIPOMÓRFICOS PARA *KLOTHO*: EFEITOS
EM HIPOCAMPO E CEREBELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

MARINA MINTO CARARO

**SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO E MODULAÇÃO DA
NA⁺,K⁺-ATPASE EM CAMUNDONGOS HIPOMÓRFICOS PARA *KLOTHO*: EFEITOS
EM HIPOCAMPO E CEREBELO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço
de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Minto Cararo, Marina

Sinalização via receptor N-Metil-D-Aspartato e
modulação da Na^+, K^+ -ATPase em camundongos
hipomórficos para klotho: efeitos em hipocampo e
cerebelo / Marina Minto Cararo; orientadora Elisa
Mitiko Kawamoto. -- São Paulo, 2016.
75 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Klotho. 2. receptor NMDA. 3. Óxido Nítrico
Sintase. 4. Na, K -ATPase. 5. Envelhecimento. I.
Kawamoto, Elisa Mitiko, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marina Minto Cararo

Título da Dissertação: Sinalização via receptor N-Metil-D-Aspartato e modulação da $NA^+,K^+-ATPase$ em camundongos hipomórficos para *klotho*: efeitos em hipocampo e cerebelo

Orientador(a): Profª Dra Elisa Mitiko Kawamoto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da

Dissertação de Mestrado,

em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **79** nas fls. **21** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Cristoforo Scavone**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Modulação da enzima Na⁺, K⁺ - ATPase pela via do óxido nítrico e GMP cíclico no Sistema Nervoso Central de camundongos nocaute para a proteína Klotho*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marina Minto Cararo, Caio Mazucanti** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **17.10.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 20 de outubro de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TÁVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus orientadores, cuja participação na minha formação foi muito além da acadêmica; aos meus pais que sempre me incentivaram a fazer o que amo, e não pouparam esforços para que eu encontrasse e seguisse meu próprio caminho; ao meu marido e companheiro, que transbordou apoio e compreensão durante todo processo, e por fim à minha avó, que foi também minha primeira aluna e parceira de experiências.

Muito Obrigada

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof^a Dra Elisa Mitiko Kawamoto e Prof. Dr. Cristoforo Scavone, pela confiança e apoio durante toda trajetória.

Aos colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular e do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional, por propiciarem um ambiente de trabalho agradável, acolhedor, e ao mesmo tempo desafiador.

Ao meu marido, Eduardo Lopes, pelas discussões produtivas e conselhos científicos sempre enriquecedores.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2014/14199-6) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

RESUMO

CARARO, M. M. **Sinalização via receptor N-Metil-D-Aspartato e modulação da Na^+, K^+ -ATPase em camundongos hipomórficos para *klotho***: efeitos em hipocampo e cerebelo. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Alterações na via do receptor N-metil-D-aspartato(NMDAR) marcam o processo de envelhecimento bem como as doenças neurodegenerativas. Um dos efeitos da via do NMDAR é a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e a produção GMP cíclico (GMPc), resultando em diversos efeitos celulares dentre eles a modulação da Na^+, K^+ -ATPase, a qual também tem sua função alterada durante o envelhecimento e doenças neurodegenerativas. A proteína α Klotho tem função anti-envelhecimento, e os animais com alelo hipomórfico para *klotho* ($kl^{-/-}$) apresentam uma síndrome de envelhecimento precoce, caracterizada por danos periféricos e no Sistema Nervoso Central (SNC). Logo, camundongos $kl^{-/-}$ são considerados um modelo de envelhecimento acelerado podendo fornecer informações importantes quanto aos mecanismos de danos no SNC em vigência de baixa expressão de α Klotho, alteração detectada durante o envelhecimento normal e em diversas doenças neuropsiquiátricas. Tendo esses elementos em vista o objetivo deste trabalho é verificar alterações na função da Na^+, K^+ -ATPase e nas vias de sinalização associadas ao glutamato (NMDAR-NOS-GMPc), com a finalidade de verificar se nesse modelo de envelhecimento envolvendo os camundongos $kl^{-/-}$ essas vias estão modificadas. Os dados obtidos apontam para um aumento da fosforilação do NMDAR a qual é refletida no aumento de atividade da NOS em hipocampo, mas não nos níveis de GMPc, que se encontram reduzidos. Já em cerebelo um padrão diferente é observado, mostrando uma redução na fosforilação do NMDAR e na NOS, sem alterações nos níveis de GMPc. Ambas as alterações são acompanhadas por diferenças da expressão das subunidades GluN2, reforçando a importância da composição do receptor NMDA para sua atividade. Além disso observamos uma redução na atividade da α_2/α_3 - Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo, e alterações na expressão das subunidades α_2 e α_3 em hipocampo e de α_2 cerebelo. Tais observações reforçam a participação destas vias em processos neurodegenerativos associados ao envelhecimento e a relevância do modelo $kl^{-/-}$ para estudo de alterações no SNC.

Palavras-chave: α Klotho. Receptor NMDA. Óxido Nítrico Sintase. Na, K -ATPase. Envelhecimento.

ABSTRACT

CARARO, M. M. **N-Methyl-D-Aspartate receptor signaling and modulation of Na⁺,K⁺-ATPase in *klotho* hypomorphic mice:** effects in hippocampus and cerebellum. 2016. 75 p. Master's thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Alterations in N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR) signaling are typical features of aging process and neurodegenerative diseases. Nitric oxide synthase (NOS) activation and cyclic GMP (cGMP) generation are key events following NMDAR activation, resulting in several cellular effects, including modulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity, which is also altered during aging and neurodegenerative diseases. αKlotho protein has anti-aging function, and mice carrying hypomorph allele for *klotho* gene (*kl^{-/-}*) display a syndrome resembling aging characterized by systemic and central nervous system (CNS) damage. Therefore, *kl^{-/-}* mice are considered an accelerated aging model, and enable understanding about important damage mechanisms in CNS due to low αKlotho expression, which it is known to happen during regular aging process and in many neuropsychiatry conditions. The aim of the present work is to verify whether alterations in Na⁺,K⁺-ATPase function and in NMDAR related signaling pathways (NMDAR-NOS-cGMP) occur in the virtual absence of αKlotho protein. We intend to check the putative changes in these pathways in *kl^{-/-}* mice CNS. Present data point for an increase in NMDAR phosphorylation, reflected in a greater NOS activity, but not in cGMP levels, which in turn, are reduced. Otherwise, in cerebellum, a different situation was observed, with a decrease in NMDAR phosphorylation and NOS activity, with no changes in cGMP levels. In both situations, the alterations are followed by changes in GluN2 subunit expression, reinforcing the relevance of NMDAR composition for its functioning. Furthermore, we saw a reduction in α₂/α₃-Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebellum, and alterations in α₂ and α₃ catalytic subunits in hippocampus and in cerebellar α₂. These observations agree with these pathways participation in age related neurodegenerative process, and point out *kl^{-/-}* mice as a relevant model to study CNS damage.

Keywords: αKlotho. NMDA receptor. Nitric Oxide Synthase. Na,K-ATPase. Aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Sinalização via NMDAR e modulação da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	19
Quadro 1- Alterações no NMDAR em condições patológicas e no envelhecimento.....	21
Figura 2- Formas da αKlotho.....	28
Figura 3- Genotipagem gene <i>klotho</i>	33
Quadro 2- Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting.....	35
Figura 4- Detecção de GluN1 e pGluN1 por Western Blotting em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	40
Figura 5- Detecção das subunidades GluN2A e GluN2B por Western Blotting em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	41
Figura 6- Detecção de GluN1 e pGluN1 por Western Blotting cerebelo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	42
Figura 7- Detecção das subunidades GluN2A e GluN2B por Western Blotting em cerebelo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	42
Figura 8- Detecção de AMPAR e pAMPA por Western Blotting em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	43
Figura 9- Atividade e expressão da NOS em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	44
Figura 10- Atividade da NOS em cerebelo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	45
Figura 11- Detecção dos níveis de GMPc por ELISA em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i>	46
Figura 12- Detecção dos níveis de GMPc por ELISA em cerebelo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i>	47
Figura 13- Detecção de GFAP, EAAT1 e EAAT2 por Western Blotting em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	48
Figura 14- Detecção de GFAP, EAAT1, EAAT3 e EAAT4 por Western Blotting em	

cerebelo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	48
Figura 15- Atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	49
Figura 16- Detecção das subunidades α da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase por Western Blotting em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i>	50
Figura 17- Atividade da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase em cerebelo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i> de 8 semanas.....	51
Figura 18- Detecção das subunidades α da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase por Western Blotting em hipocampo de camundongos <i>kl^{+/+}</i> e <i>kl^{-/-}</i>	52
Figura 19- Alterações na via NMDAR-NOS-GMPc em hipocampo de camundongos <i>kl^{-/-}</i>	56
Figura 20- Alterações na via NMDAR-NOS-GMPc em cerebelo de camundongos <i>kl^{-/-}</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

abs: Absorbância	Acético
AMPA: Receptor α -Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico	EGTA: Ácido Etilenoglicol Tetra-Acético
ANOVA: Análise de Variância	ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica
APP: Proteína Precursora de Amilóide	ERK: Quinase Regulada por Sinais Extracelulares
hAPP: Proteína Precursora de Amilóide Humana	EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
ATP: Trifosfato de Adenosina	FAD: Dinucleotídeo Flavina-Adenina
BAX: proteína X associada ao BCL-2	FGF: Fator de Crescimento de Fibroblasto
BCL-2: proteína célula B de linfoma 2	FNM: Mononucleotídeo de Flavina
BCL-XL: proteína célula B de linfoma XL	g: Gramas
BDNF: fator de crescimento neuronal derivado de cérebro	GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida
BSA: albumina de soro bovino	Gly: Glicina
CaMKII: Quinase dependente de Ca^{+2} /Calmodulina tipo II	GMPC: Monofosfato de Guanosina Cíclico
CO: óxido carbônico	HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
CREB: proteína ligante aos elementos responsivos ao AMPc	IGF-1: Fator de Crescimento Similar à Insulina
DA: doença de Alzheimer	L: Litro
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	L-NAME: L-NG-Nitroarginina Metil Éster
DTT: ditioneitol	L-NMMA: L-NG-monometil Arginina Acetato
EAAT: Transportador de aminoácidos excitatórios	LPS: Lipopolissacarídeo de Membrana
EDTA: Ácido Etilendiamino Tetra-	

de Bactéria Gram-negativa

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

mg: Miligrama

min: minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

NADPH: Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina

NFκB: Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

nm: nanômetro

nM: Nanomolar

NMDA: N-Metil-D-Aspartado

NMDAR: Receptor N-Metil-D-Aspartado

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

NOS_e: Óxido Nítrico Sintase Endotelial

NOS_i: Óxido Nítrico Sintase Induzível

NOS_n: Óxido Nítrico Sintase Neuronal

NOX: NADPH oxidase

pbs: Pares de Bases

PBS: Solução fosfato salina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PKA: Proteína Quinase A

PKC: Proteína Quinase C

PKG: Proteína Quinase dependente de GMPc

PP: Proteína Fosfatase

PP-1: Proteína Fosfatase 1

RNA_m: Ácido Ribonucleico Mensageiro

SDS- Dodecil Sulfato

Ser: Serina

SNC: sistema nervoso central

SOD: Superóxido Dismutase

Src- Proteína Tirosina Quinase

TBS – Tampão Tris-salina

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TTBS: Tampão TBS com Tween

UA: unidades arbitrárias

μg: Micrograma

μL: Microlitro

μM: Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 A sinalização via NMDAR.....	17
1.2 A enzima Na⁺,K⁺-ATPase.....	23
1.3 Sinalização via NMDAR e a regulação da Na⁺,K⁺-ATPase durante o envelhecimento.....	25
1.4 Sinalização anti-envelhecimento: a importância da proteína αKlotho.....	27
1.5 Objetivos.....	30
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
2.1 Modelo de Estudo.....	31
<i>2.1.1 Genotipagem dos camundongos.....</i>	<i>32</i>
2.2 Western Blotting.....	33
<i>2.2.1 Extrato citosólico.....</i>	<i>33</i>
<i>2.2.2 Determinação da concentração de proteínas.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.3 O ensaio de Western Blotting.....</i>	<i>34</i>
2.3 Determinação da atividade enzimática da NOS.....	36
2.4 Detecção de GMPc.....	37
2.5 Determinação da atividade enzimática da Na⁺,K⁺-ATPase.....	38
2.6 Análise dos resultados.....	39
3 RESULTADOS.....	40
3.1. Receptor NMDA: fosforilação e composição.....	40
3.2 Fosforilação do AMPAR em hipocampo.....	43
3.3 NOS: atividade e expressão de NOSn.....	44
3.4 Níveis de GMPc.....	45
3.5 Na⁺,K⁺-ATPase: atividade e expressão.....	47
3.6 Expressão de transportadores de Glutamato e GFAP.....	50
4 DISCUSSÃO.....	53

4.1 Sinalização via NMDAR em hipocampo.....	54
4.2 Atividade e expressão da Na⁺,K⁺-ATPase em hipocampo.....	57
4.3 Sinalização via NMDAR em cerebelo.....	58
4.4 Atividade e expressão da Na⁺,K⁺-ATPase em cerebelo.....	59
4.5 Expressão da subunidade α_2 da Na⁺,K⁺-ATPase.....	60
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A proteína α Klotho tem despertado crescente interesse devido às suas funções anti-envelhecimento inclusive no sistema nervoso central (SNC) (KUROSU et al., 2005). O envelhecimento pode ser definido como a deterioração das funções fisiológicas necessárias para a sobrevivência e reprodução. Essa deterioração é consequência de uma acumulação progressiva de alterações humorais, endócrinas e neurais relacionadas com a idade e que são responsáveis pelo aumento da susceptibilidade para doenças que atingem o organismo (HARMAN, 1992; YU, 1996). A natureza do envelhecimento é objeto de muita especulação, sendo que existem inúmeras evidências que indicam que a soma dos efeitos deletérios induzidos pelos radicais livres nas células e tecidos criam as condições para o seu desencadeamento, ou são os maiores responsáveis pelo processo de senescência (BALABAN et al., 2005; HARMAN, 1981).

Hoje sabe-se que muitos fatores estão relacionados ao processo de envelhecimento, tais como alterações na sinalização inflamatória (FRANCESCHI et al., 2007), estresse ambiental (CHINTA et al., 2013), estresse crônico (SAPOLSKY et al., 1986), mutações gênicas (ARKING et al., 2002), alterações no processo de síntese e degradação proteica e alterações metabólicas (TAYLOR; DILLIN, 2011). Portanto, sendo o envelhecimento um processo multifatorial, se torna difícil estabelecer uma relação de causa e consequência entre todos esses fatores, e como eles se relacionam com as doenças típicas de indivíduos idosos. Em vista disso, há um grande interesse em compreender as alterações bioquímicas que ocasionam patologias relacionadas ao envelhecimento, e sendo as doenças neurodegenerativas e demências um dos problemas que mais acometem idosos e que ocasionam uma enorme diminuição na qualidade de vida (AGÜERO-TORRES et al., 1998), é de suma importância a caracterização desses fenômenos no SNC.

Uma das vias que frequentemente está alterada em processos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos associados ao envelhecimento, é a sinalização do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) (revisado em MATTSON, 2008)(Quadro 1), que dentre inúmeros efeitos modula a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Figura 1), ponto importante na manutenção do funcionamento adequado do SNC e também para respostas adaptativas frente a estímulos estressores.

1.1 A sinalização via NMDAR

O glutamato tem função de neurotransmissor excitatório, podendo agir em receptores metabotrópicos ou ionotrópicos, que podem ser do tipo AMPAR (Receptor α -Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico), cainato, e NMDAR. Os diferentes receptores, medeiam as ações deste transmissor no SNC que vão desde a participação na sinaptogênese, crescimento de neuritos, neurogênese, sobrevivência neuronal e apoptose (revisado em MATTSON, 2008). O NMDAR, permeável é aos íons Ca^{2+} e Na^+ , sendo constituído por duas subunidades GluN1, e duas GluN2 (que podem ser GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D) ou GluN3, podendo formar di-heterodímeros ou tri-heterodímeros. Cada subunidade é composta por: um domínio N-terminal, com sítio de ligação para moduladores alostéricos, como o Zn^{+2} , um domínio de ligação de agonista (glicina/serina em GluN1 e glutamato em GluN2) e um domínio C-terminal que interage com mediadores da sinalização intracelular (Figura 1) (revisado em TRAYNELIS et al., 2010).

Além da presença de agonista, para que haja ativação dos NMDARs, é necessária a ocorrência de despolarização, eliminando o bloqueio dependente de voltagem ocasionado pelo Mg^{2+} (revisado em RAO ; FINKBEINER, 2007). Com a ativação dos NMDAR, vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} são estimuladas culminando na fosforilação de fatores de transcrição, como CREB (proteína ligante aos elementos

responsivos ao AMPc) e NF κ B (fator de transcrição nuclear kappa B), e modulação da expressão gênica (revisado em RAO; FINKBEINER, 2007) (Figura 1), pontos essenciais para ocorrência de fenômenos relacionados à plasticidade sináptica

Um dos pontos centrais da via do NMDAR é a produção de óxido nítrico (NO), cuja síntese é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) a partir da conversão de L-arginina para L-citrulina (revisado em MUNGRUE; BREDT, 2004; NATHAN, 1992). Ocorrem isoenzimas do tipo constitutiva, compreendendo as NOS endotelial (NOS_e) e neuronal (NOS_n), ativadas pela via Ca²⁺-calmodulina e também há a NOS induzível (NOS_i), ativada por condições inflamatórias e de estresse celular. Portanto o influxo de Ca²⁺ na célula por ativação de NMDARs leva a ativação da NOS_n, aumentando a produção de NO. Apesar de ser um radical livre, o NO apresenta relativamente pequena reatividade, o que lhe confere uma imprescindível função na sinalização celular participando vários processos como a vasodilatação e a plasticidade neuronal (revisado em CALABRESE et al., 2007; DOMEK-ŁOPACINSKA; STROSZNAJDER, 2010). Tais efeitos se devem a interação com o grupo heme da guanilato ciclase solúvel (GCs, levando a sua ativação e consequentemente a produção de GMPc (monofosfato de guanosina cíclico), um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), levando ao relaxamento muscular, e estímulo da neurosecreção, neurotransmissão e plasticidade sináptica (MCKEE et al., 1994) (Figura 1). O NO também regula a AKT (quinase específica de serina/treonina) e o CREB, duas vias que promovem sobrevivência celular e neuroproteção (revisado em CALABRESE et al., 2007).

Contudo, apesar de sua importância fisiológica, um aumento exacerbado na produção de NO pode propiciar a sua reação com outros radicais livres provocando a nitração de proteínas, peroxidação lipídica, e danos oxidativos no DNA (Figura 1) (BROWN, 2010).

Figura 1- Sinalização via NMDAR e modulação da Na^+, K^+ -ATPase

A ativação do NMDAR promove a modulação de diversas vias de sinalização intracelulares através do influxo de Ca^{2+} culminando na ativação de fatores de transcrição como o CREB. Outro efeito é produção de NO, que em situações fisiológicas, aumenta os níveis de GMPC estimulando a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Já em situações de aumento da produção de EROS, a geração de produtos reativos como o peroxinitrito (ONOO^-) pode reduzir a atividade enzimática da Na^+, K^+ -ATPase.

Outro produto da ativação dos NMDARs é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs são produzidas em condições normais pelo metabolismo mitocondrial, entretanto na vigência de estímulo da via NMDA, o influxo de Ca^{2+} ocasiona a ativação da NADPH oxidase (NOX), provocando um aumento na geração de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (GIROUARD, 2009; REYNOLDS; HASTINGS, 1995). A produção controlada de $\text{O}_2^{\cdot-}$ é importante na fisiologia celular, entretanto no caso de

um estímulo glutamatérgico excessivo, o aumento desenfreado de $O_2^{\cdot-}$ e NO, propicia a reação destes gerando o peroxinitrito ($ONNO^{\cdot-}$), que se decompõe rapidamente formando o radical livre hidroxila (OH) de alta toxicidade para a célula (BRENNAN et al., 2009; LIPTON et al., 1993; REGO ; OLIVEIRA, 2003).

Além disso, há dados que mostram uma redução nas enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) com a administração de agonistas de NMDARs (SZAROMA et al., 2014). Esse desequilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e a de antioxidantes implica num aumento do estresse oxidativo. Logo, em células suscetíveis, a hiperativação destes receptores gerando influxo contínuo de Ca^{2+} e aumento no estresse oxidativo, pode desencadear excitotoxicidade e morte neuronal, processos presentes em quadros neurodegenerativos (KOH et al., 1990; revisado em MATTSON; MAGNUS, 2006).

Esses múltiplos processos celulares observados com a ativação de NMDARs são modulados basicamente por um único segundo mensageiro, o Ca^{2+} . O que difere nos efeitos funcionais observados depende de fatores espaciais e temporais, os quais determinarão os complexos intracelulares que estarão associados aos receptores NMDA (revisado em HARDINGHAM; BADING, 2010). Nesse caso, um fator determinante no funcionamento do NMDAR são as subunidades que o compõe. As principais subunidades GluN2 presentes no encéfalo adulto são GluN2A e GluN2B. As proporções destas subunidades podem variar ao longo do desenvolvimento: com a maturação das sinapses, ocorre uma inversão na proporção de GluN2A/GluN2B com o aumento da expressão de GluN2A e uma redução de GluN2B (revisado em SANZ-CLEMENTE et al., 2013). Alterações também podem ocorrer durante o envelhecimento e em vigência de quadros neurodegenerativos, promovendo uma sinalização anômala (Quadro 1) (revisado em SANZ-CLEMENTE et al., 2013).

Quadro 1- Alterações no NMDAR em condições patológicas, frente ao uso de drogas de abuso e no envelhecimento.

Condição	Alterações no NMDAR	Referências
Doença de Alzheimer	Redução de GluN2B em superfície celular Ativação patológica de NMDAR extra-sinápticos	SNYDER et al., 2005; RONICKE et al., 2010
Doença de Parkinson	Redistribuição de GluN2B de sítios sinápticos para extra-sinápticos Aumento de GluN2A sináptico	DUNAH et al., 2000
Doença de Huntington	Aumento da atividade de NMDAR extra-sinápticos	GLADDING; RAYMOND, 2011
Isquemia	Aumento da atividade de NMDAR extra-sinápticos	HARDINGHAM; BADING, 2010
Esquizofrenia	Diminuição atividade do NMDAR Tráfego de GluN2A alterado	GASPAR et al., 2009
Abuso de Alcool	Redução GluN2A sináptico (exposição aguda) Aumento nas correntes via NMDAR (tratamento crônico)	SUVARNA et al., 2005 CARPENTER-HYLAND et al., 2004
Abuso de Cocaína	Maior inserção de GluN2A na membrana (exposição aguda)	BORGLAND et al., 2006
Dor Crônica	Redução de NMDARs sinápticos contendo GluN2B	VIKMAN et al., 2008
Envelhecimento	Aumento da associação GluN2B com PSD95; aumento da relação GluN2A/GluN2B (córtex frontal) Redução de GluN2B (córtex frontal; hipocampo)	ZAMZOW et al., 2013 KUEHL-KOVARIK et al., 2000; revisado em MAGNUSSON et al., 2010

Adaptado de Sanz-Clemente et al., 2013.

Mas como as diferentes subunidades GluN2 regulam a sinalização via NMDAR? Sabe-se que a via de entrada do Ca^{2+} na célula é crucial para o desencadeamento da modulação de cascatas intracelulares, deste modo, as proteínas intracelulares acopladas às subunidades GluN1 e GluN2 são um ponto chave para indução da expressão gênica a partir da ativação de NMDARs (BRADLEY et al., 2006). Na densidade pós sináptica, as subunidades GluN2 estão acopladas a PSD95 (densidade pós-sináptica 95), uma proteína de ancoragem que permite a interação do receptor com outras proteínas citoplasmáticas, como a NOSn (Figura 1) (SATTLER et al., 1999). Nesse sentido, os diferentes tipos de GluN2 podem ter efeitos diferentes na modulação da sinalização intracelular, visto que as subunidades do tipo GluN2A e GluN2B tem seqüências distintas nos domínios de interação com as proteínas de ancoramento (COUSINS et al., 2008; COUSINS et al., 2009). Além disso, sabe-se que a interação da subunidade GluN2B com a quinase dependente de Ca^{+2} /calmodulina tipo II (CaMKII) é um fator fundamental para a plasticidade dependente da ativação de ERK (quinase regulada por sinais extracelulares) (GAAMOUCHE et al., 2012). Adicionalmente, as subunidades GluN2A e GluN2B conferem diferenças cinéticas ao NMDAR. Os receptores que contém GluN2A, possuem uma cinética mais rápida, com maior probabilidade de abertura e também uma desativação mais rápida (ERREGER et al., 2005; VICINI et al., 1998).

Outro ponto de modulação da sinalização do receptor NMDA é a fosforilação. A subunidade GluN1, por exemplo, pode ser fosforilada pela proteína quinase C (PKC) nas serinas 890 e 896 ou pela proteína quinase A (PKA) na serina 897, de modo que a fosforilação pela PKC é importante para a aglomeração dos receptores em regiões específicas da membrana, bem como para o aumento da taxa de abertura dos canais de Ca^{+2} . Já a fosforilação pela PKA aumenta a amplitude das correntes pós sinápticas, a permeabilidade ao Ca^{+2} e também apresenta relação com o aumento do tráfego do GluN1 do complexo de Golgi para a membrana (CHEN; ROCHE, 2007; TINGLEY, 1997).

Um importante sistema regulador da sinalização glutamatérgica são proteínas transportadoras de aminoácidos excitatórios (EAATs) que captam o glutamato do meio extracelular, finalizando a sua ação sinalizadora. Existem quatro transportadores dependentes de Na^+ distintos de alta afinidade para glutamato presentes em humanos e murinos: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1) e EAAT4. Os dois primeiros são encontrados em astrócitos; o EAAT3 está presente principalmente em células neuronais, enquanto o EAAT4 é encontrado preferencialmente em células de Purkinje (GEGELASHVILI; SCHOUSBOE, 1997; ROTHSTEIN et al., 1994). Apesar de seu efeito protetor captando o excesso de glutamato do meio, os EAATs podem ter sua função alterada por estímulos nocivos, de modo que as células da glia passam a liberar glutamato por esses transportadores, contribuindo para a ativação dos receptores NMDA extra-sinápticos e piora do quadro excitotóxico (ROTHSTEIN et al., 1996). Nesse quadro o funcionamento adequado da Na^+, K^+ -ATPase é de fundamental importância, uma vez que esta mantém o gradiente de Na^+ , além de estimular o funcionamento dos EAATs via Src quinase. Logo, os EAATs e a Na^+, K^+ -ATPase são parte de um complexo macromolecular operando como uma unidade funcional na regulação da transmissão glutamatérgica (ROSE et al., 2009).

1.2 A enzima Na^+, K^+ -ATPase

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína de membrana, cuja função consiste em restabelecer o gradiente de K^+ (aumento da concentração intracelular) e Na^+ (redução da concentração intracelular), transportando três íons Na^+ para o meio extracelular e dois íons K^+ para o meio intracelular. Essa ação é possibilitada pela utilização da energia proveniente da hidrólise de uma molécula de ATP. O gradiente eletroquímico produzido é indispensável para a manutenção do potencial de membrana de muitas células, permitindo a manutenção da excitabilidade e equilíbrio osmótico celular (GLOOR, 1997). Outros sistemas de transporte ocorrem secundariamente e são

dependentes do estabelecimento do gradiente de Na^+ para ocorrer, como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (SIBAROV et al., 2012).

Além de sua ação enzimática, a Na^+, K^+ -ATPase também tem participação na modulação da sinalização intracelular. Tal ação é mediada por glicosídeos cardíacos endógenos, como a ouabaína, a qual ao interagir diretamente com a proteína leva a ativação de Src (proteína tirosina quinase) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), causando alterações na transcrição gênica e efeitos tróficos significativos (AIZMAN; APERIA 2003; DESFRERE et al., 2009). Inclusive, estudos recentes no nosso laboratório mostraram que a administração intrahipocampal de ouabaína em ratos causa aumento dos níveis de RNAm de *Bdnf* (fator neurotrófico derivado do cérebro), *NOSi* (óxido nítrico sintase induzida), *Tnf* (fator de necrose tumoral) e *Bcl-2* (célula B de linfoma 2), sugerindo uma modulação de genes envolvidos na sinalização inflamatória e das neurotrofinas no SNC. Ainda, a ouabaína ativa o $\text{NF}\kappa\text{B}$ e parte desse efeito está associado com uma interação entre a Na^+, K^+ -ATPase e o NMDAR (KAWAMOTO et al., 2012). Corroborando esses dados, um estudo realizado em cultura de neurônios das células granulares do cerebelo de ratos, evidenciou a participação da cascata NMDAR-Src-Ras-MAPK nesse processo, sugerindo que a ouabaína pode desempenhar uma função importante na modulação de resposta adaptativa associada ao receptor NMDA no SNC (DE SÁ LIMA et al., 2013).

Quanto a estrutura desta enzima, trata-se de uma proteína oligomérica constituída da subunidade catalítica α de aproximadamente 110kDa e subunidades regulatórias β (31,5 kDa) e γ (LINGREL, 1992). A subunidade α é constituída por 10 domínios transmembrana, contendo na porção extracelular os sítios de ligação para Na^+ e glicosídeos cardíacos, enquanto na porção intracelular ocorrem os dois sítios para a ligação dos íons K^+ e um sítio para o ATP (BLANCO et al., 1994). Já a subunidade β é uma glicoproteína com um único segmento transmembrana e um sítio de glicosilação o qual controla a atividade da bomba. Por fim a subunidade γ ou FXD é

um polipeptídeo hidrofóbico que está relacionada com a afinidade de íons Na^+ pela Na^+, K^+ -ATPase e com a redução da afinidade de íons K^+ extracelular, regulando a atividade enzimática e excitabilidade neuronal (GEERING, 2005).

Existem diferentes isoenzimas de Na^+, K^+ -ATPase que podem ser associadas a diferentes funções fisiológicas. A ocorrência dessas isoenzimas está associada a expressão tecido-específica das isoformas da subunidade α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) e β (β_1 , β_2 e β_3) (CHOW; FORTE, 1995; JUHASZOVA; BLAUSTEIN, 1997). No SNC estão presentes as isoformas α_1 , α_2 e α_3 , e ainda é possível encontrar distinção quanto a expressão em diferentes tipos celulares, sendo que as células neuronais constituem a principal origem da isoforma α_3 , as células da glia apresentam preferencialmente a isoforma α_2 (HIEBER et al., 1991; SHULL et al., 1986).

A possibilidade de formar diversos complexos $\alpha\beta$, permite a ocorrência de isoenzima com variações funcionais, inclusive quanto à sensibilidade aos glicosídeos cardíacos (GAO et al., 2002; MOBASHERI, 2000). O tecido nervoso apresenta um padrão bem diversificado das combinações, sendo que uma célula neuronal pode apresentar uma única combinação ou múltiplas isoenzimas com combinações variadas (AZARIAS et al., 2013; MCGRAIL et al., 1991).

1.3 Sinalização via NMDAR e a regulação da Na^+, K^+ -ATPase durante o envelhecimento

Modificações no microambiente celular decorrentes do processo de desenvolvimento ou regulação hormonal podem alterar o padrão de expressão das isoformas da enzima Na^+, K^+ -ATPase, bem como a sua atividade. Entre essas alterações podemos citar a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo, ambos presentes durante o envelhecimento (FRASER; ARIEFF, 2001; MAURYA; PRAKASH, 2013; TANAKA; ANDO, 1990) e em processos patológicos, como por exemplo na Doença de

Alzheimer (Quadro 1), situações caracterizadas por uma diminuição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase (CHAUHAN et al., 1997; MARK et al., 1995).

O excesso de moléculas oxidantes reativas geram uma série de danos celulares como oxidação lipídica e proteica, ocasionando perda da integridade da membrana (BROWN et al., 2010). Portanto, situações que favorecem o estresse oxidativo (como o envelhecimento normal e doenças neurodegenerativas) ou o baixo suprimento energético (por exemplo, situações de hipoperfusão ou isquemia cerebral) prejudicam a função de transportadores de glicose e glutamato, assim como de transportadores iônicos dependentes de ATP (MATTSON,; MAGNUS, 2006; MARK et al., 1995; RAO et al., 2003; REGO; OLIVEIRA, 2003). Deste modo tais quadros aumentam a susceptibilidade neuronal a excitotoxicidade e morte celular, devido ao comprometimento de fatores de proteção, como o funcionamento adequado da bomba de Na^+ , a qual ao reestabelecer o gradiente de Na^+ e K^+ favorece a saída de cálcio via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, contrabalanceando o acúmulo de Ca^{2+} intracelular (BRINES ; ROBBINS 1992; ILLARIONAVA et al., 2014).

Sabe-se que o padrão de fosforilação da subunidade catalítica da Na^+, K^+ -ATPase, modula sua atividade (BERTORELLO et al., 1991). Deste modo, a sinalização glutamatérgica se faz importante, pois ativa a calcineurina promovendo a desfosforilação e ativação da bomba de sódio (MARCAIDA et al., 1996). Além disso, estudos prévios do grupo têm demonstrado a participação da via GMPc -PKG, na modulação da atividade da bomba de sódio pelo glutamato (Figura 1) (MUNHOZ et al., 2005). Inicialmente essa modulação foi descrita em células de Purkinje em cerebelo (NATHANSON et al., 1995). Nesse contexto, Scavone et al., (2005) demonstrou a ocorrência de um decréscimo da atividade da isoforma $\alpha_{2/3}$ - Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo relacionado à idade, decorrente de detrimento na sinalização da via GMPc -PKG, implicando na ocorrência outros mecanismos envolvidos na redução do GMPc durante o envelhecimento (SCAVONE et al., 2005). Tais dados foram complementados

em um estudo posterior que verificou a participação da enzima fosfatase 1 (PP-1) nesse processo, cuja atividade encontra-se aumentada no envelhecimento, provocando uma diminuição no funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase (KAWAMOTO et al., 2008).

1.4 Sinalização anti-envelhecimento: a importância da proteína α Klotho

O gene *klotho* codifica uma proteína transmembrana composta por 1014 aminoácidos que conta com um pequeno domínio intracelular (10 aminoácidos) e com dois domínios extracelulares (KL1 e KL2), cuja sequência apresenta homologia com β -glicosidases (KURO-O et al., 1997). Ocorre também a formação de uma proteína que conta apenas com o domínio KL1, a qual é produto de um *splicing* alternativo (Figura 2) (MATSUMURA et al., 1998; SHIRAKI-IIDA et al., 1998). Além disso, as formas transmembrana podem ser clivadas pelas proteases ADAM10 (desintegrina A e metaloproteinase 10) e ADAM17 (desintegrina A e metaloproteinase 17) (Figura 2) e atuar como fator humoral, podendo ser detectadas na corrente sanguínea e em líquido cefalorraquidiano (CHEN et al., 2007; IMURA et al., 2004). Os principais locais de produção de α Klotho detectados até então são o rim, órgãos reprodutores, e plexo-coróide (KURO-O et al., 1997; LI et al., 2004).

Figura 2- Formas da α Klotho.

Dois tipos de RNAm podem ser obtidos a partir do gene *klotho*. A proteína composta pelas subunidades KL1 e KL2 é transportada até a membrana onde pode ser clivada e liberada no sangue ou líquido. Além disso outra forma obtida por splicing alternativo composta apenas por KL1 e uma porção extra pode ser secretada.

A função de α Klotho está associada à inibição do aparecimento de fenótipos relativos ao envelhecimento. Tal descoberta foi realizada em camundongos que sofreram uma mutação insercional a qual interrompia uma região promotora, mais tarde associada ao gene da proteína α Klotho. Essa inserção resulta em um alelo altamente hipomórfico, que em homozigose ($k^{f/-}$) provoca uma síndrome de envelhecimento precoce. Esses animais têm aspecto normal até 3-4 semanas, após esse período as características de envelhecimento vão surgindo, como a infertilidade, arteriosclerose, enfisema pulmonar, osteoporose, atrofia da pele e músculos, ocorrendo morte prematura em torno de 8 semanas de idade (KURO-O et al., 1997). O restabelecimento da função de α Klotho nos camundongos $k^{f/-}$ leva a reversão do fenótipo observado, assim como a superexpressão do gene em animais normais leva

a um aumento na expectativa de vida (KUROSU et al., 2005). Deste modo, o camundongo *k^{fl}* é tido como um modelo genético de envelhecimento acelerado.

Além disso, estudos em outros modelos também apontam a relevância da α Klotho no envelhecimento. Em macaco *rhesus* foi observada uma diminuição da expressão dessa proteína durante o envelhecimento (KING et al., 2012). Em humanos há evidências de que a presença em heterozigose de uma variação alélica (KL-VS), a qual aumenta o índice de α Klotho circulante, está associada a redução de doenças cardiovasculares, aumento na longevidade e capacidade cognitiva (ARKING et al., 2002; ARKING et al., 2005; DUBAL et al., 2014).

Dentre os principais mecanismos implicados na ação antienvelhecimento da proteína α Klotho estão inclusas a inibição da atividade do receptor de Insulina/IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina), bem como a via da proteína Wnt cujas ações estão intimamente relacionadas ao processo de envelhecimento (KUROSU et al., 2005; LIU et al., 2007). Outra importante função da forma transmembrana é a ligação com receptor de FGF (fator de crescimento de fibroblasto), agindo como co-receptor obrigatório para o FGF23 e portanto interferindo negativamente na reabsorção de fosfato e biossíntese de vitamina D (KUROSU et al., 2006).

Funções da α Klotho no SNC têm sido evidenciadas. Alterações como a diminuição no número de sinapses em camundongos *k^{fl}* (SHIOZAKI et al., 2008) e na mielinização (CHEN et al., 2013; DUCE et al., 2008), apontam para a relevância da α Klotho no encéfalo desses animais. Dados recentes mostraram a superexpressão sistêmica de α Klotho como potencializadora da cognição, melhorando o desempenho de animais em testes de aprendizado e memória, além de estimular a potencialização a longo prazo, bem como aumentar a expressão sináptica da subunidade GluN2B do NMDAR (DUBAL et al., 2014).

O estresse oxidativo parece ser um fator importante nas alterações centrais descritas nos camundongos hipomórficos para *klotho*. Aumento na oxidação do DNA

e peroxidação lipídica ocorrem no hipocampo desses animais, acompanhadas de aumento dos fatores pró-apoptóticos (BAX – proteína X associada ao BCL-2), redução de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2 e BCL-X_L) e danos cognitivos (NAGAI et al., 2003).

Por fim, uma importante função da proteína α Klotho quanto a homeostase do cálcio vem sendo descrita em células renais e em plexo coróide (IMURA et al., 2007). Nesse contexto, a função da Na⁺,K⁺-ATPase tem sido investigada (revisado em RAZZAQUE et al., 2008; SOPJANI et al., 2011) e foi relatada que a forma transmembrana da α Klotho interage com a subunidade catalítica (α_1) aumentando a quantidade desta bomba de sódio na membrana celular em resposta a uma redução na concentração do cálcio extracelular (IMURA et al., 2007).

Considerando os dados existentes quanto aos efeitos da redução drástica da α Klotho no SNC, torna-se plausível pensar numa possível alteração funcional da Na⁺,K⁺-ATPase relacionada a modificações na sinalização via NMDARs nos animais hipomórficos para *klotho*, e o seu papel no detrimento cognitivo observado.

1.5 Objetivo

O presente trabalho tem a finalidade de averiguar se alterações na via do NMDAR e da Na⁺,K⁺-ATPase estão presentes nos camundongos hipomórficos para o gene *klotho* (*kl^{f/-}*), contribuindo para compreensão de como as alterações desse modelo de envelhecimento acelerado se manifestam no SNC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Modelo de Estudo

Os camundongos utilizados neste estudo foram os descritos por Kuro-O e colaboradores (KURO-O et al., 1997), de modo que os animais que possuem o alelo mutado em homozigose são altamente hipomórficos para o gene *klotho*. O fundo genético desta linhagem consiste numa mistura de C57BL/6J e C3H/J. Tais animais foram disponibilizados pelo Prof. Dr. Makoto Kuro-o (Department of Pathology, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) para o Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, em caixas com 2-5 camundongos da mesma ninhada. Estes tiveram acesso à água e ração comercial *ad libitum* e foram mantidos sob condições padrões de temperatura (aproximadamente $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade e iluminação (ciclo de 12 h claro/escuro).

Para realização dos experimentos utilizamos camundongos machos provenientes do cruzamento entre irmãos heterozigotos para o alelo hipomórfico de *klotho* ($k^{l/+}$). Devido a expectativa de vida média dos camundongos hipomórficos ser em média de 8 semanas, os animais utilizados (de genótipo $k^{l/-}$ e $k^{l/+}$) foram eutanasiados com idade entre 7 e 8 semanas. Apenas no ensaio de GMPc, realizado por último, incluímos grupos de 4 semanas a fim de observar se haviam alterações presentes antes do fenótipo se agravar, e também um grupo de camundongos $k^{l/+}$ de 18 meses, a fim de comparar se os resultados observados no grupo $k^{l/-}$ se assemelham aos animais envelhecidos normalmente.

Os animais foram eutanasiados por decaptação, então o encéfalo foi imediatamente removido e imerso em PBS (solução fosfato-salina). As estruturas

encefálicas de interesse (hipocampo e cerebelo) foram dissecadas e armazenadas a -80 °C para uso posterior.

2.1.1 Genotipagem dos camundongos

A genotipagem foi realizada nos animais obtidos a partir do cruzamento de animais $k^{l/+}$, utilizando um protocolo adaptado a partir do descrito por Kuro-O e colaboradores (KURO-O et al., 1997). Para tanto foram recolhidas amostras de aproximadamente 0,5 cm da cauda dos animais em idade de desmame (21 dias). As caudas foram digeridas em solução de lise mantidas sob agitação em 95 °C por uma hora. Após essa etapa as amostras foram centrifugadas a 15000 g por 15 minutos para precipitação de material não digerido. O sobrenadante foi adicionado em tubo com 500 µl de isopropanol que causa precipitação do DNA, e em seguida ocorreu a centrifugação a 15000 g por 15 minutos. O precipitado formado contendo DNA foi ressuspenso em tampão, e após essa etapa as amostras obtidas foram analisadas por PCR.

O alelo hipomórfico é obtido por inserção de uma sequência de nucleotídeos em sua região promotora. Portanto na reação de amplificação serão necessários três *primers*: um senso para a sequência selvagem e outro para a mutada, mais um *primer* anti-senso que anelará em ambos alelos. Deste modo nos animais hipomórficos obtemos apenas a amplificação de uma banda de 920 pbs, nos homozigotos ($k^{l/+}$) uma banda de 458 pbs e nos heterozigotos obtemos ambas as bandas amplificadas (Figura 3). Os animais com genótipo heterozigoto foram utilizados para formação de matrizes, enquanto os homozigotos positivos e negativos para *klotho* serão utilizados nos experimentos.

Figura 3- Genotipagem gene *klotho*

Imagem representativa de PCR para os alelos do gene *klotho* e os possíveis genótipos: selvagem ($kl^{+/+}$), heterozigoto ($kl^{+/-}$) e hipomórfico ($kl^{-/-}$).

2.2 Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi utilizada visando analisar variações das subunidades α da Na^+, K^+ -ATPase, da NOSn, das subunidades GluN1 (total e fosforilada na serina 897), GluN2A e GluN2B do receptor NMDA, do receptor AMPA (total e fosforilado), transportadores de glutamato e GFAP (proteína glial fibrilar ácida). Para tanto, utilizamos neste ensaio o extrato proteico de hipocampo e cerebelo para realizar este ensaio, ambos descritos a seguir.

2.2.1 Extrato citosólico

O método que utilizado foi descrito em Rong e Baudry (RONG; BAUDRY 1996). As estruturas foram descongeladas e homogeneizadas em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,27 mM, Na_2HPO_4 8,06 mM) com adição de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM; ortovanadato 3 mM ; leupeptina 2 mg/mL; antipaína 2 mg/mL) e EDTA 0,1 mM. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 30 segundos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl_2 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,5 mM; ortovanadato 3 mM; leupeptina 2 $\mu\text{g/mL}$; antipaína 2 $\mu\text{g/mL}$) e incubado em gelo durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 10 μL de NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 12.000 g por 30 segundos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a fração

precipitada foi ressuspensa em tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25%; $MgCl_2$ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; ortovanadato 3 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 $\mu g/mL$; antipaína 2 $\mu g/mL$) e incubado 20 minutos em gelo, centrifugando-se o extrato à 12.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada, estocando as amostras a -80 °C.

2.2.2 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando reagente da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A concentração de proteínas presente nas amostras foi obtida através da comparação com a absorbância de uma curva padrão de albumina (Bio-Rad Laboratories).

2.2.3 O ensaio de Western Blotting

O ensaio descrito a seguir, foi baseado no método proposto por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Após a determinação da concentração de proteínas nas amostras, como descrito anteriormente, foi feito um ajuste na concentração de proteínas a 1 $\mu g/\mu L$ com o tampão de amostra (125 mM tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 200 mM de DTT; 0,02% de azul de bromofenol; pH 6,8), em seguida estas foram aquecidas por 5 minutos a 95 °C.

Quadro 2- Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting

Proteínas-Alvo	Anticorpo Primário	Concentração
GluN1	Sigma (G8913)	1:750
pGluN1 (Ser897)	Cell Signaling (3385S)	1:500
GluN2A	Cell Signaling (4205S)	1:750
GluN2B	Cell Signaling (4207S)	1:750
NOSn	Santa Cruz (SC648)	1:500
EAAT1	Abcam (416)	1:500
EAAT2	Cell Signalling (3838S)	1:500
EAAT3	Cell Signaling (14501S)	1:500
EAAT4	Abcam (186435)	1:500
GFAP	Cell Signalling (3670S)	1:1000
AMPA	Cell Signaling (13185)	1:1000
pAMPA	Sigma (A4352)	1:1000
α_1 -Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	Millipore (06520)	1:1000
α_2 -Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	Santa Cruz (SC31391)	1:1000
α_3 -Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	Santa Cruz (16052)	1:1000
β -actina	Sigma (A5441)	1:5000

O conteúdo total do meio de reação foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida 7% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS] para a separação das proteínas contidas na amostra. Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base; 192 mM de glicina; 0,1% de SDS. A eletroforese foi desenvolvida por 2 h a 100 V. Ao término da corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Para a transferência utilizou-se um tampão contendo 25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina, 20% de etanol. Após a transferência e bloqueio de ligações inespecíficas (com solução contendo 5% de BSA – albumina de soro bovino), as membranas foram incubadas por cerca de 15 h a 4 °C com anticorpos primários específicos (especificados na Quadro 2) diluídos em solução contendo TBS(100mM Tris-base; 0,9% NaCl e água destilada), 1% BSA e 0,05% de tween 20. Após essa etapa as membranas foram lavadas 6 vezes de 5 minutos em solução de TTBS (com 0,1% de tween 20 em TBS). Por fim as membranas são incubadas por 2 h em seus respectivos anticorpos secundários, e lavadas 6 vezes com TTBS. A revelação foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham®.

2.3 Determinação da atividade enzimática da NOS

Este ensaio baseia-se na estimativa da atividade da NOS pela conversão de L-arginina para L-citrulina, desenvolvido em nosso laboratório a partir dos ensaios descritos por Mckee e colaboradores (MCKEE et al., 1994).

O tecido foi homogeneizado em dounce com tampão contendo: 20 mM HEPES pH 7,4; 0,32 M de Sacarose; 0,1 mM de EDTA; 1,0 mM de DTT; 1,0 mM de PMSF. Em seguida a amostra foi centrifugada a 12.000 *g* x 30 s a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente a 12.000 *g* x 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante passou por uma coluna com 0,3 ml de resina DOWEX 50WX8 200-400 na forma sódica para retirar a arginina endógena. A fração precipitada foi utilizada posteriormente para ensaio da Na⁺,K⁺-ATPase.

Após a determinação da concentração protéica pelo método de Bradford, a amostra foi diluída para a concentração desejada, neste caso 1 µg/µl, usando-se 100 µl na reação. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C em 200 µl de meio reacional com concentração final de: 20 M de arginina (0,5 Ci), 4 M de FAD, 4 M de FNM, 25 M de BH₄, 10 g/ml de calmodulina, e 1 mM de NADPH, para determinação da atividade total da NOS. Para obtenção da atividade da enzima NOS induzida (NOSi) substituiu-se a calmodulina por quelante de Ca⁺² (EGTA) no tampão de reação.

Ao término da incubação os tubos foram levados ao gelo, adicionando-se 1 mL de HEPES 20mM pH 5,5. O volume total da reação foi transferido para uma coluna com 0,3 ml de resina DOWEX na forma sódica, recolhendo-se o eluato num recipiente para espectrofotometria de cintilação. Foram adicionados mais 1mL de HEPES pH 5,5 e 1 mL de H₂O destilada a coluna, recolhendo-se também o eluato no mesmo recipiente. Foram acrescentados 8mL de líquido de cintilação (Ultima Gold™) ao recipiente, determinando-se a atividade presente na amostra com um contador de radiação. As contagens em cpm (contagem por minuto) são convertidas para dpm (decaimento por minuto) e a atividade específica foi expressa em pmol.mg⁻¹.min⁻¹.

As reações nos informam atividade da NOS total e induzida (independente de cálcio). Portanto a obtenção da atividade da NOS dependente de cálcio ou constitutiva (NOS_e e NOS_n) é realizada pela subtração da atividade da NOSi da NOS total.

O controle negativo utilizado como branco da reação foi obtido usando-se o mesmo procedimento de uma amostra só que omitindo a amostra, ou incubando-se a amostra na presença de um inibidor da NOS como o L-NAME ou L-NMMA (1mM).

2.4 Detecção de GMPc

As estruturas (hipocampo e cerebelo) foram processadas em nitrogênio líquido e após a evaporação do nitrogênio, foram pesadas e ressuspensas em sete volumes de 0,1 M de HCl. Os níveis de GMPc foram dosados através de kit de ELISA, o qual foi

realizado de acordo com as instruções do fabricante (Direct cGMP ELISA kit Catalog No. ADI-900-014 - Enzo Life Sciences).

2.5 Determinação da atividade enzimática da Na^+, K^+ -ATPase

Este ensaio foi padronizado em estudos anteriores do grupo, (KAWAMOTO et al., 2008; MUNHOZ et al., 2005; SCAVONE et al., 2005), e foi baseado no método descrito por Esmann (ESMANN, 1988). Esse ensaio consiste na determinação da quantidade de fosfato (Pi) liberado pelo ATP hidrolisado formando um complexo com molibdato (fosfomolibdato), o qual é detectado através da leitura em comprimento de onda de 690 nm. O tecido foi processado como descrito no item 2.3 e a fração utilizada neste ensaio equivale ao precipitado obtido após a segunda centrifugação. Este foi ressuspenso em mesmo tampão utilizado no ensaio da NOS e a concentração de proteínas foi obtida pelo método de Bradford. A partir desta etapa, cada amostra foi utilizada em 3 diferentes grupos. Um dos grupos foi adicionado em tampão contendo Na^+ e Tris-ATP (3 mM), sendo utilizado para a determinação da ATPase total (inclusive Mg-ATPases). Os outros grupos foram adicionados no mesmo tampão com acréscimo do inibidor de atividade enzimática da Na^+, K^+ -ATPase, a ouabaína, nas concentrações de 3 mM (capaz de inibir qualquer subunidade α) para detectar Mg-ATPases e $3\mu\text{M}$ (capaz de inibir as subunidades α_2 e α_3) para detectar apenas α_1 . Deste modo é possível determinar separadamente a atividade total da Na^+, K^+ -ATPase, da isoforma α_1 e das isoformas α_2/α_3 .

Após a fase de reação foi adicionado o tampão de término de reação, contendo 0,5% de molibdato de amônio, e por fim foi adicionado Fiske ; Subarrow, reagente colorimétrico utilizado para a detecção do fosfomolibdato formado. Então alíquotas de 200 μl foram transferidas para uma placa de ELISA trinta minutos após a adição da solução redutora, e a formação de fosfomolibdato foi determinada por

espectrofotometria a 690 nm. A atividade da ATPase sensível à ouabaína (Na^+, K^+ -ATPase) foi obtida através da diferença entre as atividades obtidas no grupo Mg-ATPase (atividade insensível à ouabaína/mg/min) e às obtidas no grupo sem a ouabaína (ATPase TOTAL/mg/min) e a atividade das isoformas α_2 e α_3 foram determinadas através da diferença entre a atividade total e a atividade da isoforma α_1 .

2.6 Análise dos resultados

As imagens de Western Blot foram quantificadas pelo ImageJ em unidades arbitrárias (UA), e normalizadas pela β -actina, escolhida como controle endógeno.

Os ensaios realizados com apenas dois grupos ($kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$) foram submetidos ao teste T não pareado com correção de Welch, que considera desvios-padrão diferentes para cada grupo. Quando adicionado o grupo de animais envelhecidos, foi realizado teste ANOVA (análise de variância) de uma via, com pós teste de comparações múltiplas de Tukey. Já os experimentos realizados com grupos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 4 e 8 semanas receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA duas vias, uma vez que ambas variáveis deveriam ser consideradas, seguido de pós teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para o valor $p < 0,05$, tendo no mínimo $n=3$.

3. RESULTADOS

3.1. Receptor NMDA: fosforilação e composição

Através da técnica de Western Blotting, foi realizada a quantificação dos níveis totais das subunidades GluN1, GluN2A e GluN2B e também da forma fosforilada de GluN1 (pGluN1) na Serina 897. A quantificação da forma fosforilada foi obtida pela razão com a forma total de GluN1.

Nos homogenatos de hipocampo, observamos nos animais hipomórficos para o gene *klotho* um aumento da fosforilação de GluN1 (Figura 4), além de uma redução na expressão da subunidade GluN2B sem que houvesse diferença detectável nos níveis de GluN2A (Figura 5).

Figura 4- Detecção de GluN1 e pGluN1 por Western Blotting em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) subunidade GluN1/β-actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (B) subunidade pGluN1/β-actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (C) razão pGluN1/GluN1 (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =5) e respectivas auto-radiografias representativas (D). Dados são expressos como

média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, $**p < 0.01$.

Figura 5- Detecção das subunidades GluN2A e GluN2B por Western Blotting em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) GluN2A/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =5) e (B) GluN2B/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =4) e respectivas auto-radiografias representativas (C). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, $*p < 0.05$.

Diferente dos resultados obtidos em hipocampo, em cerebelo observamos uma redução na fosforilação de GluN1 na serina 897 (Figura 6), o que indica uma redução na atividade do receptor NMDA. Além disso, foi possível observar um aumento na expressão da subunidade GluN2B e uma redução na expressão da subunidade GluN2A (Figura 7).

Figura 6- Detecção de GluN1 e pGluN1 por Western Blotting cerebelo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) subunidade GluN1/β-actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (B) subunidade pGluN1/β-actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (C) razão pGluN1/GluN1 (n: $kl^{+/+}$ =7 e $kl^{-/-}$ =6) e respectivas auto-radiografias representativas (D). Dados são expressos como média ± SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, * $p < 0.05$.

Figura 7- Detecção das subunidades GluN2A e GluN2B por Western Blotting em cerebelo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) GluN2A/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =4), (B) GluN2B/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =5 e $kl^{-/-}$ =4), (C) razão da quantificação de GluN2A/GluN2B (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =4) e respectivas auto-radiografias representativas (D). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, * p <0.05; ** p <0,01.

3.2 Fosforilação do AMPAR em hipocampo

Foi realizada a dosagem dos níveis de receptor tipo AMPA em sua forma total e fosforilada, a fim de verificar se as alterações encontradas na sinalização glutamatérgica são generalizadas ou exclusivas do NMDAR. Nenhuma alteração em relação a fosforilação de AMPAR foi encontrada em hipocampo (Figura 8).

Figura 8- Detecção do receptor AMPA e pAMPA por Western Blotting em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) AMPAR/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (B) pAMPA/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (C) razão pAMPA/AMPA (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =5) e respectivas auto-radiografias representativas (D). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch.

3.3 NOS: atividade e expressão de NOSn

Em relação a atividade da NOS, verificamos um aumento de atividade total em hipocampo dos camundongos hipomórficos de 8 semanas (Figura 9), o que seria coerente com o aumento na fosforilação do receptor NMDA observada. Entretanto é importante salientar que a técnica empregada não possibilitou discernir se a atividade medida era referente a NOS dependente de Ca^{+2} (NOSn e NOSe) ou da NOSi. Além disso foi realizado ensaio de Western Blotting, com a finalidade de verificar, se o aumento de atividade observada estaria relacionada a um aumento na expressão da NOSn, entretanto nenhuma diferença foi encontrada (Figura 9). Tal resultado reforça a ideia de que o aumento de atividade encontrado pode estar relacionado a uma maior atividade enzimática mediada pelo aumento de cálcio proveniente da atividade do receptor NMDAR.

Figura 9- Atividade e expressão da NOS em hipocampo de camundongos *kl^{+/+}* e *kl^{-/-}* de 8 semanas.

(A) Atividade total da NOS (pmol/mg.min; n=7). (B) Análise densitométrica (UA) de nNOS/β-actina (n: *kl^{+/+}*=6 e *kl^{-/-}*=4) e respectivas auto-radiografias representativas (C). Dados são expressos como média ± SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, *p<0.05.

Em cerebelo, empregamos a mesma técnica de atividade da NOS, e devido ao maior volume do cerebelo em relação ao hipocampo, foi possível realizar o ensaio completo, incluindo a etapa com quelantes de Ca^{+2} o que permitiu discernir entre a

atividade dependente da independente de Ca^{+2} . Nesta estrutura, verificamos que a tanto a atividade da NOS constitutiva como da induzida estão reduzidas nos animais mutados em relação ao grupo controle (Figura 10).

Figura 10- Atividade da NOS em cerebelo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

A) Atividade total da NOS (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =9). B) Atividade da NOS induzível (independente de cálcio; n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =7). C) Atividade constitutiva da NOS (dependente de cálcio; n=6). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, * $p < 0.05$ e *** $p < 0,0001$.

3.4 Níveis de GMPc

Na dosagem de GMPc, foram utilizados os grupos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 4 e 8 semanas e grupo $kl^{+/+}$ de 18 meses. Em hipocampo verificamos alterações significativas nos animais hipomórficos. Estes apresentavam uma redução nos níveis de GMPc com 8 semanas, muito similar ao observado camundongos envelhecidos (Figura 11A). Além disso nos animais controle, observamos um aumento de GMPc de 4 para 8 semanas, alteração que não ocorre nos animais mutados, indicando possíveis alterações nesta

via ao longo do desenvolvimento (Figura 11B).

Figura 11- Detecção dos níveis de GMPc por ELISA em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$.

A) Níveis de GMPc em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 4 e 8 semanas. Two-way ANOVA, pós teste: comparações múltiplas de Tukey. # $kl^{+/+}$ 4 vs. 8 semanas; * $kl^{+/+}$ vs. $kl^{-/-}$ de 8 semanas. B) Níveis de GMPc em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas e em $kl^{+/+}$ de 18 meses. One-way ANOVA, pós teste: comparações múltiplas de Tukey. * $kl^{+/+}$ de 18 meses ou $kl^{-/-}$ vs. $kl^{+/+}$ de 8 semanas. Dados são expressos como média $\pm$ SEM, $n=4$, $p<0.05$.

Já em cerebelo não observamos diferença em relação aos animais mutados, apenas em relação ao animais de 18 meses, que apresentam níveis de GMPc reduzidos em relação ao controle e aos animais $kl^{-/-}$ (Figura 12). Também verificamos que a alteração nos animais controle de 4 para 8 semanas continua presente, entretanto nenhuma alteração foi observada nos animais mutados.

Figura 12- Detecção dos níveis de GMPc por ELISA em cerebello de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$.

A) Níveis de GMPc em cerebello de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 4 e 8 semanas. Two-way ANOVA, pós teste: comparações múltiplas de Tukey. ** $kl^{+/+}$ 4 vs. 8 semanas. B) Níveis de GMPc em cerebello de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas e em $kl^{+/+}$ de 18 meses. One-way ANOVA, pós teste: comparações múltiplas de Tukey. ** $kl^{+/+}$ de 18 meses vs. $kl^{+/+}$ de 8 semanas, # $kl^{+/+}$ de 18 meses vs. $kl^{-/-}$ de 8 semanas. Dados são expressos como média $\pm$ SEM, $n=4$, $p<0.01$.

3.5 Na^+,K^+ -ATPase: atividade e expressão

Os dados de atividade da Na^+,K^+ -ATPase em hipocampo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados (Figura 13). Quando olhamos para a expressão da subunidade α (Figura 14) observamos um aumento na subunidade α_2 em astrócitos, e uma redução na expressão da subunidade α_3 (neuronal). Como a técnica empregada para análise da atividade não permite diferenciar a atividade α_2 da α_3 , existe a possibilidade que a alteração na expressão dessas proteínas tenha impedido a observação de uma possível alteração na atividade relacionada às duas isoformas, ou mesmo da atividade enzimática total.

Figura 13- Atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo de camundongos $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

A) Atividade total da Na^+, K^+ -ATPase. B) Atividade $\alpha_1\text{-Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. C) Atividade $\alpha_2, \alpha_3\text{-Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. D) Atividade Mg^{2+} -ATPase. Resultados expressos como nmol/mg.min proteína, média + SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, $n=5$.

Figura 14- Detecção das subunidades α da Na^+, K^+ -ATPase por Western Blotting em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$.

Auto-radiografias de Western blotting e respectivas análises densitométricas (unidades arbitrárias, UA) de (A) subunidade α_1 / β -actina (n: $k^{+/+}=7$ e $k^{-/-}=4$), (B) subunidade α_2 / β -actina (n: $k^{+/+}=7$ e $k^{-/-}=4$), (C) subunidade α_3 / β -actina (n: $k^{+/+}=7$ e $k^{-/-}=6$) e respectivas auto-radiografias representativas (D). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, $**p<0,01$.

Já em cerebelo foi possível detectar uma redução de atividade referente às subunidades α_2/α_3 (Figura 15). Assim como em hipocampo foi visto um aumento na subunidade α_2 , entretanto, nenhuma alteração foi observada quanto a subunidade α_3 (neuronal) (Figura 16).

Figura 15- Atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo de camundongos $k^{-/-}$ de 8 semanas.

A) Atividade total da Na^+, K^+ -ATPase. B) Atividade α_1 - Na^+, K^+ -ATPase. C) Atividade α_2, α_3 - Na^+, K^+ -ATPase. D) Atividade Mg^{2+} -ATPase. Resultados expressos como nmol/mg.min proteína, média + SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, n=5, $*p<0,05$.

Figura 16- Detecção das subunidades α da Na^+, K^+ -ATPase por Western Blotting em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$.

Auto-radiografias de Western blotting e respectivas análises densitométricas (unidades arbitrárias, UA) de (A) subunidade α_2 / β -actina (n: $kl^{+/+}$ =7 e $kl^{-/-}$ =5), (B) subunidade α_3 / β -actina (n: $kl^{+/+}$ =7 e $kl^{-/-}$ =6) e respectivas auto-radiografias representativas (C). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, * $p < 0,05$.

3.6 Expressão de transportadores de Glutamato e GFAP

Em hipocampo, foi possível detectar alteração na expressão do transportador de glutamato EAAT2 (presente em astrócitos), a qual está aumentada nos animais hipomórficos (Figura 17C). Já nos níveis de GFAP e EAAT1 não foi possível encontrar diferenças significativas (Figura 17A-B).

Figura 17- Detecção de GFAP, EAAT1 e EAAT2 por Western Blotting em hipocampo de camundongos $kl^{+/+}$ e $kl^{-/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) GFAP/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =6), (B) EAAT1/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =8 e $kl^{-/-}$ =5), (C) EAAT2/ β -actina (n: $kl^{+/+}$ =6 e $kl^{-/-}$ =5) e respectivas auto-radiografias representativas (D). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch, * $p < 0,05$.

Em cerebelo não encontramos diferenças estatísticas para nenhum dos transportadores analisados (EAAT1, EAAT3 E EAAT4) e nem para GFAP (Figura 18).

Figura 18- Detecção de GFAP, EAAT1, EAAT3 e EAAT4 por Western Blotting em cerebelo de camundongos $k^{f/+}$ e $k^{f/-}$ de 8 semanas.

Análise densitométrica (UA) de (A) GFAP/ β -actina (n: $k^{f/+}$ =6 e $k^{f/-}$ =4), (B) EAAT1/ β -actina (n: $k^{f/+}$ =5 e $k^{f/-}$ =4), (C) EAAT3/ β -actina (n: $k^{f/+}$ =5 e $k^{f/-}$ =4), (D) EAAT4/ β -actina (n: $k^{f/+}$ =5 e $k^{f/-}$ =4) e respectivas auto-radiografias representativas (E). Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Teste T não-pareado com correção de Welch.

4 DISCUSSÃO

Uma das questões interessantes que os dados apresentados levantam é o fato de que estruturas diferentes do SNC vão responder e se adaptar de formas diferentes. Muito se discute sobre como a sinalização glutamatérgica se comporta no envelhecimento, em doenças neurodegenerativas e em situações que provocam déficits cognitivos. Existem dados que apontam para efeitos deletérios do aumento exacerbado da sinalização via NMDAR, e também de como a redução da dessa sinalização pode ser prejudicial uma vez que tantas funções neuronais dependem do funcionamento adequado desta via (revisado em MAGNUSSON et al 2010; MATTSON 2008). Neste modelo mostramos que essas alterações podem estar relacionadas a fosforilação e composição do NMDAR. Diversos trabalhos apontam para a ocorrência de alterações similares (Quadro 1) em quadros neurodegenerativos (revisado em SANZ-CLEMENTE et al., 2013), e no envelhecimento (revisado em MAGNUSSON et al., 2010).

Além da composição do NMDAR, outro ponto relevante para a sinalização é a localização dos receptores. Tais receptores podem estar presentes em regiões sinápticas (pré ou pós-sinápticas), extra-sinápticas e inclusive em células gliais. Dados apontam que NMDARs que contêm GluN2A são responsáveis por cerca de 68% da corrente sináptica, e 27% da corrente extra-sináptica, sendo que o restante é mediado por receptores com GluN2B (LIU et al., 2007). Existe uma tendência na literatura em dicotomizar os efeitos sinápticos *versus* extra-sinápticos em neuroprotetores e neurotóxicos respectivamente (HARDINGHAM et al., 2002; HARDINGHAM; BADING, 2010; MOLOKANOVA et al., 2014). Como os receptores sinápticos são em maior parte compostos por GluN2A, conseqüentemente tende-se a atribuir a estes receptores os efeitos protetores, enquanto os receptores GluN2B estariam mais associados aos efeitos excitotóxicos. Entretanto, dados mais recentes, oferecem um cenário mais

parcimonioso, no qual esses receptores teriam funções complementares, em vez de opostas (ZHOU et al., 2013; ZHOU et al., 2013a).

Devido a essa multiplicidade de respostas associadas ao NMDAR, este receptor se torna um alvo importante para promoção de neuroproteção. Deste modo várias propostas têm surgido, levando em conta os efeitos benéficos do aumento da sinalização via NMDAR para melhora cognitiva (DUBAL et al., 2014; DUBAL et al., 2015), e também de sua inibição, a fim de evitar os danos associados a excitotoxicidade (LIPTON 2007; YUAN et al., 2015). Portanto, compreender melhor as particularidades dessa sinalização e como ela se altera nas diferentes estruturas do SNC, frente a quadros patológicos, pode levar ao desenvolvimento de estratégias de intervenção cada vez mais específicas e eficazes.

4.1 Sinalização via receptor NMDA em hipocampo

Entre parâmetros relacionados ao NMDAR, em hipocampo, encontramos diferenças significativas em relação a razão pGluN1/GluN1, a qual está aumentada no grupo de animais hipomórficos. A fosforilação na serina 897 promove um aumento na permeabilidade ao Ca^{+2} , e é realizada pela PKA, a qual é ativada por receptores metabotrópicos de glutamato gerando uma alça retroalimentação positiva na sinalização via NMDAR (AMAN et al., 2014; SKEBERDIS et al., 2006). Em relação a composição do receptor verificamos uma redução da subunidade GluN2B. Esta subunidade é indispensável para sinalização pós-sináptica, uma vez que é responsável pela sinalização via CaMKII. Existem alguns estudos que propõem modulação de vias glutamatérgicas pela proteína α Klotho em hipocampo. Dubal e colaboradores, (DUBAL et al., 2015) verificaram que ao cruzar animais que expressam hAPP (proteína precursora da amilóide humana), um modelo de DA, com animais que hiperexpressam α Klotho, o desenvolvimento do déficit cognitivo foi revertido, entretanto sem que ocorresse modificação nas vias relacionadas a clivagem e acúmulo de β -amilóide. A

explicação encontrada foi na modulação da sinalização glutamatérgica, de modo que a subunidade GluN2B e GluN1 estavam aumentadas nos animais com hAPP e que hiperexpressavam α Klotho em relação ao grupo hAPP, mostrando a importância dessa proteína na sinalização glutamatérgica, seja ela direta ou indireta. Além disso, o mesmo grupo mostrou em outro trabalho uma melhora cognitiva com aumento pós-sináptico de GluN2B mediado pela hiperexpressão de α Klotho mesmo em animais saudáveis (DUBAL et al., 2014). Nesse caso, o aumento da sinalização via NMDAR foi observada em regiões de densidade pós-sináptica e se mostrou protetora. Esses dados reforçam a ideia de que aumentar a sinalização via NMDAR pode promover efeitos positivos na cognição desde que associados a efeitos intracelulares neuroprotetores, como no caso do GluN2B nas densidades pós-sinápticas.

Por outro lado, quando esse aumento na sinalização via NMDAR se deve a vias excitotóxicas, o aumento da produção de EROS as quais reagem com o NO, formando compostos citotóxicos que promovem perda de função e morte celular (GIROUARD et al., 2009), estando associado a déficits cognitivos e doenças neurodegenerativas. Este é o cenário mais provável para explicar os dados nos camundongos $kl^{-/-}$, já que estudos prévios mostram que esses animais apresentam déficits cognitivos associados ao aumento de danos oxidativos, como oxidação lipídica e danos no DNA, além de aumento de BAX e redução de BCL-2 e BCL-X_L, promovendo um perfil pró-oxidante e pró-apoptótico (NAGAI et al., 2003). Portanto um aumento na sinalização NMDAR não necessariamente implicaria num aumento na produção de GMPc, até porque, a guanilato ciclase solúvel (GCs) apresenta uma dessensibilização após estimulação repetida (BELLAMY et al., 2000). Isso explicaria porque em hipocampo observamos nos animais $kl^{-/-}$ aumento de fosforilação de GluN1, aumento na atividade da NOS, mas em contrapartida uma redução nos níveis de GMPc (Figura 19).

Outro ponto importante em relação a sinalização glutamatérgica observado em hipocampo, foi o aumento o transportador de glutamato de astrócitos do tipo EAAT2

nos animais mutados. Transportadores de glutamato são pontos-chave no controle da sinalização glutamatérgica, pois são responsáveis pela captação de glutamato, impedindo assim a ocorrência do excesso de ativação dos receptores pós-sinápticos e extra-sinápticos. Entretanto em condições de excitotoxicidade, estes transportadores podem contribuir para o agravamento do quadro, uma vez que em ambientes pró-oxidativos podem em vez de captar, promover a liberação de mais glutamato, contribuindo para a ativação de receptores extra-sinápticos e o funcionamento aberrante da via (revisado em PAL et al., 2015). Como a função dos transportadores de glutamato não depende só quantidade da proteína, mas de sua atividade, experimentos que testem a capacidade de captação de glutamato pelo tecido precisam ser realizados para atingir resultados mais conclusivos.

Figura 19- Alterações na via NMDAR-NOS-GMPc em hipocampo de camundongos *kt^{-/-}*

Em hipocampo dos animais *kt^{-/-}* foi possível observar um aumento da fosforilação da subunidade GluN1, seguida de aumento de atividade da NOS e redução de GMPc, provavelmente devido ao aumento da produção de EROS (descrito por NAGAI et al., 2003), que deslocam a sinalização do NO.

4.2 Atividade e expressão da Na⁺,K⁺-ATPase em hipocampo

A modulação da Na⁺,K⁺-ATPase, seja na sua atividade ou expressão, já foi correlacionada a quadros patológicos, inclusive relacionados ao envelhecimento (CHAUHAN et al., 1997; MARK et al., 1995; TANAKA; ANDO, 1990). Dados de hibridização *in situ* que apontam para a redução de RNAm da subunidade α_3 em hipocampo de ratos de 24 meses (CHAUHAN; SIEGEL, 1996) e em córtex frontal de pacientes com Doença de Alzheimer, se comparados a indivíduos saudáveis, além disso foi observado que mesmo indivíduos idosos sem Alzheimer os níveis de α_3 encontravam-se reduzidos em comparação a indivíduos jovens (CHAUHAN et al., 1997). Os dados obtidos apontam para uma redução da subunidade α_3 em hipocampo dos animais hipomórficos para *klotho*. Deste modo se reafirma a importância da subunidade α_3 no contexto do surgimento das doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

Outro ponto que avaliamos em relação a Na⁺,K⁺-ATPase, foi a sua atividade, a qual não apresentou diferenças significativas entre os animais *kl^{+/+}* e *kl^{-/-}*. Como a técnica empregada para análise da atividade não permite diferenciar a atividade α_2 da α_3 , existe a possibilidade que a alteração na expressão dessas proteínas tenha impedido a observação de uma possível alteração na atividade. Dados da literatura corroboram a ideia uma redução de atividade em hipocampo durante o envelhecimento e processos patológicos. Vasconcelos e colaboradores, reportaram uma redução gradual da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em hipocampo de ratos de 18 e 24 meses, e de modo semelhante aos camundongos *kl^{-/-}* (Figura 19), acompanhado de aumento da NOS e redução de GMPc (VASCONCELOS et al., 2015). Os efeitos observados foram revertidos por dieta intermitente, e um dos mecanismos implicados foi a redução do estresse oxidativo. Sabe-se uma das ações importantes dos protocolos é a interferência na sinalização IGF-1 (revisado em MATTSON et al., 2016), um dos alvos

reconhecidos da proteína α Klotho (KUROSU et al., 2005) e ainda dados recentes apontam para a participação da proteína α Klotho nos efeitos de dietas restritivas (SCHAFER et al., 2015). Tais dados reforçam a importância da investigação da relação da proteína α Klotho na modulação da via NMDAR-NOS-GMPc e seu impacto na Na^+, K^+ -ATPase durante o processo de envelhecimento, e a relevância da modulação dessa via em estratégias que visem a neuroproteção.

Por fim, outra observação importante descrita na literatura é a participação da α Klotho na modulação da Na^+, K^+ -ATPase. Aparentemente, de acordo com as flutuações nos níveis de Ca^{+2} , a α Klotho pode promover o aumento da subunidade α_1 na membrana, bem como o aumento da atividade enzimática (IMURA et al., 2007; SOPJANI et al., 2011). Tais observações foram feitas em rim, paratireóide e plexo-coróide, locais de alta expressão de α Klotho. Deste modo, seria interessante propor experimentos similares para averiguar se estes mecanismos estão presentes nas demais subunidades α .

4.3 Sinalização via NMDAR em cerebelo

Em cerebelo as alterações encontradas na via do NMDAR foram acompanhadas por uma redução na proporção GluN2A/GluN2B (Figura 20). Dados apontam para uma maior participação de GluN2A nas correntes sinápticas. Portanto a redução de GluN2A talvez esteja correlacionada com a redução da ativação da NOSn já que esta encontra-se ancorada a PSD-95. Por outro lado, apesar de indispensável para a função sináptica por sua interação com CaMKII (GAAMOUCHE et al., 2012), a subunidade GluN2B parece ter maior participação na sinalização extra-sináptica, e também um efeito mais intenso na sinalização tanto protetora quanto excitotóxica (ZHOU et al., 2013), podendo estar associada aos sinais de neurodegeneração observados em cerebelo desses animais (SHIOZAKI et al., 2008). Portanto para a compreensão do significado fisiológico dessas

alterações seria importante saber qual a localização subcelular desses receptores e quais complexos proteicos estão envolvidos na sinalização desses receptores. Além disso em cerebelo, outras subunidades têm participação importante na composição dos NMDAR, como a GluN2C (ROSSI et al., 2002), altamente expressa em animais adultos. Logo alterações nesta subunidade não podem ser descartadas.

Figura 20- Alterações na via NMDAR-NOS-GMPc e atividade da $\alpha_2/\alpha_3\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cerebelo de camundongos $kt^{-/-}$.

Em cerebelo dos animais $kt^{-/-}$ foi possível observar uma redução da fosforilação da subunidade GluN1, seguida de redução de atividade da NOS, e da $\alpha_2/\alpha_3\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Como não foram detectadas alterações nos níveis GMPc, provavelmente outros mecanismos associados ao NMDAR, como a calcineurina podem atuar na redução encontrada.

4.4 Atividade e expressão da Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo

Resultados prévios do laboratório já descreveram uma redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cerebelo, relacionada à modulação da via NOS-GMPc-PKG no envelhecimento (SCAVONE et al., 2005). Observamos nesta estrutura uma redução na fosforilação de GluN1 acompanhada por uma redução na NOS, porém isso não se

refletiu na redução dos níveis de GMPc. Vários mecanismos adicionais controlam os níveis de GMPc, como atividade das fosfodiesterases responsáveis por sua degradação, e também o monóxido de carbono (CO), o qual também pode ativar a GCs e produzir GMPc, via que parece ser particularmente importante em células de Purkinje (NATHANSON et al., 1995). Além disso devemos considerar que não é apenas o GMPc em si que promove ativação ou inativação da Na⁺,K⁺-ATPase. Portanto para obter resultados mais conclusivos quanto a qual fator estaria causando essa redução na atividade, novos experimentos devem ser propostos considerando a atividade da PKG, a qual tem uma relação mais próxima com a fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase, e também de fosfatases como a PP-1, a qual parece estar relacionada a desfosforilação da mesma (KAWAMOTO et al., 2008). Outro ponto de modulação importante da Na⁺,K⁺-ATPase via NMDAR é a calcineurina, a qual promove desfosforilação da DARPP-32 que por sua vez atua inibindo a PP-1 levando a aumento de atividade da Na,K-ATPase (MARCAIDA et al., 1996). Deste modo vários pontos adicionais na via NMDAR poderiam justificar os dados encontrados.

4.5 Expressão da subunidade α_2 da Na⁺,K⁺-ATPase

Tanto em hipocampo como em cerebelo, foi observado um aumento na expressão da subunidade α_2 , a qual é expressa em astrócitos. Cada vez mais células da glia vem sendo implicadas em processos neurodegenerativos (revisado em HAIM et al., 2015). Alguns estudos mostram a participação da subunidade α_2 na resposta inflamatória em células da glia (KINOSHITA et al., no prelo), e em doenças neurodegenerativas (GALLARDO et al., 2014).

Gallardo e colaboradores, viram que em modelo de camundongos que expressam SOD1 mutante (modelo de esclerose lateral amiotrófica-ELA) e também em medula espinhal de pacientes com ELA esporádica ou familiar (com SOD1 mutada)

ocorre um aumento de expressão da subunidade α_2 . No modelo animal foi possível constatar a associação do aumento de expressão da subunidade α_2 com aumento de citocinas pró-inflamatórias e a degeneração de neurônios motores, e a redução na expressão dessa proteína levando a proteção dos neurônios motores e aumento da expectativa de vida (GALLARDO et al., 2014). De modo similar, Kinoshita e colaboradores, mostraram que o silenciamento da α_2 reduz os efeitos pró-inflamatórios do LPS em cultura de glia, reforçando a ideia de que essa proteína participa de mecanismos pró-inflamatórios no SNC (KINOSHITA et al., no prelo).

Tendo em vista a importância da α Klotho na regulação da inflamação (LIU et al., 2011) e considerando que haja um perfil pró-inflamatório em vigência da redução da proteína, a observação do aumento da subunidade α_2 torna-se plausível. Inclusive quando observamos um aumento no transportador de glutamato do tipo EAAT2 em hipocampo. Sabe-se que estes transportadores tendem a formar complexos multi-proteicos com a Na^+, K^+ -ATPase, pois dependem da formação de gradientes de Na^+ para seu funcionamento adequado (ROSE et al., 2009).

Além disso, apesar de não termos encontrado alterações nos níveis de GFAP por western blotting, não podemos descartar a possibilidade de ocorrência de aumento de reatividade dos astrócitos nesses animais, já que se trata uma alteração recorrente no envelhecimento normal, em doenças neurodegenerativas (BERNAL; PETERSON, 2011; revisado em HAIM et al., 2015), e ainda não foi descrita nos animais hipomórficos para *klotho*.

Outra possível explicação seria o fato de haver modulação diferencial das subunidades α_2 e α_3 já que até o momento não foi detectada a expressão de α Klotho em astrócitos, onde a α_2 é expressa. Por outro lado neurônios expressam α Klotho, o que resultaria em respostas diferentes frente a redução dessa proteína no animal hipomórfico.

5 CONCLUSÕES

Em resumo, os dados obtidos mostram pela primeira vez alterações na modulação da Na^+, K^+ -ATPase, seja em sua atividade ou expressão, que poderiam estar associadas às mudanças na sinalização glutamatérgica em cerebelo e hipocampo de camundongos *kl^{-/-}*, reforçando a importância da proteína αKlotho na modulação das vias de neuroproteção associadas a sinalização do receptor NMDA.

Além disso, temos indícios da presença de uma modulação diferencial nas estruturas analisadas, o que pode indicar respostas diferentes ao longo do envelhecimento, que podem ser determinantes para definir a susceptibilidade destas áreas para iniciar os processos neurodegenerativos ao mesmo tempo que podem exigir ações diferentes para atuar em estratégias de neuroproteção.

Por fim, o fato da proteína αKlotho interferir em diversas funções fisiológicas, faz com que os camundongos *kl^{-/-}* apresentem danos característicos de processos multifatoriais, assim como no processo de envelhecimento normal. Por um lado essa característica do modelo dificulta a compreensão dos mecanismos descritos, tornando-se difícil inferir se as alterações observadas estão diretamente relacionadas à redução da proteína αKlotho no SNC, ou se são consequência do acúmulo de danos sistêmicos. Por outro lado o modelo se mostra interessante para a observação de mecanismos de resposta frente a alterações fisiológicas complexas.

REFERÊNCIAS*

AGÜERO-TORRES, H. et al. Dementia is the major cause of functional dependence in the elderly: 3-year follow-up data from a population-based study. **American Journal of Public Health**, v. 88, n. 10, p. 1452-1456, 1998. ISSN 0090-0036.

AIZMAN, O.; APERIA, A. Na, K-ATPase as a Signal Transducer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, n. 1, p. 489-496, 2003. ISSN 1749-6632.

AMAN, T. K. et al. Separate intramolecular targets for protein kinase A control N-methyl-D-aspartate receptor gating and Ca²⁺ permeability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 18805-18817, 2014. ISSN 0021-9258.

ARKING, D. E. et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation research**, v. 96, n. 4, p. 412-418, 2005. ISSN 0009-7330.

_____. Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 856-861, 2002. ISSN 0027-8424.

AZARIAS, G. et al. A specific and essential role for Na, K-ATPase $\alpha 3$ in neurons co-expressing $\alpha 1$ and $\alpha 3$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2734-2743, 2013. ISSN 0021-9258.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-495, 2005. ISSN 0092-8674.

BELLAMY, T. C.; GARTHWAITE, J. Pharmacology of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in cerebellar cells. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 95-103, 2002. ISSN 1476-5381.

BERNAL, G. M.; PETERSON, D. A. Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. **Aging cell**, v. 10, n. 3, p. 466-482, 2011. ISSN 1474-9726.

BERTORELLO, A. M. et al. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺, K⁺-ATPase

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

inhibits the activity of the enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 24, p. 11359-11362, 1991. ISSN 0027-8424.

BLANCO, G.; KOSTER, J. C.; MERCER, R. W. The alpha subunit of the Na, K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 18, p. 8542-8546, 1994. ISSN 0027-8424.

BORGLAND, S. L. et al. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. **Neuron**, v. 49, n. 4, p. 589-601, 2006. ISSN 0896-6273.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BRADLEY, J. et al. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. **The Journal of neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 1065-1076, 2006. ISSN 0270-6474.

BRENNAN, A. M. et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 857-863, 2009. ISSN 1097-6256.

BRINES, M. L.; ROBBINS, R. J. Inhibition of $\alpha 2/\alpha 3$ sodium pump isoforms potentiates glutamate neurotoxicity. **Brain research**, v. 591, n. 1, p. 94-102, 1992. ISSN 0006-8993.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric oxide**, v. 23, n. 3, p. 153-165, 2010. ISSN 1089-8603.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 766-775, 2007. ISSN 1471-003X.

CARPENTER-HYLAND, E. P.; WOODWARD, J. J.; CHANDLER, L. J. Chronic ethanol induces synaptic but not extrasynaptic targeting of NMDA receptors. **The Journal of neuroscience**, v. 24, n. 36, p. 7859-7868, 2004. ISSN 0270-6474.

CHAUHAN, N.; SIEGEL, G. In Situ Analysis of Na, K-ATPase $\alpha 1$ -and $\alpha 3$ -Isoform mRNAs in Aging Rat Hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 4, p. 1742-1751, 1996. ISSN 1471-4159.

CHAUHAN, N. B.; LEE, J. M.; SIEGEL, G. J. Na, K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 151-166, 1997. ISSN 0895-8696.

CHEN, B.-S.; ROCHE, K. W. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 3, p. 362-368, 2007. ISSN 0028-3908.

CHEN, C.-D. et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19796-19801, 2007. ISSN 0027-8424.

_____. The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 1927-1939, 2013. ISSN 0270-6474.

CHINTA, S. J. et al. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? **Journal of internal medicine**, v. 273, n. 5, p. 429-436, 2013. ISSN 1365-2796.

CHOW, D. C.; FORTE, J. G. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, n. 1, p. 1-17, 1995. ISSN 0022-0949.

COUSINS, S.; KENNY, A.; STEPHENSON, F. Delineation of additional PSD-95 binding domains within NMDA receptor NR2 subunits reveals differences between NR2A/PSD-95 and NR2B/PSD-95 association. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 89-95, 2009. ISSN 0306-4522.

COUSINS, S. L. et al. Differential interaction of NMDA receptor subtypes with the post-synaptic density-95 family of membrane associated guanylate kinase proteins. **Journal of neurochemistry**, v. 104, n. 4, p. 903-913, 2008. ISSN 1471-4159.

DE SÁ LIMA, L. et al. Ouabain activates NFκB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 327-336, 2013. ISSN 0028-3908.

DESFRERE, L. et al. Na, K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 7, p. 2212-2217, 2009. ISSN 0027-8424.

DOMEK-ŁOPACIŃSKA, K. U.; STROSZNAJDER, J. B. Cyclic GMP and nitric oxide synthase

in aging and Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 41, n. 2-3, p. 129-137, 2010. ISSN 0893-7648.

DUBAL, D. B. et al. Life extension factor klotho enhances cognition. **Cell reports**, v. 7, n. 4, p. 1065-1076, 2014. ISSN 2211-1247.

_____. Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 2358-2371, 2015. ISSN 0270-6474.

DUCE, J. A. et al. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. **Glia**, v. 56, n. 1, p. 106-117, 2008. ISSN 1098-1136.

DUNAH, A. W. et al. Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal n-methyl-d-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 342-352, 2000. ISSN 1521-0111.

EL GAAMOUCHE, F. et al. Interaction between α CaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 31, p. 10767-10779, 2012. ISSN 0270-6474.

ERREGER, K. et al. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. **The Journal of physiology**, v. 563, n. 2, p. 345-358, 2005. ISSN 1469-7793.

ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺, K⁺-ATPase: molar and specific activity, protein determination. **Methods in enzymology**, 1988. ISSN 1079-2376.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of ageing and development**, v. 128, n. 1, p. 92-105, 2007. ISSN 0047-6374.

FRASER, C. L.; ARIEFF, A. I. Na-K-ATPase activity decreases with aging in female rat brain synaptosomes. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 281, n. 4, p. F674-F678, 2001. ISSN 1931-857X.

GALLARDO, G. et al. An α 2-Na/K ATPase/ α -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1710-1719, 2014. ISSN 1097-6256.

GAO, J. et al. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. **The Journal of general physiology**, v. 119, n. 4, p. 297-312, 2002. ISSN 0022-1295.

GASPAR, P. A. et al. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. **Journal of neurochemistry**, v. 111, n. 4, p. 891-900, 2009. ISSN 1471-4159.

GEERING, K. Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 37, n. 6, p. 387-392, 2005. ISSN 0145-479X.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. **Molecular Pharmacology**, v. 52, n. 1, p. 6-15, 1997. ISSN 1521-0111.

GIROUARD, H. et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 2545-2552, 2009. ISSN 0270-6474.

GLADDING, C. M.; RAYMOND, L. A. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 48, n. 4, p. 308-320, 2011. ISSN 1044-7431.

GLOOR, S. M. Relevance of Na, K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. **FEBS letters**, v. 412, n. 1, p. 1-4, 1997. ISSN 1873-3468.

HAIM, L. B. et al. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, 2015.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 682-696, 2010. ISSN 1471-003X.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 405-414, 2002.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 7124-7128, 1981. ISSN 0027-8424.

_____. Free radical theory of aging. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3-6, p. 257-266, 1992. ISSN 0921-8734.

HIEBER, V. et al. Differential distribution of (Na, K)-ATPase α isoforms in the central nervous system. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 253-262, 1991. ISSN 0272-4340.

ILLARIONAVA, N. B. et al. Role of Na, K-ATPase α 1 and α 2 isoforms in the support of astrocyte glutamate uptake. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98469, 2014. ISSN 1932-6203.

IMURA, A. et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS letters**, v. 565, n. 1-3, p. 143-147, 2004. ISSN 1873-3468.

_____. α -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1615-1618, 2007. ISSN 0036-8075.

JUHASZOVA, M.; BLAUSTEIN, M. P. Distinct distribution of different Na⁺ pump α subunit isoforms in plasmalemma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, n. 1, p. 524-536, 1997. ISSN 1749-6632.

KAWAMOTO, E. M. et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor- κ B in the rat hippocampus. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 1, p. 213-228, 2012. ISSN 1097-4547.

_____. Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na, K-ATPase activity. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 11, p. 1712-1720, 2008. ISSN 0197-4580.

KING, G. D.; ROSENE, D. L.; ABRAHAM, C. R. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. **Age**, v. 34, n. 6, p. 1405-1419, 2012. ISSN 0161-9152.

KINOSHITA, P.F. et al. Alpha 2 Na⁺,K⁺-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. **Scientific Reports**. No prelo.

KOH, J.-Y.; YANG, L. L.; COTMAN, C. W. β -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. **Brain research**, v. 533, n. 2, p. 315-320, 1990. ISSN 0006-8993.

KUEHL-KOVARIK, M. C. et al. Electrophysiological analysis of NMDA receptor subunit

changes in the aging mouse cortex. **Mechanisms of ageing and development**, v. 115, n. 1, p. 39-59, 2000. ISSN 0047-6374.

KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **nature**, v. 390, n. 6655, p. 45-51, 1997. ISSN 0028-0836.

KUROSU, H. et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120-6123, 2006. ISSN 0021-9258.

_____. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829-1833, 2005. ISSN 0036-8075.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.

LI, S.-A. et al. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. **Cell structure and function**, v. 29, n. 4, p. 91-99, 2004. ISSN 0386-7196.

LINGREL, J. B. Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 24, n. 3, p. 263-270, 1992. ISSN 0145-479X.

LIPTON, S. A. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. **Current drug targets**, v. 8, n. 5, p. 621-632, 2007. ISSN 1389-4501.

LIPTON, S. A. et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. 1993.

LIU, F. et al. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. **Nature cell biology**, v. 13, n. 3, p. 254-262, 2011. ISSN 1465-7392.

LIU, H. et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803-806, 2007. ISSN 0036-8075.

LIU, Y. et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2846-2857, 2007. ISSN 0270-6474.

MAGNUSSON, K. R.; BRIM, B. L.; DAS, S. R. Selective vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors during brain aging. **Frontiers in aging neuroscience**, v.

2, p. 11, 2010. ISSN 1663-4365.

MARCAIDA, G. et al. Glutamate Induces a Calcineurin-Mediated Dephosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase that Results in Its Activation in Cerebellar Neurons in Culture. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 1, p. 99-104, 1996. ISSN 1471-4159.

MARK, R. J. et al. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. **The Journal of neuroscience**, v. 15, n. 9, p. 6239-6249, 1995. ISSN 0270-6474.

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 242, n. 3, p. 626-630, 1998. ISSN 0006-291X.

MATTSON, M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, n. 1, p. 97-112, 2008. ISSN 1749-6632.

MATTSON, M. P.; LONGO, V. D.; HARVIE, M. Impact of Intermittent Fasting on Health and Disease Processes. **Ageing Research Reviews**, 2016. ISSN 1568-1637.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278-294, 2006. ISSN 1471-003X.

MAURYA, P. K.; PRAKASH, S. Decreased activity of Ca⁺⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase during aging in humans. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 131-137, 2013. ISSN 0273-2289.

MCGRAIL, K. M.; PHILLIPS, J. M.; SWEADNER, K. Immunofluorescent localization of three Na, K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na, K-ATPase. **The Journal of neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 381-391, 1991. ISSN 0270-6474.

MCKEE, M.; SCAVONE, C.; NATHANSON, J. A. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12056-12060, 1994. ISSN 0027-8424.

MOBASHERI, A. et al. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience reports**, v. 20, n. 2, p. 51-91, 2000. ISSN 0144-8463.

MOLOKANOVA, E. et al. Differential effects of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors on A β -induced nitric oxide production in cerebrocortical neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 14, p. 5023-5028, 2014. ISSN 0270-6474.

MUNGRUE, I. N.; BREDT, D. S. nNOS at a glance: implications for brain and brawn. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 13, p. 2627-2629, 2004. ISSN 0021-9533.

MUNHOZ, C. D. et al. Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. **Cell biochemistry and function**, v. 23, n. 2, p. 115-123, 2005. ISSN 1099-0844.

NAGAI, T. et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 50-52, 2003. ISSN 0892-6638.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992. ISSN 0892-6638.

NATHANSON, J. et al. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron**, v. 14, n. 4, p. 781-794, 1995. ISSN 0896-6273.

PÁL, B. Astrocytic actions on extrasynaptic neuronal currents. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, 2015.

RAO, S. D.; YIN, H. Z.; WEISS, J. H. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2627-2633, 2003. ISSN 0270-6474.

RAO, V. R.; FINKBEINER, S. NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 6, p. 284-291, 2007. ISSN 0166-2236.

RAZZAQUE, M. S. Klotho and Na⁺, K⁺-ATPase activity: solving the calcium metabolism dilemma? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 2, p. 459-461, 2008. ISSN 0931-0509.

REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Neurochemical research**, v. 28, n. 10, p. 1563-1574, 2003. ISSN 0364-3190.

REYNOLDS, I. J.; HASTINGS, T. G. Glutamate induces the production of reactive oxygen

species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 3318-3327, 1995. ISSN 0270-6474.

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure Activity Results in a Rapid Induction of Nuclear Factor- κ B in Adult but Not Juvenile Rat Limbic Structures. **Journal of neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 662-668, 1996. ISSN 1471-4159.

ROSE, E. M. et al. Glutamate transporter coupling to Na, K-ATPase. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8143-8155, 2009. ISSN 0270-6474.

ROSSI, P. et al. NMDA receptor 2 (NR2) C-terminal control of NR open probability regulates synaptic transmission and plasticity at a cerebellar synapse. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 22, p. 9687-9697, 2002. ISSN 0270-6474.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**, v. 16, n. 3, p. 675-686, 1996. ISSN 0896-6273.

_____. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron**, v. 13, n. 3, p. 713-725, 1994. ISSN 0896-6273.

RÖNICKE, R. et al. Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 12, p. 2219-2228, 2011. ISSN 0197-4580.

SANZ-CLEMENTE, A.; NICOLL, R. A.; ROCHE, K. W. Diversity in NMDA Receptor Composition Many Regulators, Many Consequences. **The Neuroscientist**, v. 19, n. 1, p. 62-75, 2013. ISSN 1073-8584.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis*. **Endocrine reviews**, v. 7, n. 3, p. 284-301, 1986. ISSN 0163-769X.

SATTLER, R. et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science**, v. 284, n. 5421, p. 1845-1848, 1999. ISSN 0036-8075.

SCAVONE, C. et al. Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na, K-ATPase activity. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 6, p. 907-916, 2005. ISSN 0197-4580.

SCHAFER, M. J. et al. Calorie restriction suppresses age-dependent hippocampal transcriptional signatures. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0133923, 2015. ISSN 1932-6203.

SHIOZAKI, M. et al. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 924-941, 2008. ISSN 0306-4522.

SHIRAKI-IIDA, T. et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. **FEBS letters**, v. 424, n. 1-2, p. 6-10, 1998. ISSN 1873-3468.

SHULL, G. E.; GREEB, J.; LINGREL, J. B. Molecular cloning of three distinct forms of the Na⁺, K⁺-ATPase. alpha.-subunit from rat brain. **Biochemistry**, v. 25, n. 25, p. 8125-8132, 1986. ISSN 0006-2960.

SIBAROV, D. A. et al. Na⁺, K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺, Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 3, p. 596-607, 2012. ISSN 1521-0103.

SKEBERDIS, V. A. et al. Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 501-510, 2006. ISSN 1097-6256.

SNYDER, E. M. et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . **Nature neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 1051-1058, 2005. ISSN 1097-6256.

SOPJANI, M. et al. Regulation of the Na⁺/K⁺ ATPase by Klotho. **FEBS letters**, v. 585, n. 12, p. 1759-1764, 2011. ISSN 1873-3468.

SUVARNA, N. et al. Ethanol alters trafficking and functional N-methyl-D-aspartate receptor NR2 subunit ratio via H-Ras. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31450-31459, 2005. ISSN 0021-9258.

SZAROMA, W.; DZIUBEK, K.; KAPUSTA, E. Effect of N-methyl-D-aspartic acid on activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and reduced glutathione level in selected organs of the mouse. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 101, n. 3, p. 377-387, 2014. ISSN 0231-424X.

TANAKA, Y.; ANDO, S. Synaptic aging as revealed by changes in membrane potential and decreased activity of Na⁺, K⁺-ATPase. **Brain research**, v. 506, n. 1, p. 46-52, 1990. ISSN 0006-8993.

TAYLOR, R. C.; DILLIN, A. Aging as an event of proteostasis collapse. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 5, p. a004440, 2011. ISSN 1943-0264.

TINGLEY, W. G. et al. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 5157-5166, 1997. ISSN 0021-9258.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010. ISSN 1521-0081.

VASCONCELOS, A. R. et al. Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na, K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 5, p. 1914-1923, 2015. ISSN 0197-4580.

VICINI, S. et al. Functional and Pharmacological Differences Between Recombinant N-Methyl-d-Aspartate Receptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 79, n. 2, p. 555-566, 1998. ISSN 0022-3077.

VIKMAN, K. S.; RYCROFT, B. K.; CHRISTIE, M. J. Switch to Ca²⁺-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 2, p. 515-527, 2008. ISSN 1469-7793.

YU, B. P. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. **Free radical biology and medicine**, v. 21, n. 5, p. 651-668, 1996. ISSN 0891-5849.

YUAN, H. et al. Context-dependent GluN2B-selective inhibitors of NMDA receptor function are neuroprotective with minimal side effects. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1305-1318, 2015. ISSN 0896-6273.

ZAMZOW, D. R. et al. An increase in the association of GluN2B containing NMDA receptors with membrane scaffolding proteins was related to memory declines during aging. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 30, p. 12300-12305, 2013. ISSN 0270-6474.

ZHOU, T. B. T. et al. Biochemical and functional characterization of the klotho-VS polymorphism implicated in aging and disease risk. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36302-36311, 2013. ISSN 0021-9258.

ZHOU, X. et al. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 33, p. 24151-24159, 2013. ISSN 0021-9258.

_____. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. **Cell death & disease**, v. 4, n. 3, p. e560, 2013.