ANA MARIA MARQUES ORELLANA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAHIPOCAMPAL DE OUABAÍNA
NA MODULAÇÃO DAS VIAS NF κ B, BDNF-CREB E WNT/B-CATENINA
AO LONGO DE UM DECURSO TEMPORAL DE 24 HORAS.**

Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2016

ANA MARIA MARQUES ORELLANA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAHIPOCAMPAL DE OUABAÍNA
NA MODULAÇÃO DAS VIAS NF κ B, BDNF-CREB E WNT/B-CATENINA
AO LONGO DE UM DECURSO TEMPORAL DE 24 HORAS.**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão Original

São Paulo
2016

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)

Marques Orellana, Ana Maria
Efeitos da administração intrahipocampal de
Ouabaína na modulação das vias NFkappaB, BDNF-CREB E
WNT/beta-CATENINA ao longo do decurso temporal de
24 horas. / Ana Maria Marques Orellana;
orientador Cristoforo Scavone. -- São Paulo, 2016.
173 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neurofarmacologia. 2. Hipocampo. 3. Ouabaína.
4. NFkappaB. 5. Wnt. I. Scavone, Cristoforo ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Maria Marques Orellana

Título da Tese: Efeitos da Administração intrahipocampal de Ouabaína na modulação das vias NFκB, BDNF-CREB e Wnt/β-CATENINA ao longo de um decurso temporal de 24 horas.

Orientador(a): Cristoforo Scavone

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 **144** nas fls. **13** 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 "*Efeitos da administração intrahipocampal da ouabaina na sinalização da proteína Wnt em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ana Maria Marques Orellana** e a especialista em laboratório **Larissa Lima**, 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 **03.12.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 04 de dezembro de 2013.

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

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

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO

O DIRETOR DO INSTITUTO OCEANOGRÁFICO
NOS TERMOS DO ARTIGO 74, PARÁGRAFO ÚNICO,
INCISO 5, ALÍNEA "B", DO
ESTATUTO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
CERTIFICA QUE

ANA MARIA MARQUES ORELLANA

DE NACIONALIDADE BRASILEIRA,
PORTADORA DA CÉDULA DE IDENTIDADE
RG Nº 34.571.732-6 SP,
NASCIDA EM 15 DE MAIO DE 1983
E NATURAL DO ESTADO DE SÃO PAULO,
CONCLUIU O

**CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA NA
MODALIDADE DE ATUALIZAÇÃO:
PROTEÇÃO RADIOLÓGICA COM ÊNFASE NO USO, PREPARO E
MANUSEIO DE FONTES RADIOATIVAS NÃO SELADAS.**

E, PARA QUE POSSA GOZAR DE TODOS OS
DIREITOS E PRERROGATIVAS LEGAIS,
OUTORGA-LHE O PRESENTE CERTIFICADO.

SÃO PAULO, 24 DE MAIO DE 2011.

PRESIDENTE DA COMISSÃO
DE CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

PROFA. DRA. ELISABETE DE
SANTIS BRAGA DA GRAÇA
SARAIVA

DIRETOR
MICHEL MICHAEOVITCH DE
MAHIQUES

***Ao meu marido, Luis A. Gatti, grande amor companheiro,
pelo incentivo e apoio integral que me dá
para seguir na carreira que amo.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, por esses anos de trabalho conjunto, de convivência agradável, de amizade, pelas coisas que me ensinou, pelas discussões científicas, pela paciência, pela confiança e principalmente pela motivação dada por sua empolgação constante.

A Profa. Dra Elisa M. Kawamoto (ICB-USP), pela convivência agradável, pelas enriquecedoras discussões científicas e pelas sugestões, sempre muito úteis.

Ao Prof. Dr. Gilberto F. Xavier (IB-USP), pela ajuda com a realização dos testes comportamentais e pelas ricas discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Luiz R.G. de Britto (ICB-USP) e ao seu grupo, em especial ao Adilson da S. Alves, que sempre estiveram prontos a ajudar com o que fosse preciso.

Aos queridos amigos do laboratório de Neurofarmacologia Molecular que tornaram esses anos tão leves e os quais hoje considero como uma família. A ajuda de todos certamente foi fundamental para a realização das mais diversas etapas do projeto. A Larissa de Sá Lima e Diana Z. Andreotti pelo apoio técnico diário, a Jacqueline Alves Leite pela ajuda direta em vários experimentos e a Paula F. Kinoshita pela ajuda e pela sua coragem, sem as quais eu jamais teria tido a oportunidade de trabalhar com a Dra Anita Aperia.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia: Selma Rigonatti, Camila Trindade, Miriam Anraku e a Mônica Nunes, que sempre foram solícitas e amáveis, por todo o apoio com os trâmites burocráticos da pós-graduação.

Aos meus pais, Amália Marques Orellana e Antonio Orellana Vilchez, que sonharam meus sonhos, e sem os quais certamente essa obra não existiria. A Márcia J. Palacios que fez minha última década mais agradável e feliz. A todos os amigos e familiares que me apoiaram sempre.

A Luis A. Gatti, pelo apoio incondicional e por dar sentido a minha vida.

As agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro necessário a realização do projeto.

Finalmente, ao Eterno.

“Percorri aquela longa estrada até a liberdade. Tentei não esmorecer; dei passos em falso pelo caminho. Mas descobri o segredo que depois de escalarmos uma grande colina, descobrimos apenas que há muitas outras colinas para escalar. Dei uma pausa agora para descansar um pouco, para apreciar a vista gloriosa ao meu redor, para relembrar a distância que percorri. Mas posso descansar apenas por um instante, pois com a liberdade vêm responsabilidades, e não me atrevo em me demorar, pois minha longa caminhada ainda não terminou.”

Nelson Mandela

RESUMO

Orellana AMM. Efeitos da administração intrahipocampal de Ouabaína na modulação das vias NFκB, BDNF-CREB e WNT/β-CATENINA ao longo de um decurso temporal de 24 horas. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A enzima NKA (Sódio Potássio Adenosina Trisfosfatase) é uma proteína de membrana altamente conservada em eucariotos que estabelece e mantém altas concentrações intracelulares de K^+ e baixas de Na^+ , através da hidrólise de uma molécula de ATP. No entanto, além de seu papel regulatório na homeostasia iônica, estudos sugerem um papel na transdução de sinal e na ativação da transcrição gênica. Na presença da ouabaína (OUA), esteróide cardiotônico endógeno, a NKA é capaz de promover a oscilação nos níveis de Ca^{2+} intracelular por interação proteína-proteína com receptores de IP3 na membrana de retículo endoplasmático, e de ativar a via da Src quinase, com consequente transativação da via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). A oscilação nos níveis de Ca^{2+} intracelular por consequência da sinalização de OUA ou do aumento da atividade sináptica em neurônios pode levar a ativação do fator de transcrição NFκB. O NFκB, no SNC, regula a expressão de genes que controlam a morte celular programada, a adesão celular, a proliferação, a inflamação e processos importantes para formação de memórias. Uma vez ativada, a via do NFκB parece ser capaz de modular a ativação de outras vias de sinalização, como a via canônica da WNT (WNT/β-CATENINA). O objetivo dessa tese foi verificar o mecanismo molecular de sinalização desencadeado pela administração de OUA 10 nM, em neurônios do hipocampo de ratos, e especificamente seus efeitos na ativação das vias de sinalização NFκB, BDNF/CREB e a via canônica da WNT/β-CATENINA, assim como as consequências morfológicas e funcionais da modulação dessas vias. Os resultados encontrados mostram que a OUA 10 nM, no hipocampo de ratos, é capaz de ativar a via da Src-ERK, PI3K-AKT, NFκB, a via canônica da WNT e aumentar a ativação de CREB e a expressão de BDNF. Além disso, verificamos em cultura primária embrionária de neurônios hipocampais, que a OUA 10 nM não aumenta a taxa de apoptose, e é capaz de evitar a morte neuronal por apoptose frente a um estímulo excitotóxico, elevando a expressão da proteína Bcl-xL. Assim a OUA parece alterar o microambiente celular favorecendo a ativação de vias que tem em comum o papel pró-sobrevivência, crescimento, diferenciação e que participam no processo de formação de memórias, em detrimento da apoptose. Esse ambiente levou ao aumento da arborização dendrítica de neurônios da região CA1 do hipocampo e giro dentado (GD) repercutindo na melhora da memória de referência espacial desses animais quando submetidos ao teste comportamental do Labirinto Aquático de Morris e a piora do processo de extinção de memória de longa duração, também conhecido como flexibilidade comportamental.

Palavras-chave: Ouabaína. Hipocampo. NFκB. BDNF. CREB. WNT. β-CATENINA.

ABSTRACT

Orellana AMM. Effects of Ouabain intrahippocampal injection in modulation of NFκB, BDNF/CREB and WNT-β-CATENIN signaling pathways in a time course of 24 hours. [thesis (PhD thesis in Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The NKA enzyme (Sodium Potassium Adenosine Trisfosfatase) is a highly conserved membrane protein in eukaryotes that establishes and maintains high intracellular concentrations of K^+ and low concentrations of Na^+ through the hydrolysis of an ATP molecule. However, in addition to its regulatory role in ion homeostasis, studies suggest a role for the enzyme in signal transduction. In the presence of ouabain (OUA), an endogenous cardiotonic steroid, NKA seems to trigger oscillations in intracellular Ca^{2+} levels, due to an interaction with IP3 receptors on endoplasmic reticulum membrane. Furthermore, OUA-NKA seems to activate the Src kinase complex with consequent transactivation of MAPK (mitogen-activated protein kinase). Indeed, the intracellular Ca^{2+} oscillation levels can lead to activation of the transcription factor NFκB. The NFκB in the CNS, regulates expression of genes controlling programmed cell death, cell adhesion, cell proliferation, inflammation and important process for memory formation. Once activated, the NFκB pathway can modulate the activation of other signaling pathways, such as the canonical WNT pathway (WNT / β-CATENIN). The aim of this thesis was to investigate the molecular mechanism of signaling triggered by the administration of OUA 10 nM in rat hippocampal neurons, specifically its effects on the activation of NFκB, BDNF/CREB and the canonical WNT /β-CATENIN signaling pathways, as well as the morphological and functional changes due to modulation of these pathways. The results suggests that OUA 10 nM in rat hippocampus, are able to activate Src-ERK pathway, PI3K-AKT, NFκB, canonical Wnt pathway and CREB/BDNF. Furthermore, it was observed that in primary neuronal cell culture, OUA was able to prevent neuronal death by apoptosis after an excitotoxic stimulus, increasing the expression of Bcl-xL protein. Thus OUA seems to alter the cellular microenvironment once it activate some signaling pathways that have in common the pro-survival role, growth, differentiation and memory formation, rather than apoptosis. This environment has led to increased neuronal dendritic branching in CA1 and dentate gyrus (DG) and to improvement of spatial reference memory of these animals when submitted to the behavioral test Morris Water Maze, leading to na imparment in memory extinction process, also known as behavioral flexibility.

Keywords: Ouabain. Hippocampus. NFκB. BDNF. CREB. WNT. B-CATENIN.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os tipos e subtipos de memória e suas regiões de processamento.	23
Figura 2 - Esquema das principais conexões do hipocampo.....	24
Figura 3 - Anatomia básica da alça trissináptica do hipocampo.	26
Figura 4 - Ilustração esquemática das regiões da formação hipocampal e a localização das células especializadas na localização espacial tridimensional.....	27
Figura 5 - Ciclo catalítico de transporte de íons pela bomba NKA.	33
Figura 6 - Estrutura da NKA.	34
Figura 7 - Esquema da sinalização por glicosídeos cardiotônicos (CTS, em inglês) através do complexo receptor NKA/Src.....	37
Figura 8 - Via de sinalização canônica do NFκB.....	39
Figura 9 - Esquema simplificado das vias de sinalização intracelular associadas à ação da proteína WNT nos receptores Frizzled (FZ)	42
Figura 10 - Esquema ilustrativo da localização das coordenadas para o implante da cânula guia durante a cirurgia de estereotaxia.	46
Figura 11 - Esquema do aparato para teste comportamental Labirinto Aquático de Morris..	56
Figura 12 - Esquema de tratamento dos neurônios hipocampais.....	59
Figura 13 - Imagem de secção coronal do cérebro de rato com coloração de Nissl.....	63
Figura 14 - Imagem digital de secções coronais de hipocampo de rato 1 hora após a infusão do traçador retrógrado Fluoro-Gold.	64
Figura 15 - Efeito da infusão da dose de OUA (10 nM) na atividade da NKA, ao longo do decurso temporal (1 h, 10 h e 24 h), em hipocampo de ratos, mostra ausência de inibição.....	65
Figura 16 - Esquema simplificado e ilustrativo da possível modulação das vias PI3K-AKT, Src-ERK e NFκB pela ligação da OUA a NKA.	66
Figura 17 - Modulação da Src pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal	67
Figura 18 - Modulação da ERK pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal.	68
Figura 19 - Modulação da P38 pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal	69
Figura 20 - Modulação da fosforilação no resíduo Serina 473 da AKT, pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal	70
Figura 21 - Modulação da via PI3K-AKT pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal	71
Figura 22 - Ensaio de EMSA para NFκB de todos os grupos de decurso temporal.....	73

Figura 23 - Ensaio de Competição e Super-shift da ativação do NFκB pela OUA (10 nM), no hipocampo de ratos	74
Figura 24 - Modulação do plkB pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot.....	75
Figura 25 - Fotomicrografia representativa dos ensaios de imunofluorescência dos cortes de hipocampo de ratos	76
Figura 26 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência dos controles negativos.....	76
Figura 27 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 do hipocampo de ratos submetidos a cirurgia porém que não receberam nenhuma infusão, grupo sham	77
Figura 28 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 do hipocampo de ratos após 1 hora da infusão de Salina 0,9%.....	78
Figura 29 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 do hipocampo de ratos após 1 hora da infusão de OUA 10 nM, camada de neurônios piramidais.....	79
Figura 30 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região do Giro Dentado (DG) do hipocampo de ratos sham.....	80
Figura 31 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região do Giro Dentado (GD) do hipocampo de ratos após 1 hora da infusão de Salina 0,9%.	81
Figura 32 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região do Giro Dentado (GD) do hipocampo de ratos após 1 h da infusão de OUA 10 nM	82
Figura 33 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham.....	83
Figura 34 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos do grupo Salina 0,9%.....	84
Figura 35 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM.	85
Figura 36 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham.....	86
Figura 37 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%	87
Figura 38 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM.	88
Figura 39 - Modulação da fosforilação de CREB (pSer133) nuclear pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot	90
Figura 40 - Efeitos da OUA 10 nM ao longo do decurso temporal sobre a ativação do CREB por Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	91

Figura 41 - Efeitos da administração da OUA (10 nM), ao longo do decurso temporal, na expressão do RNAm do gene Bdnf em hipocampo de rato	91
Figura 42 - Determinação dos níveis de expressão de BDNF após a infusão de OUA 10 nM ou Salina 0,9%, ao longo do decurso temporal (1 h, 10 h e 24 h), realizado por ensaio de ELISA.....	92
Figura 43 - Modulação da ativação da GSK-3 β pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot	94
Figura 44 - Modulação da translocação nuclear da β -CATENINA pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot	95
Figura 45 - Modulação da fosforilação da β -CATENINA pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot	96
Figura 46 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência dos controles negativos.....	97
Figura 47 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e GFAP da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham.	98
Figura 48 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e GFAP da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%, grupo 24 h	99
Figura 49 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e GFAP da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM, grupo 24 h.....	100
Figura 50 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e Iba-1, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham..	101
Figura 51 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e Iba-1, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%, grupo 24 h	102
Figura 52 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e Iba-1, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM, grupo 24 h.....	103
Figura 53 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e NeuN, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham.	104
Figura 54 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e NeuN, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%, grupo 24 h	105
Figura 55 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e NeuN, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM, grupo 24 h.....	106
Figura 56 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência dos controles negativos.....	107

Figura 57 - Análise estatística da expressão de β -CATENINA por imunofluorescência.	107
Figura 58 - Modulação dos níveis de RNAm para Axina 2 pelo tratamento com OUA, no decurso temporal, em hipocampo de ratos.	109
Figura 59 - Modulação das proteínas CICLINA D1 e c-MYC pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal	110
Figura 60 - Efeitos da administração da OUA (10 nM), ao longo do decurso temporal, na expressão do RNAm dos genes Bax e Bcl-2 em hipocampo de rato	111
Figura 61 - Análise estatística do ensaio de TUNEL de neurônios hipocampais tratados com ou sem OUA 10 nM	112
Figura 62 - Fotomicrografias da marcação de neurônios hipocampais para TUNEL	113
Figura 63 - Análise estatística do ensaio de imunofluorescência para Bcl-xL.....	114
Figura 64 - Imunofluorescência de neurônios hipocampais com marcação para Bcl-xL.....	115
Figura 65 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região CA1 do hipocampo de ratos após 7 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham	118
Figura 66 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região Giro dentado do hipocampo de ratos após 7 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham, no CA1.....	119
Figura 67 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região CA1 do hipocampo de ratos após 14 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham	120
Figura 68 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região DG do hipocampo de ratos após 14 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham, no CA1	121
Figura 69 - Esquema experimental do Labirinto Aquático de Morris.	122
Figura 70 - Treino de Memória de Referência, Teste comportamental Labirinto Aquático de Morris	123
Figura 71 - Teste de Probe de Memória de Referência, no Labirinto Aquático de Morris.....	125
Figura 72 - Teste de Memória Operacional, Labirinto Aquático de Morris..	126
Figura 73 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região CA1 do hipocampo de ratos após 21 dias da infusão de OUA 10 nM ou salina 0,9%, em animais submetidos ao teste comportamental Labirinto Aquático de Morris (LAM) ou que permaneceram no biotério (controle)	129
Figura 74 - Resumo dos resultados.	130

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Sequência dos primers para a reação de PCR semi-quantitativa.	55
Quadro 1 - Esquema dos resultados parciais do item 4.3..	72
Quadro 2 - Esquema do resumo dos resultados dos itens 4.4 e 4.5.	93
Quadro 3 - Esquema dos resultados do item 4.6.	108
Quadro 4 - Conclusão parcial dos resultados apresentados até o item 4.7.	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF – “artificial cerebrospinal fluid ”

AKT - também conhecida como proteína quinase B

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

AMPc - Adenosina Monofosfato Ciclico

APC - *adenomatous polyposis coli*

ATP - Trifosfato de adenosina

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro

Ca²⁺ - Cálcio

CA - Cornu Ammonis

CaMK - proteína quinase dependente de Ca²⁺/Calmodulina

cDNA - DNA complementar

CK1 - caseína quinase -1

CREB - Elemento de Resposta Ligado ao AMPc

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DEPC - Dietil Dicarbonato, inibidor de RNase

DG - Giro dentado

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DTT - Ditioneitol, inibidor de protease

DVL - Dishevelled

EC - córtex entorrinal

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético, agente quelante

EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal

EMSA - Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética

E.P.M - Erro padrão da média

ERK - quinase regulada por sinais extracelulares

EROs – “Espécies Reativas de Oxigênio”

FZ - receptores Frizzled

g - Força Centrífuga Relativa

Gapdh - Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GSK-3 β - Glicogênio Sintase Quinase-3 β

H⁺ - Hidrogênio

HCl - Ácido Clorídrico

HEK293 - “Human Embryonic Kidney 293 cells”
IKK - complexo de quinases do $\text{I}\kappa\text{B}$
IL-1R - receptor de interleucina-1
IL6 - Interleucina 6
IL-1 β - Interleucina 1 β
i.p. – “Intra-peritoneal”
IP3 - Inositol-trifosfato
IP3R - Receptor Inositol-trifosfato
 $\text{I}\kappa\text{B}$ - Proteína Inibitória κB
 K^+ - Potássio
KCl - Cloreto de Potássio
 KH_2PO_4 - Dihidrogenofosfato de Potássio
LEC - córtex entorrinal lateral
LPS - lipopolissacarídeo
LRP5/6 - receptor de lipoproteína de baixa densidade tipo 5 ou 6
LTD – “long term depression”
LTP – “long term potentiation”
MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEC - córtex entorrinal medial
 MgCl_2 - Cloreto de Magnésio
NaCl - Cloreto de Sódio
 Na_2HPO_4 - Fosfato de sódio dibásico
NKA - Sódio Potássio Adenosina Trisfosfatase
NEMO - Modificador essencial de NF- κB
NF κB - Fator de transcrição Nuclear kappa B
NMDA - receptores glutamatérgicos tipo N-metil-D-Aspartato
NO - Óxido Nítrico
NOSi - Óxido Nítrico Sintase induzida
OUA - Ouabaína
PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PCP - Polaridade planar celular
PCR - Reação em cadeia de polimerase
PDK - proteína quinase dependente de fosfoinositol

PEPS - Potenciais Excitatórios Pós-Sinápticos
PI3K - proteína quinase fosfatidilinositol 3 (phosphoinositide 3-kinase)
PKA - Proteína Quinase A
PKB - Proteína Quinase B
PMSF - Inibidor de Protease
PT - *Probe Test*
q.s.p. – “quantidade suficiente para”
Ras - Proteína G de baixo peso molecular
RNA - Ácido Ribonucléico
RNAm - RNA mensageiro
RT-PCR - Reação em cadeia de polimerase por Transcrição Reversa
SDS - Dodecilsulfato de Sódio
SGZ - zona subgranular
SGK1 - Quinase-1 dependente de glicocorticóide e soro
SNC - Sistema Nervoso Central
Src - Proteína Tirosina-quinase proto-oncogênica
SVZ - zona subventricular
TAD - Domínio de transativação
TBE - Tampão Tris- Borato - EDTA
TBS - Tampão Tris-Salina
TCF/LEF - Fator promotor de célula T/linfócito
TGF- β - Fator de Crescimento Transformante beta
TLR - Receptor do tipo Toll
TNF - Fator de Necrose Tumoral
TNFR - receptor do fator de necrose tumoral
TTBS - Tampão Tris-salina com *Tween-20*
U.A – “Unidade arbitrária”
UV – “Luz Ultra-violeta”
VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O Hipocampo e a Memória	21
1.1.1 A Sinalização glutamatérgica, CREB e BDNF	29
1.1.2 Excitotoxicidade	30
1.2 NKA (Na⁺,K⁺-ATPase)	32
1.2.1 A Ouabaína (OUA) e a NKA como transdutora de sinal	35
1.3 O Fator Nuclear Kappa B (NFκB)	38
1.4 GSK3-β e a via Canônica da WNT/β-CATENINA	40
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Animais	45
3.2 Cirurgias de Estereotaxia para implante de cânula guia no hipocampo dos ratos	45
3.3 Infusões de Ouabaína (OUA) ou Salina 0,9%	46
3.4 Perfusão Transcardíaca e coloração de Nissl	47
3.5 Infusão de traçador fluorescente para validação da posição das cânulas	47
3.6 Ensaios de Imunofluorescência para tecido	48
3.7 Método de Coloração de Golgi-Cox	48
3.8 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares	49
3.9 Determinação da concentração de proteínas	50
3.10 Ensaio de Western Blot	50
3.11 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	51
3.12 Determinação da atividade da NKA	52
3.13 Ensaios de Imunoabsorção enzimática (ELISA) para determinação da expressão de BDNF	53
3.14 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR)	53
3.15 Teste comportamental: Labirinto Aquático de Morris	55
3.15.1 Treino na tarefa de memória de referência espacial	56
3.15.2 “Probe Test”	57
3.15.3 Teste de Memória Operacional	57
3.16 Cultura primária embrionária de neurônios hipocampais	58
3.16.1 Tratamento das células	59
3.17 TUNEL	60
3.18 Ensaio de Imunofluorescência para Bax e Bcl-xL, em cultura de células hipocampais	60
3.18.1 Microesferas como padrão de intensidade de fluorescência	61
3.19 Análises dos Resultados	62

4	RESULTADOS	63
4.1	Análise Histológica da posição das cânulas e infusão do traçador fluorescente	63
4.2	Determinação da atividade da NKA	65
4.3	OUA-NKA e a modulação de vias como a Src, PI3K-AKT e MAPK-ERK ao longo do decurso temporal, por ensaio de Western Blot	66
4.4	Perfil de modulação da via do NF κ B pela OUA 10 nM ao longo do decurso temporal, por EMSA, Imunofluorescência e Western Blot	72
4.5	Ativação do fator de transcrição CREB pela OUA 10 nM e aumento da expressão de BDNF, por ensaio de EMSA, Western Blot, PCR semi-quantitativo e ELISA	89
4.6	Modulação da via AKT-GSK-3 β pela OUA 10 nM e da via canônica da WNT, ao longo do decurso temporal, por ensaio de Western Blot, Imunofluorescência e RT-PCR em tempo Real	94
4.7	OUA 10 nM como droga anti-apoptótica	110
4.7.1	<i>Resultados no modelo de infusão intrahipocampal de OUA 10 nM, ou Salina 0,9% no decurso temporal</i>	110
4.7.2	<i>Resultados do tratamento de OUA 10 nM em modelo de cultura primária embrionária de hipocampo de rato, frente a um estímulo excitotóxico (tratamento com NMDA)</i>	112
4.8	Coloração de Golgi Cox: OUA aumenta a arborização dendrítica	117
4.9	O Labirinto Aquático de Morris	122
4.9.1	<i>Resultados do Treino da Memória de Referência</i>	123
4.9.2	<i>Resultados do Teste de Probe</i>	124
4.9.3	<i>Memória de Trabalho</i>	126
4.9.4	<i>Coloração de Golgi Cox comparativa entre os animais submetidos ou não ao teste comportamental</i>	127
4.10	Resumo dos Resultados	130
5	DISCUSSÃO	131
5.1	A administração de OUA 10 nM não altera a atividade da NKA	131
5.2	A OUA sinaliza pela via da Src-ERK1/2 e pela via MAPK-AKT	132
5.3	OUA ativa a via do NF κ B	133
5.4	OUA ativa CREB/BDNF	135
5.5	A OUA modula a atividade da GSK-3 β e a via canônica da WNT	137
5.6	Aumento da complexidade da árvore dendrítica dos neurônios da região CA1 do hipocampo	140
5.7	OUA melhora memória de referência espacial e piora a extinção de memórias	142
5.8	O papel anti-apoptótico da OUA	146
6	CONCLUSÃO	149
	REFERÊNCIAS	150

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Hipocampo e a Memória

O hipocampo é uma estrutura filogeneticamente conservada e constituída de três camadas corticais denominadas de Cornu Ammonis (CA), subdivididas em CA1, CA2 e CA3, pelas características morfológicas e de conexões sinápticas (1). O hipocampo está inserido na formação hipocampal que é composta pelas três regiões do CA, pelo giro dentado (GD), pelo complexo subicular e pelo córtex entorrinal (EC) (2). À formação hipocampal, genericamente chamada de hipocampo é atribuída um papel fundamental no armazenamento de memórias (3).

De maneira geral, o aprendizado pode ser caracterizado por uma mudança de comportamento resultante da aquisição de novos conhecimentos acerca do mundo (4, 5). O aprendizado só é possível graças à existência de um processo de codificação desse conhecimento, que é armazenado e evocado, e ao qual chamamos memória (5, 6). De maneira simplista pode-se dizer que a aquisição de novos conhecimentos faz com que ocorram mudanças nos padrões de atividade neuronais aumentando a força de algumas sinapses, e a memória é a capacidade de reativação das conexões sinápticas alteradas (7).

A memória pode ser classificada de acordo com o seu curso temporal, como de curta ou longa duração e ainda pela natureza da informação.

De maneira geral, a memória de curta duração pode ser dividida em duas: a memória de curta duração propriamente dita (*short-term memory* - STM), e a memória operacional (8-10). Ambas tem capacidade limitada, são transitórias, e são importantes para completar uma tarefa momentânea, com a diferença de que a memória operacional compreende um sistema de grande complexidade (11).

A memória de curta duração pode relacionar-se com informações que o indivíduo adquire conscientemente ou não. Um exemplo utilizado por Cowan para descrever memória de curta duração evocada sem a intervenção consciente é uma situação em que um indivíduo de uma determinada região conversa com uma pessoa de outra localidade com sotaque pronunciado. Após algum tempo de conversa, e de forma não intencional, o indivíduo começa a expressar o sotaque do outro em sua fala (9). A memória de curta duração tem capacidade de envolver eventos sensoriais, assim como também abrange a memorização de movimentos,

dígitos, palavras, nomes e outras informações por um curto período de tempo (12), no limite de 4 a 7 porções de informações (10).

A memória operacional foi descrita como uma memória distinta da memória de curta duração, por Baddeley e Hitch, em 1972, embora as informações também sejam armazenadas por um curto período de tempo. No modelo proposto por eles, a memória operacional compreenderia uma central executiva auxiliada por dois sistemas de suporte diferentes que juntos seriam responsáveis por arquivar temporariamente e manipular as informações de natureza fonológica e de natureza vívido-espacial. Alguns anos mais tarde, Baddeley inseriu mais um elemento em seu modelo, o retentor episódico (13), que seria responsável por tornar conscientes as memórias de longa duração evocadas, complementando as ações da central executiva que integraria as informações mantidas pelos sistemas de suporte com informações da memória de longa duração, sendo, portanto a responsável pela capacidade de planejamento e seleção de estratégias (4, 14). Exemplos de situações que utilizam a memória operacional são tarefas mais complexas que demandam velocidade de raciocínio e atenção, como solucionar operações matemáticas, realizar cálculos mentalmente, completar palavras, rotacionar letras mentalmente e outras tarefas que de certa forma abrangem a memória de curta duração, mas que demandam acesso a conhecimentos prévios e uma complexidade maior na execução (10).

Assim, alguns autores sugerem que a memória de curta duração, a memória operacional e a memória de longa duração pertencem e são controladas por diferentes subsistemas cerebrais, que podem ou não pertencer às mesmas estruturas, envolvendo uma grande variedade de mecanismos moleculares (8, 10). No entanto, existem ligações bastante evidentes entre os sistemas, no córtex pré-frontal existe uma ligação entre a memória de longa duração e a memória operacional, e entre a memória operacional e a memória de curta duração nas células piramidais da camada CA1 do hipocampo e no córtex parietal e entorrinal (8, 15).

A memória de longa duração divide-se em duas formas: a memória implícita (não declarativa ou de procedimentos) e a explícita (ou declarativa). A memória implícita é uma forma inconsciente de memória e manifesta-se de forma automática como aprendizado de memórias motoras, memória de hábitos e condicionamentos e

não será abordada aqui. Já a memória explícita é altamente flexível, com evocação deliberada e consciente de conhecimentos de fatos e acerca de pessoas, lugares e coisas. A memória explícita divide-se em memória episódica e memória semântica. A memória episódica é a que constitui nossas experiências pessoais, autobiográfica e a memória semântica é a utilizada para o aprendizado de novas palavras e conceitos (4, 5, 10).

Figura 1 – Os tipos e subtipos de memória e suas regiões de processamento. A memória explícita se divide em memória episódica e semântica. A primeira constitui nossas experiências pessoais da vida, enquanto que a semântica é aquela utilizada no aprendizado de novas palavras ou conceitos. A memória explícita não se limita a uma única estrutura cerebral, mas ao contrário disso, depende da interação entre estruturas do lobo temporal medial e os córtices associativos. Já a memória implícita manifesta-se geralmente de forma automática, com pouco processamento consciente, e divide-se em: memória de hábitos e habilidades (dependente de estriado), memória de repetição ou representação perceptiva também chamada de pré-ativação, na qual ocorre um reconhecimento mais rápido de um objeto ou palavra em uma segunda exposição, independente da recordação consciente (dependente de néocórtex), e os condicionamentos comportamentais que poderão envolver amígdala, cerebelo e vias reflexas para a resposta. Adaptada de Helene e Xavier, 2003 (4).

O lobo temporal medial, em especial a região CA1 do hipocampo desempenha um papel fundamental na formação das memórias explícitas,

juntamente com o córtex entorrinal que emite e recebe fibras de vários núcleos como o septo medial, o córtex pré-frontal mediolateral (fundamental para o processamento da memória operacional) do córtex parietal associativo, do córtex sensorial e da amígdala (16, 17).

Figura 2 - Esquema das principais conexões do hipocampo. O esquema ilustra a complexidade da rede de comunicação nervosa entre as principais estruturas envolvidas com a codificação, armazenamento, consolidação e evocação de memórias. O hipocampo faz conexões e recebe conexões diretas de estruturas como amígdala e córtex entorrinal. O córtex entorrinal, além do hipocampo, faz conexões e recebe inervações do córtex perirrinal e parahipocampal, que por sua vez envia e recebe inervações do lobo frontal, temporal e parietal. O lobo frontal envia e recebe fibras do córtex entorrinal e do Tálamo, que também se comunica com o córtex perirrinal. O tálamo recebe inervações do hipocampo. O lobo parietal, por sua vez, envia inervações para o córtex entorrinal e para o hipocampo. Adaptada de Nadel e Hardt, 2010 (16).

No entanto, diferentes regiões do lobo temporal medial parecem desempenhar papéis diferentes. Algumas áreas do circuito do lobo temporal medial parecem ser especialmente importantes para o reconhecimento de objetos, o que pode ser evidenciado frente a uma lesão limitada ao córtex perirrinal que produziu um déficit de reconhecimento de objetos muito mais pronunciado quando comparado a uma lesão seletiva do hipocampo (5). Em contrapartida, o hipocampo parece ser relativamente mais importante para a representação espacial que para o

reconhecimento de objetos, pois em ratos e camundongos, lesões de hipocampo interferem na memória espacial e de contexto (5, 18, 19).

As células piramidais da região CA1 possuem uma característica bastante interessante que é sua capacidade de disparo em localidades específicas do ambiente. O estudo dessas células iniciou-se com o grupo de O'Keefe e Dostrovsky em 1971, quando descobriram as "células de lugar" (20). Estudos posteriores, no entanto, mostraram uma importante representação de inúmeros detalhes do ambiente nos neurônios do CA1, como a textura do piso, odor do ambiente, cores e formas da configuração experimental, passagem do tempo e estado motivacional (21).

Além disso, o circuito córtex-hipocampo é responsável por mediar o processo de armazenamento de memórias associativas específicas, em partes, em decorrência de alterações de longa duração na plasticidade sináptica (22). A informação do córtex entorrinal chega aos neurônios da camada CA1 do hipocampo por meio de duas vias excitatórias, chamadas perforantes: uma via direta e uma via indireta (5). A via direta tem suas origens nos neurônios da camada III do córtex entorrinal, e seus axônios estabelecem sinapses nos dendritos apicais mais distais dos neurônios de CA1. Na via indireta, a informação dos neurônios da camada II do córtex entorrinal chega aos neurônios da região CA1 pela via trissináptica. Os axônios de neurônios da camada II do córtex entorrinal projetam-se pela via perforante para células granulares do giro dentado (DG), que por sua vez projetam seus axônios na via das fibras musgosas, excitando células piramidais na região CA3 do hipocampo, e finalmente, os axônios dos neurônios da região CA3 se projetam pela via colateral de Schaffer para estabelecer sinapses excitatórias nas regiões mais próximas dos dendritos das células piramidais de CA1 (3, 5, 20, 23, 24).

Embora as projeções excitatórias do córtex entorrinal para a região CA1 do hipocampo sejam as mais estudadas, recentemente a literatura tem demonstrado a existência e a importância de projeções inibitórias de longas distâncias, compostas por fibras gabaérgicas que são capazes de inibir a inibição dos interneurônios da região CA1, garantindo maior especificidade das memórias formadas (22, 25).

Figura 3 - Anatomia básica da alça trissináptica do hipocampo. A via perforante corresponde ao maior feixe de chegada de axônios ao hipocampo, integrando informações sensoriais polimodais provenientes das camadas II, III e IV do córtex entorrinal fazendo sinapses diretas com os neurônios piramidais da camada CA1 ou com o giro dentado (DG) compondo a via trissináptica. Na via trissináptica, os axônios da via perforante fazem conexões excitatórias com os dendritos das células granulares, que por sua vez se projetam através de seus axônios (fibras musgosas) para os dendritos das células piramidais proximais da camada CA3 que se projetam aos dendritos das células piramidais da camada CA1 pelas fibras colaterais de Schaffer. O hipocampo também possui uma grande diversidade de neurônios inibitórios, não ilustrados na figura. Adaptada de Neves et al., 2008 (23).

Ambas as vias são fundamentais para o aprendizado e memória normais. Estudos sugerem que lesões na via direta possam prejudicar o processo de consolidação das memórias enquanto que lesões na via indireta limitam a capacidade de um camundongo desempenhar uma tarefa complexa envolvendo aprendizado e memória espacial (5).

Além disso, estudos sugerem que o córtex entorrinal é anatomicamente dividido em 2 partes distintas: o córtex entorrinal lateral (*lateral entorhinal cortex* - LEC) e o córtex entorrinal medial (*medial entorhinal cortex*- MEC) (21, 26). Embora essas duas regiões estejam localizadas muito próximas e dividam algumas propriedades, elas processam informações distintas. As células de LEC, por exemplo, são fortemente moduladas por odores (27), e fazem a associação de objetos a eventos presentes ou passados (28, 29). As células de MEC contêm um conjunto codificador de mapas métricos bidimensionais da localização espacial

relativa do animal, sendo que os elementos que compõe esse mapa são chamados de neurônios de grade (*grid cells*) (30, 31). A rede de conexões neuronais do MEC contempla neurônios na região do subículo posterior que sinalizam em função da direção da cabeça do animal no plano horizontal, independente de seu comportamento e localização no ambiente (31-34) e comunicam-se ainda com as células entorrinais que disparam quando o animal está próximo à fronteira entre ambientes ou ainda a obstáculos físicos como uma parede, por exemplo, chamadas de células de fronteira (35, 36).

Figura 4 - Ilustração esquemática das regiões da formação hipocampal e a localização das células especializadas na localização espacial tridimensional. Da direita para a esquerda, Cornu Ammonis (CA) 1, 2 e 3, sendo que na região CA1 dorsal localizam-se as células de lugar. DG: giro dentado. O CA1 se projeta para o Subículo (S), onde se localizam as células de fronteira. O S por sua vez se projeta para o pré-subículo (PrS) e para o parasubículo (PaS) onde estão localizadas as células de direção de cabeça. Ambas as regiões PrS e PaS se projetam para o córtex entorrinal (EC) onde localizam-se as células de grade e de fronteira. Fim: fimbria e ab: alveus. Adaptada de O'Keefe, 2014 (24).

Assim, a conectividade diferencial nas regiões da camada CA1 do hipocampo com o córtex entorrinal coopera para gerar a diversidade das propriedades de codificação observada ao longo do eixo transversal do hipocampo (21). Embora a codificação espacial seja representada ao longo de todo CA1, a maior taxa de disparos para esse tipo de codificação ocorre na região proximal do hipocampo, quando comparada à taxa de disparos na região distal, que por sua vez,

é maior quando informações a cerca da identidade de objetos e odores se associam a localização espacial (37-39). Trabalhos posteriores sugeriram que além de haver uma heterogeneidade na codificação ao longo do eixo transversal, também existiria uma diversidade de codificação ao longo do eixo longitudinal (dorso-ventral do hipocampo) (40, 41), pois lesões hipocâmpais restritas a região dorsal do hipocampo prejudicam claramente o aprendizado espacial, enquanto que a região ventral parece ser responsável por respostas emocionais (40, 42). Essa característica se justificaria pelo fato de que a porção ventral é mais densamente conectada a amígdala, ao hipotálamo endócrino e ao núcleo autonômico (43, 44).

Um trabalho recente mostrou ainda que existem diferenças eletrofisiológicas proeminentes entre as células piramidais CA1 superficiais e profundas (19). As células profundas parecem mais ativas e propícias a disparos quando comparadas as células superficiais (45, 46). Esses achados demonstram que as células superficiais provêm um mapa mais estável do ambiente enquanto que as células profundas provem uma representação mais flexível passível de ser moldada pelo aprendizado sobre as características salientes do ambiente (19). Além disso, foi descrito que tarefas que demandam atenção afetam fortemente a estabilidade e a seletividade dos mapas de lugares, sendo a magnitude desses efeitos ainda maior nas células piramidais profundas que são influenciadas pela zona de recompensa (19, 47).

No processo de aprendizado e na formação das memórias tanto o aumento quanto a diminuição da eficiência das sinapses, representadas pela LTP (*Long term potentiation*) e LTD (*Long term Depression*) respectivamente, são importantes, sendo que a LTP está mais relacionada à codificação de memórias, e a LTD está mais relacionada à modificação ou eliminação de uma informação previamente aprendida. Assim, tratamentos farmacológicos que perturbam a formação da LTD claramente prejudicam a reversão de aprendizados e a flexibilidade de comportamento que se caracteriza pelo enfraquecimento de uma memória frente a uma nova informação aprendida (48, 49). A LTD parece ser necessária para despoticizar as sinapses de memórias prévias permitindo a sobreposição sináptica para armazenamento de novas memórias (48, 50). As formas de LTP e LTD associadas a aquisição e retenção de memória espacial duram de dias a semanas (51, 52).

1.1.1 A Sinalização glutamatérgica, CREB e BDNF

Na mesma época em que as células de lugar foram descobertas, Timothy Bliss e Terje Lomo foram os primeiros a observar que a via trissináptica era notavelmente sensível à atividade elétrica prévia. Eles observaram que uma breve sequência de estímulos de alta frequência (tétano) produzia uma facilitação sináptica chamada de LTP (potencial de longa duração) e um aumento de longa duração na amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) nos neurônios granulares do DG (53). Tanto nas sinapses da via perforantes provenientes do córtex entorrinal para o DG quanto nas sinapses da via colateral de Schaffer provenientes de CA3 para CA1, a LTP segue a regra do postulado de Hebb no qual é necessário haver atividade pré-sináptica seguida por um curto de intervalo de tempo de atividade pós-sináptica, ou seja, sinapses associativas (54). Isso é garantido pela dinâmica de sinalização dos receptores glutamatérgicos do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), presentes nessas regiões (5). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) e em condições fisiológicas é fundamental para a plasticidade sináptica, desenvolvimento neural e para processos de aprendizado e memória (55).

Para que a indução do LTP ocorra na região CA1 do hipocampo quatro fatores pós-sinápticos precisam acontecer: despolarização, ativação de receptores tipo NMDA, influxo de Ca^{2+} e ativação pelo Ca^{2+} de outros sistemas de segundos mensageiros (56). Assim, estímulos consecutivos levam ao LTP persistente, sinalizando o processo de transição da memória de curta duração para a memória de longa duração, que é chamado de consolidação. Para a consolidação das memórias acontecer a transcrição gênica é ativada, assim como a síntese de novas proteínas e o crescimento de conexões sinápticas (57). A estimulação repetida ativa a adenilil ciclase (AC) e promove o aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) levando a liberação das subunidades catalíticas da proteína quinase A (PKA) (58), responsável por ativar a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e suas vias subsequentes comumente associadas ao crescimento celular. Tanto a MAPK quanto a PKA vão translocar para o núcleo e fosforilar o CREB (elemento de resposta ligado ao AMPC), ativando o fator de transcrição CREB-1, que se ligará ao

CRE e também fosforilando o CREB-2 inibitório, permitindo que se desligue dos sítios de CRE (59).

Em resposta a estimulação sináptica de alta frequência, o CREB é capaz de levar a liberação do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), que é sintetizado no hipotálamo (60-63). O BDNF faz parte da família das neurotrofinas (64). As proteínas dessa família foram consideradas neurotrofinas porque inicialmente identificou-se que eram capazes de promover a sobrevivência e o crescimento de neurônios simpáticos e sensoriais durante o desenvolvimento (63). Devido a diferente localização e expressão de seus receptores, as neurotrofinas podem realizar diversas funções celulares em diferentes tipos neuronais (65, 66). Ao BDNF se atribui papéis no desenvolvimento, na diferenciação de novos neurônios (62, 67, 68), e na sobrevivência neuronal (62, 69-71), assim como na promoção de potenciais de longa duração (*long term potentiation*-LTP) que são fundamentais para a formação de memórias de longo prazo (72-74).

1.1.2 Excitotoxicidade

Em condições patológicas, o aumento da liberação de glutamato nas sinapses provoca a hiperativação dos receptores glutamatérgicos, e dependendo da intensidade da hiperativação, pode levar a morte celular por um processo chamado de excitotoxicidade. O processo de excitotoxicidade está presente em situações como o acidente vascular encefálico, o traumatismo craniano, e em algumas doenças neurodegenerativas como Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (75-79).

Além disso, não apenas o glutamato pode levar a excitotoxicidade, mas vários metabólitos endógenos como ácido aspártico, ácido quinolínico (QA) dentre outros, e metabólitos exógenos como o NMDA e o cainato (KA) que agem como agonistas de receptores glutamatérgicos (78). Os receptores de glutamato são classificados em três classes de receptores ionotrópicos e três classes de receptores metabotrópicos principais. Os receptores ionotrópicos são representados pelos receptores NMDA, AMPA e cainato (80, 81).

A sinalização através do receptor NMDA tem um papel importante no processo de excitotoxicidade pelas próprias características intrínsecas do receptor que é altamente permeável aos íons Zn^{2+} , Na^{+} , K^{+} e Ca^{2+} , permitindo assim, frente a uma hiperativação, um influxo massivo de Ca^{2+} para o meio intracelular (82). Os receptores de NMDA são hetero-oligoméricos e podem ser compostos por até 3

estruturas diferentes: NMDAR1 (GluN1), NMDAR2 (GluN2) ou NMDAR3 (GluN3). Durante o potencial de repouso da membrana, o poro do receptor NMDA está bloqueado por íons Mg^{2+} e apenas com o aumento da atividade sináptica alcançando um limiar mínimo necessário, associado à presença de seus ligantes é que o Mg^{2+} é removido do poro permitindo que ocorra o influxo de íons Ca^{2+} para o meio intracelular, levando a despolarização pós-sináptica e ao potencial de ação no neurônio pós-sináptico (78).

No entanto, durante o processo de excitotoxicidade, a hiperativação dos receptores NMDA leva a perda da homeostasia iônica pelo excessivo influxo de Ca^{2+} , consequentemente levando a despolarização do potencial de membrana das mitocôndrias ($\Delta\psi_m$), o que resulta na morte celular por necrose ou apoptose (78, 79). Se a hiperativação dos receptores de NMDA ocorrer por um período de tempo prolongado, a perda da homeostasia iônica celular torna-se irreversível, os níveis de ATP nas células são depletados e a célula entra em necrose. Por outro lado, um grande influxo de Ca^{2+} transitório resulta num desbalanço iônico menos severo e, portanto, passível de reversão. Mesmo assim, o aumento no influxo de Ca^{2+} nas mitocôndrias pode iniciar um processo de estresse oxidativo que culmina com um desbalanço tardio dos níveis de Ca^{2+} (*delayed calcium deregulation*-DCD), que representa a falência do sistema na tentativa de restaurar a homeostasia iônica, ativando cascatas de sinalização celular que levam a apoptose (78, 79, 83).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, assim classificada pelas características a ela conferidas de um processo de demolição celular organizado. A apoptose inicia-se por diferentes cascatas de sinalização, sendo duas mais conhecidas, a via intrínseca (dependente de mitocôndria) e a via extrínseca (dependente da ativação de receptores de morte) que culminam com a ativação de proteases chamadas de caspases, que são as proteínas efetivadoras do processo de demolição (84-86). Na via intrínseca, a ativação das caspases ocorre com a liberação do citocromo C pela mitocôndria em falência energética (87, 88). A integridade mitocondrial é controlada por uma família de proteínas chamada Bcl-2, que inclui proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL, por exemplo, e proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak dentre outras, que podem tanto promover quanto impedir a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol (86, 89, 90).

Em neurônios, o Bax normalmente está localizado no citosol, mas frente a um estímulo apoptótico, pode sofrer mudanças conformacionais formando oligômeros que se translocam e se ligam a membrana externa da mitocôndria (79, 91), atuando na formação de poros que favorecem a liberação do citocromo C e a ativação das caspases (79, 91-95) ou da calpaina I (79). Por outro lado, descobertas recentes apontam para o Bcl-xL como um importante regulador da eficiência bioenergética da mitocôndria, da liberação de neurotransmissores e no processo de reciclagem de vesículas sinápticas, além de atuar impedindo a formação de oligômeros de Bax (96), o que leva a conclusão de que o balanço apoptótico realizado pela família das proteínas Bcl-2 é uma operação complexa e integrada a outras importantes vias celulares.

1.2 NKA (Na^+, K^+ -ATPase)

Em 1997 o Prêmio Nobel da Química foi dedicado ao pesquisador dinamarquês Jens Christian Skou, pela sua descoberta no ano de 1957 da enzima Na^+, K^+ -ATPase (NKA), hoje também conhecida como bomba de Na^+, K^+ (97, 98). No mesmo ano, foi descrito que a enzima NKA era capaz de estabelecer e manter altas concentrações intracelulares de K^+ e baixas de Na^+ , na estequiometria 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular através da hidrólise de uma molécula de ATP (99) gerando um gradiente eletroquímico já observado há alguns anos como alvo de inibição dos esteróides cardiotônicos extraídos de plantas como as do gênero *Strophanthus* (100, 101).

O que Skou não sabia na época é que a NKA era apenas a primeira de uma família de bombas chamadas ATPases do tipo P (*P-type ATPases*). As bombas ATPase do tipo P pertencem a uma grande família de proteínas de membrana que tem em comum a geração de um intermediário fosforilado, no resíduo do aminoácido aspartato (Asp), durante o ciclo catalítico, realizando os processos de transporte em todos os organismos vivos (102). Nessa família estão incluídas a Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA) e a H^+, K^+ -ATPase gástrica, dentre outras 200 já descritas (103, 104).

O gradiente eletroquímico gerado pela atividade da NKA é fundamental para manter o balanço osmótico das células, o potencial de repouso das membranas e a propriedade excitatória das células musculares e nervosas (105, 106), além de ser

responsável pela geração de energia que mantém ativo os transportadores secundários acoplados ao Na^+ , tais como a translocação de íons (H^+ , Ca^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-}), substratos (glicose e aminoácidos) e neurotransmissores por meio da membrana plasmática (106-108).

O ciclo catalítico da NKA pode ser considerado bifásico, pois adquire dois estados conformacionais principais chamados de E1 e E2 (109). No estado E1, os três resíduos que compõem os sítios de ligação de cátions estão voltados para o citoplasma e apresentam alta afinidade por Na^+ . A ligação desses três íons irá levar a mudanças conformacionais que favorecerão a transferência do grupo fosfato proveniente do ATP para um resíduo Asp da subunidade α , e a oclusão dos sítios de ligação dos íons Na^+ dentro da membrana, estado denominado $\text{E1P} \cdot 3\text{Na}^+$ (110, 111). Sequencialmente ocorrerá a abertura com exposição dos sítios de ligação iônica ao meio extracelular favorecendo a liberação dos íons Na^+ em decorrência de novas alterações conformacionais denominadas de estado E2 que aumentam a afinidade pelos íons K^+ a serem transportados. Com a ligação de dois íons K^+ a afinidade pelo resíduo fosfato doado pelo ATP diminui e ocorre a hidrólise responsável pela desfosforilação da enzima que levará a oclusão dos íons K^+ , reiniciando novo ciclo com a liberação do K^+ . Essa última etapa conhecida como $\text{E2} \cdot 2\text{K}^+$ ocorre lentamente devido a ausência de ATP. A figura 5 ilustra o ciclo de transporte da NKA (110).

Figura 5 - Ciclo catalítico de transporte de íons pela bomba NKA. Fonte: Toyoshima et al., 2011 (110).

A NKA é hetero-oligômera, portanto, compostas por três subunidades: α , β e γ , conforme ilustrado na figura 6 (98, 104, 112-114). A subunidade α é responsável pelas propriedades catalítica e de transporte da enzima, pois contém sítios de

ligação para os íons, para os glicosídeos cardiotônicos, como a Ouabaína (OUA) e para o ATP, apresentando-se com 10 domínios transmembrana (113, 115, 116). Já a subunidade β modula a afinidade da enzima pelos íons e favorece a inserção da subunidade α na membrana. Apresenta-se com um único domínio transmembrana e um ectodomínio altamente glicosilado (108, 117). Para suprir a necessidade específica de cada tecido e dos diversos processos a eles relacionados, a NKA adotou a estratégia da versatilidade funcional (108). São conhecidas quatro isoformas da subunidade α : 1, 2, 3 e 4 (118) e três da subunidade β : 1, 2, 3 (106, 119). A terceira subunidade da NKA é a γ (120, 121), que pertence a família das proteínas FXYD, composta por 7 isoformas (121) e que parece atuar modulando a afinidade aparente pelos íons e pelo ATP, embora isso ainda não esteja bem estabelecido (106, 119, 122, 123).

Figura 6 - Estrutura da NKA. Fonte: Böttger et al., 2012 (124).

Uma grande vantagem evolutiva da existência de diferentes isoformas, codificadas por genes diferentes, é que tanto a síntese quanto a degradação podem ser controladas independentemente, assim como sua atividade pode ser modulada separadamente (107). De forma geral, a NKA possui um perfil tecido específico de expressão, pois se observa que a combinação $\alpha_1\beta_1$ é encontrada em quase todos os tecidos do corpo, sendo a principal isoenzima do rim, enquanto que no sistema nervoso central (SNC), os neurônios são os sítios de maior abundância da subunidade α_3 e as células da glia expressam preferencialmente a α_2 . A subunidade

β_2 é abundante em músculo esquelético, glândula pineal e tecidos nervosos, enquanto que β_3 é abundante em testículos, retina, fígado e pulmão (106). A isoforma α_1 é relativamente resistente a OUA e a espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto que as isoformas α_2 e α_3 são sensíveis à ouabaína e a ROS (125). O perfil de expressão das isoformas pode variar mediante desenvolvimento, alterações hormonais e durante processos patológicos (105).

Além de seu papel como bomba iônica, a NKA também atua como um receptor farmacológico dos digitálicos ativando cascatas de transdução de sinal (126-128).

1.2.1 A Ouabaína (OUA) e a NKA como transdutora de sinal

A OUA é um glicosídeo cardiotônico extraído da árvore africana *Ouabaio* e da planta *Strophanthus gratus*. Após uma série de estudos mostrarem que a adição exógena de esteróides cardiotônicos às células animais resultava em numerosas respostas fisiológicas e bioquímicas (129-132), e devido a grande afinidade da OUA pela NKA, alguns grupos passaram a acreditar na possibilidade de existir alguma substância endógena similar a OUA. Assim em 1991, Hamlyn et al. e Mathews et al., demonstraram a presença de uma substância no plasma a qual eles foram incapazes de distinguir da OUA de origem vegetal (133). Esse achado foi confirmado por métodos avançados como espectroscopia por ressonância magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$) e espectrometria de massa (134-137). Assim, a OUA passou a ser considerada um hormônio de mamíferos, produzida no córtex da adrenal e no hipotálamo (130, 135-138), sendo encontrada circulante inclusive no líquido cefalorraquidiano (139).

Níveis elevados de OUA circulantes, ainda na faixa de nanomolar, estão associados a alguns processos patológicos como falência renal crônica, hiperaldosteronismo, falência cardíaca congestiva e pré-eclâmpsia (140-142). No entanto, também podem associar-se às condições de crescimento e desenvolvimento, à gestação e à vida neonatal (130, 142, 143). Especialmente no período de desenvolvimento fetal, a ligação da OUA a NKA parece desempenhar efeito protetor frente a situações deletérias como falta de nutrientes, conforme descrito em estudo feito com células renais (144), podendo inclusive promover arborização dendrítica em neurônios corticais embrionários (145). Nesse contexto, a

OUA em concentrações compatíveis com suas ações fisiológicas (ordem de nM) parece desempenhar uma ação importante na atividade de fatores de crescimento (139, 140, 146, 147).

Uma das vias de sinalização ativadas pela interação entre a NKA e a OUA é a via do Inositol-trifosfato/Cálcio ($IP3/Ca^{2+}$). Quando a OUA se liga a NKA promove uma mudança conformacional que favorece a interação direta de uma região conservada da porção N- terminal da subunidade α com a porção N-terminal do receptor de canal de Ca^{2+} $IP3R$, presente no retículo endoplasmático, resultando em abertura e fechamento ritmados do canal (148, 149). Além dessa interação, a OUA, é capaz de promover a oscilação de níveis de Ca^{2+} , por via dos canais de Ca^{2+} -voltage dependente (150, 151). Apenas doses de OUA que não inibem a atividade da NKA são capazes de gerar oscilações de baixa frequência nos níveis de Ca^{2+} , promovendo como segundo mensageiro a ativação da via de sinalização do $NF\kappa B$ (129, 148, 149). O sistema de sinalização por Ca^{2+} tem alto grau de especificidade uma vez que as células são capazes de decodificar diferenças na concentração intracelular desse íon, assim como diferenças na frequência e amplitude das oscilações provocadas pela mudança nas concentrações intracelulares (149, 152-154).

Além da sinalização por Ca^{2+} , a enzima NKA é ainda capaz de ativar duas vias de sinalização relacionadas ao crescimento: a via $EGFR/Src-Ras-ERK$ e a via $PI3K-PDK-Akt$ (126, 155), conforme ilustrado na figura 7.

A ativação da via $EGFR/Src-Ras-ERK$ pela OUA foi uma das primeiras a ser descrita (156, 157), porém apesar da ocorrência de uma interação entre a Src e a NKA ser bem estabelecida (158) os mecanismos pelos quais essa interação ocorre ainda são bastante controversos (159). Fato é que a ativação da via da MAPK, por sua vez pode ativar vários fatores de transcrição, tais como CREB (elemento de resposta ligado ao AMP cíclico) e o $NF\kappa B$, os quais estão associados a inúmeros fatores neurotróficos e citocinas (126, 150).

Já a via $PI3K-PDK-AKT$ parece ser independente da Src (160). Experimentos de co-imunoprecipitação realizados tanto em cultura de fibroblastos quanto em cardiomiócitos sugerem uma interação direta entre a PI3K e a subunidade α da NKA (160). A NKA parece ainda modular a liberação de glutamato e a expressão de receptores NMDA (161-164).

Figura 7 - Esquema da sinalização por glicosídeos cardiotônicos (CTS, em inglês) através do complexo receptor NKA/Src. Acima à esquerda, esquema ilustrativo da interação proteína-proteína da NKA com os receptores de IP3. Acima à direita, efeitos dessa interação que levam a oscilação dos níveis de Ca²⁺ e ativação da via do NFκB (Fonte Aperia 2007). Abaixo, à esquerda, complexo inativo. As interações multifocais do complexo NKA/Src mantêm a Src inativa. Abaixo à direita, complexo ativado. Após a ligação do glicosídeo cardiotônico ao seu sítio na NKA ocorrem mudanças conformacionais que liberam o domínio quinase da Src, resultando em sua ativação. Consequentemente, ocorrem a transativação do receptor EGF, a fosforilação, recrutamento e ativação de múltiplas proteínas incluindo proteínas e lipídeos quinases que levam a produção de mensageiros intracelulares ROS, PIPs, DAG, IP3 e Ca²⁺. PI3K: fosfatidilinositideo 3 quinase; EGFR: receptor de fator de crescimento epidermal; PKC: proteína quinase C; PLC: fosfolipase C; Shc: proteína tipo-colágeno homóloga da Src; Grb2: proteína 2 acoplada ao receptor de fator de crescimento; MEK: MAPK/ERK quinase; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; IP3R: receptor de IP3; IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato; PIP: fosfatidilinositol fosfatos; DAG: diacilglicerol; ROS: espécies reativas de oxigênio. Fonte: Pierre and Xie, 2006 (158).

1.3 O Fator Nuclear Kappa B (NFκB)

Descoberto em 1986, o NFκB é um fator de transcrição que uma vez ativado possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve das moléculas de anticorpo das células B (165). Este fator é um dímero, geralmente constituído pelas subunidades p65 (também chamada RELA) e p50 (166, 167), ou pelas subunidades c-REL, RELB, e p52. As diferentes combinações de dímeros são responsáveis por ativar ou bloquear a expressão de genes distintos, como os homodímeros inibitórios p50/p50 e p52/p52 (168). Em mamíferos são conhecidos 5 membros da família NFκB, RELA (p65), RELB, c-REL p50/p105 (NFB1) e p52/p100 (NFκB2) sendo que a diferente combinação entre eles pode formar dímeros que ativam diferentes genes que controlam a morte celular programada, a adesão celular, a proliferação, a inflamação e o remodelamento tecidual (169-173).

Na maioria dos tipos celulares, os complexos de NFκB ficam retidos no citoplasma pela família de proteínas inibitórias de NFκB (IκBs). Na presença de um estímulo ativador as IκBs são fosforiladas por uma família de proteínas quinases de IκB (IKK), resultando em sua degradação, e consequentemente na liberação dos dímeros de NFκB que podem translocar livremente para o núcleo (Figura 8) (168, 174). O fator de transcrição NFκB é encontrado em uma variedade de tipos celulares incluindo neurônios e microglia (175), porém há estudos que indicam um papel dual do NFκB no SNC em doenças neurodegenerativas, pois foi mostrado que a ativação do NFκB em neurônios promove sua sobrevivência, enquanto a ativação em células da glia e em células do sistema imune medeiam processos inflamatórios (176).

A grande relevância do NFκB decorre da enorme quantidade de genes implicados em vários processos celulares que são regulados por esse fator de transcrição, tais como a Oxido Nítrico Sintase induzida (*Nosi*), Interleucina 1β (*Il-1β*), Fator de necrose tumoral α (*Tnf-α*), *IκBα*, além de genes relacionados à neuroproteção como o fator neurotrófico derivado de cérebro (*Bdnf*). Uma vez que a regulação da expressão destes genes tem consequências notáveis para o funcionamento cerebral, o NFκB é também reconhecido como um importante modulador dos processos de desenvolvimento, de plasticidade, neurodegenerativos e inflamatórios (177, 178) (177-180). Além disso, parece controlar a elongação e o

direcionamento de axônios, assim como o tamanho e complexidade da árvore dendrítica durante o desenvolvimento, e a densidade de espinhas dendríticas no adulto (181, 182).

Dados da literatura sugerem ainda um papel importante da sinalização do NF κ B nos processos de aprendizado e memória. As subunidades p65 e p50 podem ser detectadas nos sítios pré e pós-sinápticos *in vivo* e em sinaptossomas isolados de córtex cerebral e hipocampo (175, 183) sendo a subunidade catalítica α da proteína quinase A (PKA) um alvo do NF κ B (184). Um dos substratos da PKA é o CREB, que tem papel crucial na formação de memórias de longa duração (185), conforme exposto no item 1.1.1.

Figura 8 - Via de sinalização canônica do NF κ B. À esquerda: Na ausência de estímulo, os dímeros do NF κ B encontram-se ligados à proteína inibitória I κ B, que retém o complexo inativo do NF κ B no citoplasma. Na presença de estímulo, a proteína I κ B é degradada pela fosforilação mediada pelo complexo I κ B quinase (IKK), constituído das subunidades cataliticamente ativas IKK α e IKK β e pela subunidade regulatória NEMO. As proteínas I κ B fosforiladas são alvos para a ubiquitinação e para a degradação via proteossoma, que libera os dímeros de NF κ B para translocar para o núcleo. Adaptada de Oeckinghaus et al.

(2011)(186). À direita: A ativação constitutiva do NFκB é detectada preferencialmente em neurônios glutamatérgicos (núcleo verde), enquanto que na glia o NFκB parece ter nível basal mais baixo sendo fortemente indutível (núcleos vermelhos). No neurônio a ativação de NFκB parece estar relacionada ao crescimento axonal, a arborização dendrítica, a neuroproteção e a formação de memória. Já quando o NFκB está ativo na glia parece relacionar-se ao processo inflamatório. Fonte: Kaltschmidt e Kaltschmidt, 2009 (187).

1.4 GSK3-β e a via Canônica da WNT/β-CATENINA

As proteínas WNT constituem uma família de glicoproteínas secretadas que são importantes mediadores da comunicação célula-célula, e que participam de diversos processos celulares tanto na embriogênese quanto na homeostasia de tecidos adultos (188). No SNC do adulto, por exemplo, a via canônica da WNT é fundamental para a neurogênese, processo importante na formação e manutenção de memórias no hipocampo (189).

A sinalização pela proteína WNT pode acontecer pela via canônica WNT/β-CATENINA, e pelas vias não canônicas, independentes da β-CATENINA, que podem induzir tanto o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} quanto à ativação da cascata de sinalização da cinase c-Jun N-terminal (JNK) (188).

A via de sinalização mais estudada e conhecida das proteínas WNT é a via canônica WNT/β-CATENINA, altamente conservada entre espécies, que medeia a estabilidade da β-CATENINA citoplasmática, permitindo sua translocação para o núcleo e regulando assim a expressão de genes controlados por esta (190). No momento da estimulação pela WNT, dois receptores de membrana, distintos, atuam conjuntamente para iniciar a sinalização, um receptor sete alças transmembranares chamado Frizzled e o receptor de lipoproteína de baixa densidade tipo 5 ou 6 (LRP-6/-5) (191-195), que formam um complexo para iniciar a cascata de interações moleculares que estabilizam o modulador transcricional β-CATENINA. A β-CATENINA estável acumula-se no citoplasma e migra para o núcleo, onde se complexa com o fator promotor de célula T/linfócito (TCF/LEF) (195, 196), aumentando a ativação de genes como a *Ciclina D1* (197), *c-Myc* (198), *Vegf* (fator de Crescimento do Endotélio Vascular), *Endotelina-1*, *Dickkopf 1*, *Axina 2*, *Tcf-1*, dentre outros (199).

Na ausência de estímulo, a estabilidade da proteína β-CATENINA é comprometida pela fosforilação de resíduos serina e treonina na porção N-terminal, que ocorre uma vez que a β-CATENINA está ligada ao supressor tumoral *adenomatous polyposis coli* (APC), que favorece a ação de quinases como a

Glicogênio Sintase Quinase-3 β (GSK-3 β), e caseína quinase-1 (CK1). A fosforilação da β -CATENINA por essas quinases sinaliza sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. As proteínas AXINA, APC, GSK-3 β E CK-1 compõem o complexo de destruição (190, 194, 195, 200)).

Quando está dentro de uma faixa considerada homeostática, a via canônica regula o destino celular, a proliferação, a auto-renovação de células-tronco e progenitoras, a diferenciação, a transformação, a migração e a adesão celular (201). A sinalização anormal da WNT/ β -CATENINA está associada ao aparecimento de tumores, osteoporose, ao envelhecimento e as doenças degenerativas (190, 194, 202, 203), além de modular a inflamação. Mutações que levam ao aumento da estabilidade da β -CATENINA são observadas em tumores (202, 204), enquanto que a redução nos níveis de β -CATENINA parece estar associada a algumas doenças neurodegenerativas (205, 206).

No processo de diferenciação de células e tecidos, a via WNT interage com outras vias de sinalização, tais como a via do NF κ B (Hu et al., 2011). Aparentemente, a GSK-3 β , regulador negativo da β -CATENINA, tem papel central nessa interação, regulando positivamente o NF κ B pela modulação do I κ B. A β -CATENINA por si só interage com a subunidade p50 impedindo a ativação da via (207-210). Além disso, a β -CATENINA parece estimular a NKA (211).

De fato, a β -CATENINA desempenha dois papéis importantes nas células de uma variedade de tecidos, primeiramente porque é um componente crucial da via de sinalização canônica da WNT, atuando como fator de transcrição, mas também é um componente do complexo CATENINA/CADERINA que ajuda a estabilizar o citoesqueleto de ACTINA mediando a adesão celular (212). Quando a β -CATENINA ou a N-CADERINA são superexpressas verifica-se aumento da arborização dendrítica enquanto que na presença de um inibidor de β -CATENINA observa-se diminuição da arborização, impedindo o aumento da morfogênese dendrítica em decorrência da atividade neural (212). Estudos recentes sugerem um importante papel da sinalização WNT na plasticidade sináptica. Sugere-se que a sinalização da via canônica possa ser necessária para a consolidação de memórias (213).

Figura 9 - Esquema simplificado das vias de sinalização intracelular associadas à ação da proteína WNT nos receptores Frizzled (FZ). A ligação da proteína WNT ao Fz ativa uma proteína citoplasmática denominada Dishevelled (DVL). A DVL ativada induz o desmembramento de um complexo que consiste de AXINA, adenomatous polyposis coli (APC), glicogênio sintase quinase 3β (GSK-3β) e β-CATENINA. Nas células que não são estimuladas pela WNT, a GSK-3β fosforila a β-CATENINA que é então degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Por outro lado, a ativação da via resulta na inibição da GSK-3β, que leva a um aumento nos níveis de β-CATENINA citoplasmática, que migra para o núcleo para formar o complexo da β-CATENINA com: o fator de transcrição célula T específica (TCF) e fator reforçado (*enhancer*) do linfócito (LEF) que por sua vez, modula a transcrição de genes alvos. Além da via canônica ou WNT/β-CATENINA, outras duas vias podem ser ativadas pela DVL: a via da polaridade planar celular (PCP), e a via WNT/cálcio, sendo que existem evidências de que pode ocorrer uma comunicação cruzada entre todas as vias. A proteína WNT pode sinalizar também via Tab1/Tak 1 (proteína quinase ativada pelo fator de crescimento TGF-β) que ativa NLK (proteína quinase do tipo nemo) que reprime a ativação do fator de transcrição NFκB. Estas vias intracelulares estão associadas às ações da WNT em diversos processos celulares, incluindo proliferação celular, movimentação e polaridade celular, e morte celular programada. Adaptado de Logan e Nusse (2004)(190).

2 OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo verificar o mecanismo molecular de sinalização desencadeado pela administração de OUA 10 nM, em neurônios do hipocampo de ratos, e especificamente seus efeitos na ativação da via canônica da WNT/ β -CATENINA, assim como as consequências morfológicas e funcionais dessa ativação. Nesse contexto, exploramos:

- 1) a atividade da NKA ao longo do decurso temporal de 1 h, 10 h e 24 h após a infusão da OUA, na dose de 10 nM;
- 2) o padrão de expressão de proteínas relacionadas a ativação clássica da Src e da via PI3K pela OUA como descrito previamente na literatura. Verificamos se a OUA em nosso modelo ativava a ERK1/2, a p38, a AKT e a Src;
- 3) o perfil de modulação das vias WNT e NF κ B e de proteínas relacionadas às vias, no modelo. Para isso realizamos ensaio de Western Blot para as proteínas c-Myc, Ciclina D1, GSK-3 β , β -CATENINA e I κ B. Os dados de ativação das vias foram confirmados por ensaio de EMSA para NF κ B e RT-PCR tempo real para o gene *Axina 2* (proveniente exclusivamente da ativação da via canônica da WNT);
- 4) a caracterização do tipo celular em que as vias NF κ B e WNT estavam ativadas no hipocampo, após a infusão de OUA 10 nM no decurso temporal. Para tal foram realizados ensaios de imunofluorescência com marcação de anticorpos primários para p65, β -CATENINA e marcadores de tipos celulares como NeuN (neurônio), GFAP (astrócito) e Iba-1 (micróglia);
- 6) o perfil de modulação da via BDNF-CREB pela OUA no decurso temporal, por ensaio de ELISA, EMSA, Western-Blot e RT-PCR semi-quantitativo;
- 7) os efeitos morfológicos nos neurônios da região CA1 e DG do hipocampo em decorrência da ativação das vias ERK1/2, AKT, NF κ B, BDNF-CREB e WNT pela OUA. Para tal realizamos ensaios de coloração de Golgi Cox;
- 8) os efeitos comportamentais das alterações moleculares e morfológicas observadas no hipocampo. Para tal realizamos o Teste Comportamental do Labirinto

Aquático de Morris que é bastante sensível à presença de lesões na região dorsal do CA1 do hipocampo, visto que é um teste que necessita do aprendizado e da memória espacial, processos que ocorrem predominantemente na região CA1 e GD;

9) se a OUA 10 nM era capaz de levar os neurônios a apoptose, e os efeitos anti-apoptóticos da OUA 10 nM em cultura primária de neurônios hipocampais frente a um estímulo excitotóxico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, na idade de 4 meses, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas segundo as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo registrado sob nº 124 nas fls. 93 do livro 2. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia-ICB, USP/SP, onde permaneceram por um período de ambientação mínimo de uma semana antes do início dos experimentos. A temperatura ambiente desse biotério foi mantida constante (22 ± 2 °C), sob ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 6 – 18h) e fornecimento de água e ração *ad libitum*.

3.2 Cirurgias de Estereotaxia para implante de cânula guia no hipocampo dos ratos

Como descrito em Kawamoto et al., 2012 (162), as cânulas foram implantadas imediatamente sobre a região CA1 do hipocampo, em ambos os hemisférios dos ratos. Os animais foram anestesiados com a mistura (1:1) de quetamina 10% (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e xilazina 2% (Syntec) (0,15 ml/kg, i.p.). Após tricotomia, a cabeça do animal foi fixada no equipamento estereotáxico (Modelo 900, Kopf, CA, USA), seguida de assepsia local com peróxido de hidrogênio 3%, onde foi feita uma incisão de 2 cm, que permitiu a exposição da calota craniana. Tomando-se o Bregma como referência, o crânio foi perfurado com broca odontológica em dois pontos situados exatamente a 3,5 mm posterior ao Bregma, 2,0 mm lateralmente e as cânulas foram inseridas a 2,7 mm de profundidade (214). A cânula foi fixada ao crânio com acrílico autopolimerizante. Na cânula foi colocado mandril (fio ortodôntico), com a ponta externa dobrada, para evitar a exposição da região interna do crânio ao meio ambiente. Para a sustentação do acrílico auto-polimerizante, foi fixado um parafuso no crânio em um dos ossos parietais. Os animais foram mantidos em biotério por 10 dias até total recuperação da cirurgia, antes de receber a infusão de qualquer substância.

Figura 10 - Esquema ilustrativo da localização das coordenadas para o implante da cânula guia durante a cirurgia de estereotaxia. (A) Esquema do animal preso ao aparato cirúrgico e a exposição da caixa craniana usando como referência a linha do Bregma. (B) As coordenadas determinadas pelo Atlas são marcadas e os furos para implante das cânulas realizados. (C). A cânula já na posição deve ficar imediatamente sobre a camada CA1 do hipocampo, seguindo a coordenada dorso-ventral em relação ao osso da caixa craniana de 2.7 mm.

3.3 Infusões de Ouabaína (OUA) ou Salina 0,9%

As infusões foram realizadas após no mínimo 10 dias da cirurgia, para evitar a interferência de um possível processo inflamatório decorrente da intervenção cirúrgica, como já padronizado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (162). Foram usadas microsseringas Hamilton, com auxílio da bomba de infusão (Kd Scientific, Holliston, MA, EUA), conectada a um tubo de polietileno, onde foi fixada uma agulha gengival 30G (Terumo, Toquio, Japão). Um grupo de ratos foi considerado controle e recebeu a infusão bilateral de salina 0,9% no volume de 2 μ L, enquanto que um segundo grupo recebeu a infusão de mesmo volume (2 μ L) de solução de OUA 5 nM (concentração final de 10 nM), nos dois hemisférios. O tempo de infusão foi de 2 min, permanecendo a agulha inserida na cânula guia por mais 4 min, a fim de evitar o refluxo do líquido infundido (161). Alguns animais foram destinados ao grupo controle do procedimento cirúrgico (sham) e não receberam nenhuma injeção.

Após 1 h, 10 h e 24 h do término da infusão, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação ou perfusão transcardíaca de acordo com a exigência do método subsequente.

3.4 Perfusão Transcardíaca e coloração de Nissl

Após 10 dias do procedimento cirúrgico e da infusão de OUA ou Salina 0,9%, os ratos destinados a técnicas de microscopia foram profundamente anestesiados com a mistura (1:1) de quetamina 10% (Syntec) e xilazina 2% (Syntec) (0,15 ml/kg, i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com salina estéril (0,9% NaCl) e solução fixadora (4% de paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato 0.1 M; pH 7.4, 4 °C). O encéfalo foi coletado e pós-fixado em solução de PFA por 4 h sendo transferido para uma solução de sacarose (30% sacarose em tampão fosfato) onde permaneceu por 24 h. Secções coronais de 30 µm de espessura foram obtidas por cortes em micrótomo, coletadas em tampão fosfato e montadas em lâminas de vidro onde foram coradas com violeta de cresil.

No protocolo de Coloração de Golgi-Cox especificamente, a perfusão foi realizada apenas com salina 0,9% e os cortes foram feitos em criostato na espessura de 100 µm.

3.5 Infusão de traçador fluorescente para validação da posição das cânulas

Com o objetivo de verificar a posição das cânulas depois de transcorridos 10 dias da cirurgia de estereotaxia, conforme descrito no item 3.2, os animais receberam a infusão de 2 µL da solução de salina 0,9% contendo o traçador retrógrado fluorescente, Fluoro-Gold (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2% (215). Após 1 h, 10 h e 24 h os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca, conforme descrito no item 3.4, os encéfalos foram seccionados em micrótomo na espessura de 30 µm e colocados em lâminas de vidro microscópicas. As lâminas foram fechadas com Immuno Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada) e os cortes foram analisados em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon, Toquio, Japão) que possui o sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C.

3.6 Ensaios de Imunofluorescência para tecido

Os encéfalos perfundidos e fixados foram seccionados em micrótomo (Leica, SM2000R), no plano coronal, sequencialmente a partir do início do hipocampo (231))(30 (30 µm) e coletados em placas de cultura de 6 poços com tampão PB 0,1 M. Os cortes foram incubados *free-floating* por 2 h em tampão de bloqueio (PB 0,1M + 5% de soro de burro + 0,3% de Triton X-100). Após a etapa de bloqueio, foram transferidos para lâminas gelatinizadas (6 cortes por lâmina). Para a reação de imunofluorescência os cortes foram incubados, *overnight* a 4° C, com os seguintes anticorpos primários: anti-p65 (1:100; Santa Cruz, CA, USA), anti-β-CATENINA (1:250; Cell Signaling, MA, USA), anti NeuN (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-GFAP (1:2000; Sigma, USA) e Anti-Iba-1 (1:500; BD Bioscience, USA). Na sequência foram lavados 3 vezes por 10 min com tampão PB 0,1 M e incubados por 2 h, temperatura ambiente, com os anticorpos secundários adequados ao primário, dentre os quais: Alexa Fluor donkey anti-mouse (DAM) 594, DAM (488), Alexa Fluor donkey anti-rabbit (DAR) 488, (DAR) 594 e Alexa Fluor donkey anti-goat (DAG) 594, todos diluídos 1:2000 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA). Nos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após incubação com os anticorpos secundários os cortes foram novamente lavados e incubados por 1 min com DAPI (1:10.000) (4'-6-Diamidino-2- phenylindole; Sigma). As lâminas foram fechadas e os cortes foram analisados em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon, Toquio, Japão) que possui o sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C.

3.7 Método de Coloração de Golgi-Cox

Conforme descrito em Gibb e Kolb (216), os encéfalos foram perfundidos apenas com salina 0,9% e imersos em 20 mL de solução de Golgi-Cox (5% dicromato de potássio + 5% cromato de potássio + 5% cloreto mercúrico em água destilada) onde permaneceram por 14 dias, com 1 troca de solução no segundo dia, e após os quais foram transferidos para a solução de sacarose 30%. Os cérebros permaneceram na sacarose por mais 5 dias, sempre protegidos da luz. Após esse período foram cortados em criostato (CM3050, Leica, Germany) na espessura de 100 µm no plano coronal, ao longo de toda extensão do hipocampo contendo a região CA1 (aproximadamente -2.2 a -6.2 mm a partir do Bregma), coletados e

posicionados nas lâminas. As lâminas foram mantidas por uma noite, em temperatura ambiente e protegidas da luz, para que os cortes secassem e aderissem. As lâminas contendo os cortes foram lavadas por 1 min em água destilada, e em seguida mergulhadas em solução de hidróxido de amônia por 30 min, no escuro. Uma vez retirados dessa solução foram lavados em água destilada por 1 min e imersos em solução fixadora de filme de raios-X Kodak por 30 min, no escuro. Os cortes foram lavados em água destilada por 1 min e iniciou-se o processo de desidratação dos cortes pela sequência de lavagens: 1 min em etanol 50%, 1 min em etanol 70%, 1 min em etanol 95%, 3 vezes de 5 min em etanol 100% e finalmente por 15 min em solução CXA (1:3 Clorofórmio + 1:3 Xileno + 1:3 etanol absoluto). Uma vez desidratados, os cortes foram fechados com Permount (Fischer Scientific, Austrália) e permaneceram secando por no mínimo 24 h antes de serem analisados no microscópio (Eclipse 80i, Nikon, Japão) com lente objetiva de 20x.

3.8 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares

O método utilizado foi descrito por Rong e Baudry (217). As estruturas (aproximadamente 100 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em homogeneizadores vidro-vidro com tampão fosfato-salina (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,27 mM, Na_2HPO_4 8,06 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 0,5 M; leupeptina 2,5 $\mu\text{g/mL}$; antipaína 2 $\mu\text{g/mL}$; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e EDTA 0,1 mM. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 30 seg a 4 °C. O sobrenadante foi reservado para os ensaios de Western blot. O *pellet* foi ressuscitado em 400 μL de tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl_2 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 $\mu\text{g/mL}$; antipaína 2 $\mu\text{g/mL}$; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e incubado em gelo durante 10 min. Foi adicionado, em seguida, 10 μL de NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se à 12.000 x g por 30 seg, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 100 μL de tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25%; MgCl_2 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 $\mu\text{g/mL}$; antipaína 2 $\mu\text{g/mL}$; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e incubado 20 min em gelo, centrifugando-se o extrato à 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante, correspondente ao extrato nuclear, foi recolhido e a concentração de proteínas determinada, estocando

as amostras a -80°C para posterior preparação de amostras para Western blot e ensaio de EMSA.

3.9 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem da concentração das proteínas nos extratos previamente preparados foi realizada através do método de Bradford (218) utilizando reagente da Bio-Rad® e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.10 Ensaio de Western Blot

Foram realizados ensaios de Western Blot para mensurar a expressão das seguintes proteínas: 1) WNT/ β -CATENINA (pGSK-3 β (Ser9), GSK-3 β , p β -CATENINA e β -CATENINA); 2) via da AKT (AKT pThr308, AKT pSer473 e AKT total); 3) Via da ERK1/2 (pP42/44 e P42/44); 4) MAPK (pP38/P38); 5) Src (pSrc (Y529)/Src); 6) via do NF κ B (pI κ B/I κ B); 7) CREB (pCREB (Ser133)/CREB); 8) Ciclina D1 e c-Myc.

As amostras para o ensaio de Western Blot foram preparadas como descrito nos itens 4.8 e 4.9. O ensaio baseou-se no descrito por Laemmli et al. (219). As proteínas foram ajustadas na quantidade adequada, após padronização, com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromophenol blue; pH 6,8) e fervidas por 5 min a 95°C . As amostras foram aplicadas no gel de SDS-PAGE 10% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS], juntamente com um padrão de peso molecular. Para a eletroforese (2 h, 90 V) foi usado um tampão de corrida (25 mM tris-base; 0,192 M glicina; 0,1% SDS). Ao final da corrida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, por 90 min a 400 mA. Para a transferência foi usado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada), lavadas com água bidestilada até retirar todo o excesso da solução corante e deixadas por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação leve, numa solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água), 0,5% de leite

desnatado, 5% BSA (para membranas a ser incubadas com anticorpos para resíduos fosforilados) e 0,05% de Tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em TBS-T (TBS; 0,1% Tween 20) *overnight* a 4 °C. As membranas foram então lavadas 5 vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (1:2000) por 60 min. A revelação foi feita com kit de quimioluminescência (Millipore, Billerica, MA, EUA). Os anticorpos usados foram: Anti-Src (phospho Y529) (Abcam), c-Src (Santa Cruz), p42/44 phospho Thr 202/Tyr 204 e anti-P42/44 (Cell Signaling), P38 MAPK e phospho P38 MAPK (thr 180/Tyr 182) (Cell Signaling), Anti-AKT1(Thr308) e Anti-AKT (Ser473) (Sigma), AKT (Santa Cruz), Alpha-tubulina (Santa Cruz), GSK-3 β e pGSK-3 β Ser 21/9 (Cell Signaling), phospho β -CATENINA (Ser33/37/Thr41), β -CATENINA (Cell Signaling), phospho I κ B e I κ B (Santa Cruz), CREB (pSer133) e CREB (Millipore), Ciclina D1 (Millipore) e c-Myc (Abcam).

3.11 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

Para a marcação da Sonda, os oligonucleotídeos do NF κ B contendo a sequência 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C – 3' e os oligonucleotídeos do CREB contendo a sequência 5'- AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG- 3' foram marcados com a adição de γ -³²P ATP numa solução contendo Tampão T₄ quinase (em mM: Tris-HCl 700, pH 7,6; MgCl₂ 100 e DTT 50), T₄ quinase e água; nas seguintes concentrações: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T₄ quinase, 1 μ L de γ -³²P ATP (3Ci/mmol), 1 μ L de tampão T₄ Kinase Buffer (10 X) em 10 μ L de volume de reação). Após incubação a 37 °C por 10 min, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Colunas (Microspin G-25) foram posicionadas em um tubo de microcentrifuga, centrifugando-se por 1 min a 3.000 rpm, e em seguida foram transferidas para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação, o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/ μ L. O método está padronizado no nosso laboratório (162, 220).

Para a reação de ligação e corrida do gel, foram adicionados a um tubo de microcentrifuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%), extrato nuclear (2,5 μ g de proteína) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final. O tubo

foi incubado por 20 min a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μ L), e novamente o tubo foi incubado por 30 min a temperatura ambiente. Para visualizar a corrida adicionou-se 1 μ L de azul de bromofenol ao controle (-). O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida que consiste em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). A corrida ocorreu em cerca de 2 h a 150-160 V. Ao final desta, o gel foi seco e permaneceu definitivamente fixado em um papel filtro especial. Para revelar os resultados, um filme de raios-X foi exposto mediante ao papel filtro contendo a corrida, em cassete a -80°C . Além do ensaio de gel shift, foi realizado também o ensaio de competição adicionando-se a quantidade de oligonucleotídeos não-marcados 10 vezes em excesso e um oligonucleotídeo não-específico (TFIID) não-marcado 10 vezes em excesso para o NF κ B e 10 vezes em excesso para o CREB.

O Ensaio de *Super-Shift* do gel de retardo para NF κ B foi realizado de maneira idêntica ao procedimento descrito anteriormente, adicionando-se anticorpos específicos às subunidades que compõe o complexo NF κ B, durante a incubação do extrato nuclear com o oligonucleotídeo, contendo a sequência específica para o NF κ B. Foram utilizados anticorpos contra as subunidades: p50, p65, cREL, e p52 (Santa Cruz, CA, USA).

3.12 Determinação da atividade da NKA

Como descrito em Scavone et al. (221); Kawamoto et al., (222); Munhoz et al., 2010 (220) e Kawamoto et al., 2012 (162), a atividade da NKA foi determinada por um ensaio que mede a liberação de Pi a partir da hidrólise do ATP. O Pi forma complexos com o molibdato, o qual pode ser mensurado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm (223). Para esse ensaio, o extrato de hipocampo foi centrifugado (12.000 g por 15 min, 4°C), e o *pellet* foi resuspendido em tampão contendo 0,32 M de sacarose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT e 1 mM PMSF, pH 7,4. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico da Bio Rad (218). A atividade da NKA foi mensurada pela adição de 10 μ g de proteína a 40 μ l de tampão contendo 3 mM ATP, 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 3 mM MgCl_2 e 30 mM de histidina (pH 7.2), com OUA (3 μ M ou 3 mM) e sem OUA.

Após 20 min de incubação a 37 °C, a reação foi paralisada pela adição de Tampão Término de Reação (10 N de H₂SO₄ + 5% molibdato de amônio).

A atividade total das ATPases é medida pela formação de complexos de fosfomolibdato nas amostras que não receberam OUA. Já a atividade da Mg ATPase, ou fração insensível a OUA, é obtida pela subtração do valor obtido pelas amostras que receberam OUA 3 mM do valor das ATPases totais. Em roedores, a isoforma $\alpha 1$ da NKA é 1000 vezes menos sensível aos glicosídeos cardiotônicos que as isoformas $\alpha 2/3$. As isoformas $\alpha 2/3$ que tem alta afinidade pela OUA tem suas atividades medidas pela subtração entre os valores de atividade total de ATPase e o valor obtido pelas amostras tratadas com 3 μ M. Para determinar a fração da atividade correspondente a isoforma de menor afinidade ($\alpha 1$) verifica-se o valor da subtração dos valores obtidos nas amostras com adição de 3 mM de OUA dos valores obtidos nas amostras com 3 μ M de OUA. A atividade da NKA é expressa em nmol/mg de proteína por min.

3.13 Ensaios de Imunoabsorção enzimática (ELISA) para determinação da expressão de BDNF

Para determinação da expressão de BDNF nas amostras foi realizado um ensaio de ELISA usando para isso o Kit (222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)(222, 224)BDNF Emax® ImmunoAssay System, two sites (Promega, Madison, WI, USA). O ensaio foi realizado seguindo o protocolo do kit.

3.14 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa (RT-PCR)

Conforme descrito em Orellana et al., 2015 (225), o RNA total do tecido foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 3 μ g foram tratados com DNase I e submetidos à transcrição reversa utilizando oligo (dT) 20 e a transcriptase reversa MMLV de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen).

Para confirmar a ativação da sinalização da via canônica da WNT a expressão do gene *Axina 2* foi mensurada pela técnica de PCR quantitativo (qPCR) em tempo real usando o ensaio de expressão gênica da sonda TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), especificamente *Axina 2* (Rn00577441_m1, comprimento do amplícon 67 pb, RefSeq: NM_024355.1). Como controle endógeno da reação de PCR em Tempo Real foi utilizado sonda TaqMan para o gene *Hprt1*

(*hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*, Rn01527840_m1, comprimento do amplicon 64 pb, RefSeq:NM_012583.2). Antes da realização do experimento, foi feita a curva de eficiência de amplificação, usando uma diluição seriada de 6 pontos. A curva permitiu a quantificação de cDNA com eficiência de amplificação semelhante tanto para a *Axina 2* quanto para o controle *Hprt1*. A reação da PCR Tempo Real foi realizada no sistema do termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada reação, (realizada em duplicata) continha 2 µL de cDNA diluído (1:10), 6,25 µL do Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,625 µL da sonda TaqMAN e água bidestilada estéril em quantidade suficiente para completar o volume de 12,5 µL. As condições da reação foram: 50 °C, por 2 min e 95 °C, por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C, por 15 seg e 60 °C, por 1 min. O método Delta-Delta-Ct foi usado para quantificação da diferença na amplificação entre as amostras, realizado no programa REST 2009.

Já para verificar se houve modulação da OUA na expressão do RNAm de *Bdnf*, *Bax* e *Bcl-2*, foi realizada uma reação de PCR semi-quantitativa, com os oligonucleotídeos iniciadores para *Bax*, *Bcl-2*, *Bdnf* e *Gapdh* (*gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*) foram diluídos em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA) a uma concentração de 100 µM. O volume final da reação de PCR foi de 25 µL, contendo 1 µL de cDNA (amostra), 2,5 µL de tampão para PCR 10x concentrado (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), 0,5 µL do oligonucleotídeo iniciador 5' (sense) (10 µM), 0,5 µL do oligonucleotídeo iniciador 3' (antisense) (10 µM), 0,5 µL de dNTP Mix (100 mM), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL de *Taq Polimerase* (5 U/mL, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e 18,81 µL de água com DEPC. A reação foi realizada em aparelho PCR Modelo TC-512 (Techne Inc[®], Burlington, NJ, USA). Aproximadamente 20 µL dos produtos de reação da PCR semi-quantitativa foram aplicados a um gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A visualização dos géis foi sob a transiluminação de luz UV e as imagens foram capturadas usando um aparelho G Box Chemi XX6 (Syngene, MD, USA).

Tabela 1 - Sequência dos primers para a reação de PCR semi-quantitativa.

Primer	Sequência (5'-3')	Número de Acesso	Identificação	Tamanho (pb)
<i>Bax</i>	Sense: TGAAGTGGACAACAACATGGAGC Anti-sense: GGTCTTGGATCCAGACAAACAGC	NM017059.1	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Bcl2-associated X protein (Bax)</i>	260
<i>Bcl2</i>	Sense: GGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAG Anti-sense: TATGCACCCAGAGTGATGCAGGC	NM016993.1	<i>Rattus norvegicus</i> <i>B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl2)</i>	271
<i>Bdnf</i>	Sense: ATGCTCAGCAGTCAAGTGCC Anti-sense: AGCCTTCCTTCGTGTAACCC	NM012513.3	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	304
<i>GAPDH</i> (controle interno usado na PCR semi-quantitativa)	Sense: CGGGAAGCTTGTGATCAATGG Anti-sense: GGCAGTGATGCCATGGACTG	NM017008.3	<i>Rattus norvegicus</i> <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)</i>	264

3.15 Teste comportamental: Labirinto Aquático de Morris

Para a realização desse teste foi utilizada uma piscina circular toda pintada de preto (226) com 200 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade, preenchida até 25 cm com água a 26 °C, na qual se adicionou leite para torná-la opaca. Uma plataforma móvel de 9 cm de diâmetro e constituída do material acrílico transparente foi colocada 2 cm abaixo do nível da água. A localização da plataforma variou conforme o teste que foi realizado (descrito adiante). Todo o procedimento experimental foi filmado por uma câmera de vídeo (VP112, HVS Image Ltd., Hampton, UK) conectada a um computador programado para analisar pares de coordenadas coletadas a cada 0,1 seg, que definem a posição do animal.

Virtualmente, a piscina foi dividida em quatro quadrantes por duas linhas imaginárias perpendiculares que se cruzam no centro. O quadrante que continha a plataforma foi chamado de quadrante crítico assim como uma área imaginária em torno da plataforma medindo aproximadamente três vezes seu diâmetro foi chamada de contador crítico. O tempo em que os animais permanecem nessas áreas ao longo do treinamento e testes reflete a precisão com que buscam a plataforma.

Figura 11 - Esquema do aparato para teste comportamental Labirinto Aquático de Morris. As paredes da sala contém pistas ambientais que permitem ao animal traçar estratégias para encontrar a plataforma.

3.15.1 Treino na tarefa de memória de referência espacial

O treino para a avaliação da memória de referência iniciou-se no sétimo dia após a infusão da OUA (10 nM) ou da salina 0,9% e perdurou até o décimo quarto dia. A plataforma foi colocada no quadrante quatro e mantida sempre na mesma localização da piscina. Foram realizados quatro treinos diários, com duração de 2 min cada treino e intervalo de 10 min entre eles (*intertrial interval* -ITI). A cada novo treino o animal era solto de uma posição diferente da borda da piscina. Se durante os dois minutos de treino o animal não encontrasse a plataforma, ele era conduzido até a mesma pelo experimentador e uma vez sobre a plataforma o rato dispunha de 20 seg para investigar o ambiente, sendo retirado da piscina na sequência. Essa etapa envolveu 28 sessões de treinamento consecutivas. Os parâmetros analisados a cada tentativa do treino foram latência, velocidade de locomoção e comprimento de trajeto, pois o tempo que o animal demora em encontrar a plataforma desde o momento em que é solto na borda da piscina e o quanto ele nada para encontrá-la são as medidas mais comumente adotadas para aferir o aprendizado do animal sobre a tarefa, enquanto que a velocidade nos permite verificar o grau de motivação dos animais e se existe algum déficit motor.

3.15.2 “Probe Test”

Ao término das sessões de treino, foram realizados dois testes, chamados de *Probe Test* (PT), para avaliar a lembrança dos ratos sobre a localização da plataforma (PT1) e a extinção da resposta adquirida no treino (PT2). Para tal, a plataforma foi retirada da piscina e os animais dispunham de 3 min para nadar livremente. Os dados foram analisados minuto a minuto (*time bin*) permitindo avaliar o tempo que cada animal gastou no quadrante e na região em torno de onde antes se encontrava a plataforma. A velocidade de natação também foi mensurada como um parâmetro que permite aferir eventuais prejuízos motores. O PT1 foi realizado após 24 h do último treino e o PT2 após 48 h. Os parâmetros mensurados nesses testes foram o comprimento de trajeto, tempo que o animal explora o quadrante da plataforma, porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrante crítico, tempo que o animal permanece na área do contador, velocidade de natação, permanência no anel externo (C), intermediário (B) e central da piscina (A), e o ângulo de divergência entre a posição inicial do animal e a suposta plataforma.

A porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrante crítico, assim como o tempo absoluto, permite inferir sobre o quanto esse animal se lembra da localização da plataforma, memória adquirida durante os treinos, a qual chamou-se de memória de referência. Além disso, esse parâmetro também permite avaliar a taxa de extinção da resposta de busca pela plataforma ao longo dos três minutos de teste. A velocidade média de natação dos ratos pode ser utilizada como um parâmetro para mensurar a motivação dos animais, assim como o desempenho motor deles. Já o tempo de permanência nos diferentes anéis da piscina pode fornecer informações acerca da forma como o animal traça suas estratégias para localizar a plataforma.

3.15.3 Teste de Memória Operacional

O teste de memória operacional iniciou-se no dia subsequente ao PT2. Foram feitas três sessões de teste de memória operacional, uma sessão por dia, sendo que cada sessão teve 3 tentativas do animal, com intervalo entre as tentativas de 10 min e duração de 2 min, cada tentativa. Nesse teste, a plataforma variava de posição a cada dia, sendo mantida apenas na mesma sessão. Assim, na primeira tentativa, o animal desconhecia a posição da plataforma devendo procurá-la pela

piscina. Ao final dos 2 min, caso o rato não tenha encontrado a plataforma, ele foi conduzido até ela permanecendo nela por 20 seg para investigar o ambiente. Nas tentativas subsequentes ao longo do mesmo dia, esperava-se que os animais fossem capazes de usar as informações adquiridas na primeira exposição para localizar a plataforma.

Nos testes foram analisados para cada tentativa e sessão os seguintes parâmetros: latência, tempo no quadrante crítico, comprimento de trajeto, porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior, tempo que o animal ficou procurando no contador do dia anterior, a frequência relativa de busca no quadrante do dia anterior e a velocidade de locomoção. Os parâmetros que permitem avaliar o local onde estava a plataforma no dia anterior reflete a retenção de memória adquirida nos dias anteriores e a persistência na busca, refletindo a flexibilidade da memória desses animais. Caso ocorra a aquisição da informação sobre a localização da plataforma, espera-se observar uma melhora de desempenho na segunda tentativa assim como a capacidade de retê-la durante o ITI, resultando numa melhora de desempenho na segunda tentativa.

3.16 Cultura primária embrionária de neurônios hipocampais

A cultura de neurônios hipocampais, assim como todos os protocolos que usaram essa cultura, foi realizada durante período de doutorado sanduíche no laboratório *Science for Life*, sob supervisão da Dra. Anita Aperia, no *Karolinska Institute*, Estocolmo, Suécia (BEPE 2015/13295-4).

A cultura neuronal foi realizada a partir de embriões de rato Sprague Dawley, no décimo oitavo dia de gestação. O hipocampo foi removido do embrião e lavado em solução HBSS com 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguido de incubação em solução de Tripsina 0,25% por 10 min, a 37 °C, e dissociação em Meio Mínimo Essencial (MEM) com a ajuda de uma pipeta de vidro. As células foram plaqueadas na densidade aproximada de $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ em lamínulas de vidro que receberam tratamento prévio com poli-DL-Ornitina (Sigma-Aldrich) na concentração de 80 µg/mL, *overnight* a 37 °C. O meio de cultura utilizado para plaquear as células foi meio MEM com 10% soro de cavalo, 2 mM de L-Glutamina e 1 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich). Após 3 h de plaqueadas, o meio das células foi substituído por meio Neurobasal contendo 2% de B27, 2 mM de L-Glutamina, 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Metade do volume de meio foi trocado

duas vezes por semana e substituído por um meio utilizado na manutenção das células, que consistia em meio Neurobasal com 2% de B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,5 mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas por 21 dias em estufa a 37 °C, 90% de umidade e 5% de CO₂.

3.16.1 Tratamento das células

Os neurônios foram tratados com NMDA (100 µM) como previamente descrito em D'Orsi et al., 2015 (79) e com OUA (10 nM), ambas as drogas diluídas em líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (NaCl 111 mM; KCl 4mM; NaH₂PO₄ 1 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂ 2H₂O 1,5 mM; Glicose 10 mM; HEPES 20 mM; p.H 7,4). O grupo controle recebeu apenas aCSF. As células foram expostas aos tratamentos por 5 min em estufa (37 °C), lavadas 3 vezes com aCSF a 37 °C, e a elas foi adicionado meio de cultura utilizado na manutenção das células (meio Neurobasal com 2% B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,5 mM de L-Glutamina) a 37 °C, sendo imediatamente levadas a estufa por onde permaneceram até a realização dos experimentos. Os grupos que receberam OUA durante o tratamento, tiveram OUA 10 nM adicionada ao meio de cultura onde ficaram até o momento da realização dos experimentos. O esquema de tratamento está ilustrado na figura 12.

Figura 12 - Esquema de tratamento dos neurônios hipocampais. As culturas foram divididas em 4 grupos diferentes e a cada ensaio foram tratadas entre 4 e 6 lamínulas por grupo.

3.17 TUNEL

A primeira etapa do projeto foi verificar o perfil apoptótico do tratamento de NMDA na dose de 100 μ M e em seguida, verificar se a OUA 10 nM era capaz de evitar a morte celular programada nessas células. Inicialmente dois protocolos foram testados, um conforme já descrito no item 3.16.1 e outro no qual a diferença era que após a remoção do tratamento, a OUA não era adicionada ao meio de cultura, permanecendo apenas por 5 min. Esse segundo protocolo foi chamado de protocolo agudo, em oposição ao que a OUA é mantida no meio de cultura, chamado nesse relatório de tratamento crônico.

Depois de transcorridas 8 h do tratamento, as células foram fixadas com metanol gelado por 15 min, de acordo com as instruções do fabricante. O kit utilizado foi o ApopTag® Red *In Situ* Apoptosis Detection kit (Millipore, CA, USA). Os núcleos foram marcados com DAPI (1:10.000 em tampão PBS) e os neurônios foram identificados pela marcação com o anticorpo Neuro-Chrom Pan-Neuronal Marker (1:1000) (Millipore). As lâminas foram fechadas com Immuno-Mount e as imagens obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta, com lente de imersão a óleo, aumento de 40x1.30. A marcação de ApopTag foi detectada usando um feixe de laser com excitação em 543 nm e filtro LP 560, a marcação para neurônios foi detectada num comprimento de onda de 488 nm de excitação e um filtro que permite a passagem entre 510-550 nm, e finalmente o DAPI foi detectado usando um feixe excitável em 405 nm e um filtro 420-480. As células foram consideradas apoptóticas quando exibiam a marcação vermelha do ApopTag. A taxa de neurônios apoptóticos foi calculada como a porcentagem de células com núcleo TUNEL positivo que co-localizavam com a marcação neuronal, sobre o número de neurônios totais no campo. Em cada lâmina, 7 campos diferentes foram fotografados. Seis ensaios de TUNEL independentes foram realizados, a cada ensaio n amostral de 4 a 6 para cada grupo.

3.18 Ensaio de Imunofluorescência para Bax e Bcl-xL, em cultura de células hipocampusais

Após 6 h do tratamento, as células foram fixadas com PFA 4%, a temperatura ambiente, por 10 min, e em seguida lavadas 3 vezes com PBS (Na_2HPO_4 7.7 mM, NaH_2PO_4 2.3 mM, NaCl 150 mM). A etapa de permeabilização foi

realizada com 0,2% Triton X-100 em PBS, por 5 min sob leve agitação. Novamente as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e incubadas com tampão de bloqueio (% BSA em PBS), por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário em solução de PBS com 5% BSA, Bcl-xL (1:200) (54H6, Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, USA) ou Bax (1:100). Para a marcação com Bax foram testados 3 anticorpos diferentes, Anti-Bax Ab5354 (Abcam), Anti-Bax D3R2M (Cell Signaling) and Anti-Bax N-20 (Santa Cruz). Porém, para verificar a expressão de Bax e Bcl-2 em neurônios, as células também foram marcadas com o marcador neuronal Anti-Neuro-Chrom Pan Neuronal (1:1000)(Millipore). As células foram incubadas por 1 h, com os anticorpos primários, em temperatura ambiente ou *overnight* a 4 °C. Após o término da incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e o anticorpo secundário foi imediatamente adicionado. OS anticorpos secundários usados foram: Alexa Fluor Goat anti-Mouse (GAM) 488 (Invitrogen), Alexa Fluor Goat Anti-Rabbit (GAR) 546 (Invitrogen), Alexa Flour Donkey Anti-Rabbit 568 (Invitrogen).

3.18.1 Microesferas como padrão de intensidade de fluorescência

Como um padrão interno de intensidade de fluorescência, as microesferas do kit InSpeck™ Orange (540/560) Microscope Image Intensity Calibration Kit, 6 µm (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foram utilizadas em todas as lamínulas.

Após padronização, as microesferas de intensidade de fluorescência 0,3% foram selecionadas como as mais adequadas ao ensaio com as células, já para os ensaios de imunofluorescência de cortes de tecido a padronização mostrou que as microesferas de intensidade 10% são as mais adequadas. As microesferas foram aplicadas a lâmina de vidro para microscópio, limpa e seca, no volume de 5 µL por lamínula a ser adicionada. O volume foi espalhado com a própria ponteira da pipeta em uma área de diâmetro circular próximo ao da lamínula. As lâminas foram deixadas para secar, em temperatura ambiente, por 20 min, protegidas da luz. Uma vez secas, o meio de montagem pôde ser adicionado e as lamínulas contendo as células já marcadas no ensaio de imunofluorescência foram adicionadas a lâmina sobre a área que recebeu as microesferas. As lamínulas foram imediatamente seladas com esmalte. As imagens foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta, com lente de imersão em óleo de 63 x 1.40 DIC. As microesferas, a marcação para Bax ou para Bcl-xL foram detectadas por laser excitável em 568 nm

e filtro BP 560-615, a marcação para neurônios foi detectada por feixe excitável a 488 nm e filtro 505-530. A intensidade de fluorescência foi medida pelo software Fiji (NIH, ImageJ, USA), considerando a mesma área de interesse (ROI) para as microesferas e para a região do corpo celular dos neurônios. Foi feita uma relação entre a intensidade de fluorescência do Bax e do Bcl-xL com a intensidade de fluorescência padrão da microesfera em cada imagem. Os resultados foram expressos como a comparação da relação entre essas intensidades nos diferentes grupos. Todas as análises foram feitas no Software Prisma 4 (GraphPad, CA, USA).

3.19 Análises dos Resultados

Os dados decorrentes do ensaio de EMSA, PCR semi-quantitativo e de Western blot foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa “*ImageJ*” (National Institute of Health, USA), assim como os dados de imunofluorescência que foram quantificados conforme descrito em Arqués et al., 2012 (227). Os dados de Western blot, imunofluorescência, EMSA, ELISA, NKA e do labirinto aquático de Morris receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de uma via ou duas vias quando necessário, seguidos dos pós-testes *Student-Newman-Kewls* e Bonferroni, respectivamente, onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p < 0,05$. Os dados do ensaio de Coloração de Golgi-Cox foram analisados pelo Método de Sholl (228), usando um “*plug in*” do programa Image J chamado “Sholl Analysis” (National Institute of Health, USA). Os dados receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de uma via ou duas vias quando necessário, seguidos dos pós-testes *Student-Newman-Kewls* e Bonferroni, respectivamente, onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p < 0,05$. Todos os gráficos foram representados como a média dos valores $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.).

Os dados obtidos no ensaio de RT-PCR em tempo real foram analisados pelo teste de randomização e recolocação Pair Wise P(H1) (229), realizado no programa REST 2009 (Qiagen, Duesseldorf, ALE).

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica da posição das cânulas e infusão do traçador fluorescente

Para validar as coordenadas estereotáticas escolhidas foram realizadas duas técnicas diferentes de coloração. A primeira técnica foi a coloração de Nissl para aferir a posição das cânulas, e a segunda técnica foi a infusão de traçador retrógrado fluorescente, Fluoro-Gold (Sigma-Aldrich). Ambas as técnicas permitiram verificar que as coordenadas escolhidas para o implante das cânulas guias, assim como o volume infundido são adequados para o protocolo proposto.

As cânulas estão posicionadas sobre a região CA1 dorsal do hipocampo (Figura 13) e o traçador Fluoro-Gold, diluído a 2% em salina 0,9% no volume de 2 μ L está situado no hipocampo, distribuído pelas camadas CA1, CA2 e CA3, chegando até mesmo a camadas de células granulares do giro dentado (GD). O traçador parece espalhar-se a partir do ponto de infusão na coordenada ântero-posterior -3.5 mm em relação ao Bregma até as coordenadas -2.0 mm e -4.0mm, onde ainda é possível verificar a presença do traçador (Figura 14).

Figura 13 – Imagem de secção coronal do cérebro de rato com coloração de Nissl. As imagens representam dois encéfalos representativos (A e B), mostrando a inserção bilateral das cânulas guia (setas) exatamente sobre a região CA1 do hipocampo. CA1: região CA1 do hipocampo; GD: região do giro dentado.

Figura 14 – Imagem digital de secções coronais de hipocampo de rato 1 hora após a infusão do traçador retrógrado Fluoro-Gold. A linha (A) representa a marcação de Fluoro-Gold (verde) enquanto que a linha (B) representa a composição entre a marcação com o traçador e o DAPI (azul), o que permite identificar as sub-regiões do hipocampo que receberam o traçador. As figuras do controle negativo correspondem ao hemisfério contra-lateral que não recebeu a infusão de traçador fluorescente. Cortes mais posteriores, após a coordenada -4.2 mm em relação ao Bregma e porções ventrais do hipocampo caudal não receberam Fluoro-Gold em 1 h.

4.2 Determinação da atividade da NKA

O ensaio para determinar o grau de atividade da NKA foi feito com o objetivo de descartar a hipótese de que a dose escolhida, dentro desse decurso temporal, teria efeito inibitório na atividade da bomba, especialmente em isoformas mais sensíveis a inibição pela OUA como as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$, presentes predominantemente em células da glia e neurônios, respectivamente. O ensaio mostra que a concentração de OUA infundida no hipocampo dos animais (10 nM) não é capaz de alterar a atividade da bomba, no hipocampo, ao longo do decurso temporal (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da infusão da dose de OUA (10 nM) na atividade da NKA, ao longo do decurso temporal (1 h, 10 h e 24 h), em hipocampo de ratos, mostra ausência de inibição. Em (A) atividade total da NKA, (B) efeito da OUA 10 nM na atividade da $\alpha 1$ -NKA, em (C) na atividade da $\alpha 2,3$ -NKA. A atividade da NKA foi dosada a partir do hipocampo dos ratos, extraído após 1 h, 10 h e 24 h da infusão de OUA, ou salina. Os resultados estão expressos em nmol de Pi liberado/mg proteína por minuto (média + erro padrão da média), de 4 experimentos individuais. ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni.

4.3 OUA-NKA e a modulação de vias como a Src, PI3K-AKT e MAPK-ERK ao longo do decurso temporal, por ensaio de Western Blot.

Classicamente é descrito na literatura que a OUA em concentrações não inibitórias da atividade da NKA é capaz de ativar a via EGFR/Src-Ras-ERK (158) e ainda a via PI3K-AKT (126, 155). Tais modulações, consequentemente poderiam ativar vários fatores de transcrição, tais como CREB (elemento de resposta ligado ao AMP cíclico) e NF κ B (126, 150), importantes para a cognição, conforme previamente discutidos (2.1.1). Assim, chegamos à primeira pergunta do projeto (Figura 16).

Figura 16 - Esquema simplificado e ilustrativo da possível modulação das vias PI3K-AKT, Src-ERK e NF κ B pela ligação da OUA a NKA. As interrogações em vermelho ressaltam os pontos respondidos pelos ensaios de Western Blot.

Ensaio de Western Blotting foram realizados com extratos do hipocampo dos ratos tratados com OUA 10 nM e Salina 0,9% ao longo do decurso temporal, para mensurar a expressão das proteínas: (1) pSrc (Y529) e Src; (2) pERK1/2, ERK, pP38 e P38 total; (3) pAKT(S473), pAKT(Thr308) e AKT. Os resultados encontrados sugerem:

- (1) diminuição da fosforilação da Src quando normalizada pela expressão da Src total, em 10 h, o que sugere aumento da atividade da Src pela OUA em 10 h (Figura 17);

A.

B.

C.

Figura 17 - Modulação da Src pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal. (A) Ensaio de Western Blot: autorradiografia. **(B)** e Teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós- teste Bonferroni. Os dados mostram diminuição da fosforilação da Src no resíduo inibitório Y529 após 10 h da infusão de OUA na relação pSrc/Src. **(C)** Relação entre Src total e α-TUBULINA, sugere ausência de modulação. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, de 4 experimentos individuais. * $p < 0,05$, SAL x OUA. $n = 5$.

(2) ativação da via da ERK 1/2 após 1 h (Figura 18) e ausência de modulação da P38 (Figura 19);

Figura 18 - Modulação da ERK pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1, 10 e 24 h da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autorradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pERK1/2, ERK1/2 e β-ACTINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de pERK1/2 em relação a ERK1/2, ambos normalizados pela β-ACTINA, mostram aumento da fosforilação em 1 h ($p=0.0147$). **(C)** Relação entre a pERK1/2 e a β-ACTINA, sugere aumento da porção de proteínas fosforiladas em relação as proteínas totais do extrato, em 1 hora ($p=0.0113$). **(D)** Relação entre a ERK total e a β-ACTINA. O grupo sham não apresenta diferença em relação aos controles (dados não mostrados). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais, * $p<0,05$; Teste de Variância Two-Way ANOVA seguido do pós- teste Bonferroni, salina x OUA. $n=5$.

Figura 19 - Modulação da P38 pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1, 10 e 24 h da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autorradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pP38, P38 e β-ACTINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de pP38 em relação ao P38, ambos normalizados pela β-ACTINA. **(C)** Relação entre P38 total e a β-ACTINA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais; Teste de Variância Two-Way ANOVA seguido do pós- teste Bonferroni, salina x OUA, $n=4$.

(3) aumento na fosforilação da AKT no sítio Serina 473 (via mTOR) após 1 h (Figura 20) e da fosforilação da AKT no sítio da Treonina 308 (via PI3K) em 24 h (Figura 21).

Figura 20 - Modulação da fosforilação no resíduo Serina 473 da AKT, pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal. Ensaio de Western Blot: autorradiografia (A) Teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós- teste Bonferroni sugere em (B) aumento da atividade da AKT em 1 hora. (C) Ausência de variação significativa das proteínas fosforiladas em relação ao total de proteínas, normalizado pela β-ACTINA. (D) Relação entre AKT total e a β-ACTINA, com ausência de variação nas quantidades totais de proteínas. O grupo sham foi ocultado nos dados, mas mostra ausência de diferença comparada aos controles. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais. $n=4$, $*p<0,05$, SAL x OUA.

Figura 21 - Modulação da via PI3K-AKT pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal. Ensaio de Western Blot: autorradiografia **(A)** e Teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós- teste Bonferroni sugere em: **(B)** aumento da fosforilação da AKT no resíduo Thr308 após 24 h da infusão de OUA 10 nM. **(C)** ausência de variação na relação entre pAKT e a β -ACTINA. **(D)** relação entre AKT total e β -ACTINA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais. $n=5$, $**p<0,01$, SAL x OUA.

Assim, os resultados apresentados no item 4.3 nos permitem concluir que a OUA é capaz de ativar a via da ERK em 1 hora, e diminuir a inibição da Src em 10 h, porém ensaios extras para verificar a ativação da Src em períodos anteriores a 1 h não foram realizados. Além disso, e juntamente com os dados de ativação da AKT, em 1h e 24 h, surgem as perguntas subsequentes sobre o estado de modulação de vias como NF κ B, CREB e BDNF e GSK-3 β (quadro 1) no decurso temporal.

Quadro 1 - Esquema dos resultados parciais do item 4.3. Em decorrência dos achados surgem as perguntas das vias que estariam subsequentemente ativadas. Fonte: Orellana AMM.

4.4 Perfil de modulação da via do NFκB pela OUA 10 nM ao longo do decurso temporal, por EMSA, Imunofluorescência e Western Blot.

Para verificar o perfil de ativação do NFκB ao longo de decurso temporal, foi realizado um ensaio de EMSA. Os resultados mostraram que a OUA 10 nM é capaz de ativar o NFκB em 1 h e 10 h, mas não em 24 h (Figura 22). Também realizamos o ensaio de *super-shift* e de competição para identificar a composição dos dímeros que estavam presentes no núcleo e para verificar a especificidade do ensaio, respectivamente. Encontramos a composição de p65 e p50 (Figura 23), condizente com dados da literatura que mostram que no encéfalo de roedores adultos a maioria dos complexos formados de DNA-NFκB são constituídos pelos complexos p50/p65 (175, 183, 187, 230, 231).

Figura 22 - Ensaio de EMSA para NFκB de todos os grupos de decurso temporal. (A) Autoradiografia de ensaio de EMSA. As proteínas nucleares (10 μg) foram extraídas do hipocampo de ratos e obtidas após 1 h, 10 h e 24 h da infusão de OUA (10 nM), ou salina 0,9%. **(B)** Teste de Variância ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste Bonferroni mostra a ativação da via do NFκB em 1h e 10 h. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, de 4 experimentos individuais, sendo *** $p < 0,001$, salina x OUA.

Figura 23 - Ensaio de Competição e Super-shift da ativação do NFκB pela OUA (10 nM), no hipocampo de ratos. O ensaio de competição foi feito com extrato nuclear (10 µg) do hipocampo de ratos após 1 h, 10 h e 24 h da infusão de OUA (10 nM) na ausência e na presença da sequência consenso de NFκB não marcada com radioativo, na figura chamada de NFκB não ligado, (10 x em excesso) ou o oligonucleotídeo não específico (TFIID) 10 x em excesso, para verificar a especificidade do ensaio. Os resultados mostraram que a adição de um oligonucleotídeo não específico (TFIID) não é capaz de deslocar o NFκB de sua ligação na região promotora, mas ao contrário, o excesso da sequência consenso de NFκB não ligado ao radioativo é capaz de deslocar completamente o marcado da região promotora. O ensaio de *super shift* foi realizado com o mesmo extrato nuclear (10 µg) incubado na presença e na ausência de anticorpos contra as subunidades p50 (diluição 1:20), p65 (diluição 1:20) e cRel (diluição 1:20). Os anticorpos foram adicionados 20 min antes da adição do oligonucleotídeo consenso NFκB. O ensaio comprova que os dímeros presentes nas amostras são compostos de p50 e p65.

Para complementar os dados de ativação de NF κ B foram realizados ensaios de Western Blot para as proteínas pI κ B e I κ B (Figura 24) onde pudemos observar aumento da inativação do I κ B apenas em 1 h. Embora em 10 h pareça ter uma tendência, não houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 24 - Modulação do pI κ B pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot. (A) autorradiografia das bandas. Em **(B)** foi realizado Teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. Os dados mostram aumento da inativação do I κ B após 1 hora da infusão de OUA 10 nM. **(C)** Relação entre pI κ B e β -ACTINA e **(D)** relação entre I κ B e β -ACTINA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais. **p<0,01, n= 5, OUA vs salina.

Com o objetivo de localizar em que tipo celular essa ativação estava ocorrendo, foram realizados ensaios de imunofluorescência, em cortes de hipocampo de ratos submetidos à infusão de OUA 10 nM ou salina 0,9%. O ensaio foi realizado com o grupo 1 h, usando os anticorpos Anti-p65, Anti-GFAP, Anti-Iba-1 e Anti-NeuN, além de marcação com DAPI. As fotos obtidas nas regiões CA1 e DG do hipocampo sugerem que a presença de NF κ B ocorra predominantemente em neurônios e de forma mais abundante nas células granulares do giro dentado.

- Campo fotografado: hipocampo

Figura 25 - Fotomicrografia representativa dos ensaios de imunofluorescência dos cortes de hipocampo de ratos. Identificadas às regiões CA1 e DG. A seta branca indica a posição da cânula guia. Marcação com DAPI. Aumento de 4x. (CA1) Cornus Amonius 1; (DG) Giro dentado.

Figura 26 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência dos controles negativos. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, na região CA1 do hipocampo de um rato adulto sem nenhum tratamento, (B) marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Mouse 488, (C) marcação com o anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Rabbit 594. Lente objetiva de 20x (escala de 100 µm). As fotos foram tiradas com tempo de exposição superior ao utilizado nas demais fotos e sugerem baixa inespecificidade do anticorpo secundário.

- Dupla marcação para p65 e NeuN em CA1 Sham

Figura 27 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 do hipocampo de ratos submetidos a cirurgia porém que não receberam nenhuma infusão, grupo sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação neuronal para NeuN, (C) em vermelho, marcação para p65 (D) composição da tripla marcação sugere baixa expressão de p65, na região da camada das células piramidais do CA1. Lente objetiva de 40x (escala 50 μ m).

Salina 0,9%

Figura 28 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 do hipocampo de ratos após 1 hora da infusão de Salina 0,9%. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação neuronal para a proteína NeuN, (C) em vermelho, marcação para p65 (D) composição da tripla marcação com DAPI. As setas em branco apontam para alguns corpos celulares da camada de neurônios piramidais do CA1 que expressam p65. Lente objetiva de 20x (escala 100 μm).

OUA 10 nM

Figura 29 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 do hipocampo de ratos após 1 hora da infusão de OUA 10 nM, camada de neurônios piramidais. Ensaio de imunofluorescência com **(A)** marcador nuclear DAPI, **(B)** em verde, marcação neuronal com anti-NeuN, **(C)** em vermelho, marcação para p65, **(D)** composição da tripla marcação mostra a expressão de p65 em alguns núcleos neuronais indicados pela seta branca. Lente objetiva de 40x (escala de 50 µm).

- Dupla marcação de p65 e NeuN em Giro dentado (DG)

Sham

Figura 30 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região do Giro Dentado (DG) do hipocampo de ratos sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para neurônios com anti-NeuN (C) em vermelho, marcação para p65, (D) sobreposição da tripla marcação. As setas brancas indicam a presença de alguns núcleos neuronais que expressam p65. Lente objetiva de 20x (escala de 100 μm).

Salina 0,9%

Figura 31 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região do Giro Dentado (GD) do hipocampo de ratos após 1 hora da infusão de Salina 0,9%. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para neurônios com anti-NeuN (C) em vermelho, marcação para p65, (D) composição de imagens da tripla marcação. A seta branca indica um núcleo neuronal expressando p65. Lente objetiva de 20x (escala de 100 μm).

OUA 10 nM

Figura 32 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região do Giro Dentado (GD) do hipocampo de ratos após 1 h da infusão de OUA 10 nM. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação neuronal com anti-NeuN, (C) em vermelho, marcação para p65, (D) composição da tripla marcação. As setas em branco e o círculo branco apontam para alguns núcleos neuronais que expressam p65. Lente objetiva de 20x (escala de 100 µm).

Para descartar a hipótese de que o aumento de p65 nuclear observado nos ensaios de EMSA ocorresse em células da microglia e astrócitos, ensaio de imunofluorescência com marcação para Iba-1 e GFAP foi realizado.

▪ **Dupla marcação p65 e Iba-1 na região CA1**

Sham

Figura 33 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para p65, (C) em vermelho, marcação para Iba-1, (D) composição da tripla marcação. As setas em branco apontam a presença da p65 em alguns núcleos de células da camada de neurônios piramidais do CA1, no entanto não foi observado co-localização com marcação para microglia. Lente objetiva de 20x (escala 100 μm).

Salina 0,9%

Figura 34 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos do grupo Salina 0,9%. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para p65, (C) em vermelho, marcação para Iba-1, (D) composição da tripla marcação. As setas em branco apontam a presença de co-localização de p65 com marcação para microglia. Lente objetiva de 20x (escala 100 µm).

OUA 10 nM

Figura 35 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para p65, (C) em vermelho, marcação para Iba-1, (D) composição da tripla marcação. As setas em branco apontam a presença da p65 em alguns núcleos de células da camada de neurônios piramidais do CA1, sendo que apenas um núcleo com co-localização para a marcação de Iba-1 foi observado nesse corte. Lente objetiva de 20x (escala 100 μm).

- Dupla marcação para p65 e GFAP na região CA1

Sham

Figura 36 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para p65, (C) em vermelho, marcação para GFAP, (D) composição da tripla marcação Lente objetiva de 20x (escala de 100 µm).

Salina 0,9%

Figura 37 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para p65, (C) em vermelho, marcação para GFAP, (D) composição da tripla marcação sugere ausência de co-localização. Lente objetiva de 20x (escala de 50 μm).

OUA 10 nM

Figura 38 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para p65, (C) em vermelho, marcação para GFAP, (D) composição da tripla marcação sugere ausência de co-localização. Lente objetiva de 20x (escala de 50 µm).

4.5 Ativação do fator de transcrição CREB pela OUA 10 nM e aumento da expressão de BDNF, por ensaio de EMSA, Western Blot, PCR semi-quantitativo e ELISA.

Trabalhos previamente publicados por nosso grupo mostraram aumento da expressão da neurotrofina BDNF em hipocampo de ratos e cultura de neurônios cerebelares após tratamento com OUA (162, 232). Além disso, visto que as vias NFκB, AKT e ERK estão ativadas no hipocampo após a infusão da OUA 10 nM, com o objetivo de verificar se a via BDNF-CREB era modulada pelo glicosídeo no presente modelo, foram realizados os ensaios de EMSA para verificar a ocorrência da ativação do fator de transcrição CREB e Western Blot para mensurar os níveis de fosforilação no resíduo Ser 133 do CREB, em extrato nuclear. O próximo passo foi realizar um ensaio de ELISA para quantificação da expressão de BDNF no tecido e um ensaio de PCR semi-quantitativo para verificar a expressão de RNAm. Os resultados obtidos mostram que a OUA 10 nM é capaz de:

- ✓ aumentar a fosforilação do CREB nuclear no resíduo Ser 133 em 1 h e 10 h (Figura 39), ativando o CREB em 10 h (Figura 40);
- ✓ aumentar a transcrição de RNAm de BDNF em 1 h (Figura 41) e a expressão das proteínas BDNF em 10 h (Figura 42).

Figura 39 - Modulação da fosforilação de CREB (pSer133) nuclear pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot. (A) autorradiografia das bandas. Em (B) foi realizado Teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. Os dados mostram aumento de fosforilação do CREB após 1 h da infusão de OUA 10 nM e 10 h. (C) Relação entre pCREB e β-ACTINA, Teste de Variância ANOVA uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls sugere aumento da fosforilação da CREB em 1 hora e 10 h e (D) relação entre CREB e β-ACTINA, Teste de Variância ANOVA uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, de 2 experimentos individuais. *** $p < 0,001$, $n = 5$, OUA vs salina.

Figura 40 - Efeitos da OUA 10 nM ao longo do decurso temporal sobre a ativação do CREB por Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA). (A) Autorradiografia de ensaio de EMSA; (B) análise densitométrica das bandas. Na imagem à esquerda é possível verificar tendência de aumento da ativação do CREB em 1 h, com pico de ativação em 10 h, e tendência de diminuição em 24 h. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 2 experimentos individuais, $n=5$. * $p<0,05$ OUA vs salina; Teste de Variância ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni.

Figura 41 - Efeitos da administração da OUA (10 nM), ao longo do decurso temporal, na expressão do RNAm do gene *Bdnf* em hipocampo de rato. (A) Fotografias representativas das bandas no gel de agarose após a RT-PCR semi-quantitativo. (B) Análise densitométrica das bandas. Os valores (em Unidades Arbitrárias) encontrados de RNAm para o *Bdnf* foram normalizados pela intensidade das bandas relativas a expressão de RNAm do controle endógeno *Gapdh*. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para 2 experimentos individuais, $n=4$. *** $p<0.001$, Salina versus OUA. Teste de Variância ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni.

Figura 42 - Determinação dos níveis de expressão de BDNF após a infusão de OUA 10 nM ou Salina 0,9%, ao longo do decurso temporal (1 h, 10 h e 24 h), realizado por ensaio de ELISA. (A) Gráfico ilustrando as médias de todos os grupos, ao longo do decurso. Análise de Variância de uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls, sugere ausência de diferenças entre os grupos controles (sham vs salina 1 h, 10 h e 24 h) e aumento da expressão de BDNF em 10 h e diminuição em 24 h (salina vs OUA). **(B)** Análise de Variância de uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls, comparação entre os grupos sham 1 h vs salina 1 h vs OUA 1 h, sugere ausência de diferença estatística entre os grupos. **(C)** Análise de Variância de uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls, comparação entre os grupos sham 10 h vs salina 10 h vs OUA 10 h, sugere aumento da expressão de BDNF no grupo tratado ($p=0.0102$). **(D)** Análise de Variância de uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls, comparação entre os grupos sham 24 h vs salina 24 h vs OUA 24 h, sugere diminuição na expressão de BDNF no grupo tratado com OUA ($p=0.0236$). Os resultados estão expressos em pg de BDNF por μ g de proteínas totais da amostra de hipocampo. O gráfico mostra média $\pm$ erro padrão da média, de 2 experimentos individuais, n amostral entre 4-10. * $p<0,05$.

Quadro 2 - Esquema do resumo dos resultados dos itens 5.4 e 5.5. Os achados sugerem que a OUA 10 nM é capaz de aumentar a ativação da via do fator de transcrição NFκB, predominantemente em neurônios, em 1 h e 10 h, assim como aumentar a ativação do fator de transcrição CREB em 10 h, por ensaio de EMSA. No entanto, os resultados de Western Blot apontam para um aumento na fosforilação do CREB no resíduo ativador Ser 133 em 1 h e em 10 h. Por ensaio de RT-PCR semi-quantitativo verificou-se um aumento da transcrição de RNAm de *Bdnf* em 1 h e aumento da expressão da proteína em 10 h, com diminuição em 24 h. Setas pontilhadas em cinza apontam hipóteses. A interrogação vermelha chama a atenção para a próxima pergunta a ser respondida no item 4.6. Fonte: Orellana AMM.

4.6 Modulação da via AKT-GSK-3 β pela OUA 10 nM e da via canônica da WNT, ao longo do decurso temporal, por ensaio de Western Blot, Imunofluorescência e RT-PCR em tempo Real.

Para verificar se a GSK-3 β estava sendo modulada pela ativação da AKT foram realizados ensaios de Western Blot com anticorpos para os sítios de fosforilação da Ser21/9 da GSK-3 (α e β). Os resultados sugerem aumento da fosforilação da GSK-3 β em 24 h, o que indica que nesse período ela está inibida (Figura 43).

Figura 43 - Modulação da ativação da GSK-3 β pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot. (A) autorradiografia das bandas, **(B)** Relação entre pGSK-3 β e GSK-3 β . Para a análise de densitometria das bandas foi realizado Teste de Variância ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. O resultado sugere aumento da porção fosforilada após 24 h. **(C)** Relação entre pGSK-3 β e β -ACTINA sugere aumento da fosforilação da GSK-3 β em relação as proteínas totais. Teste de Variância ANOVA uma via, seguido de pós-teste Newman-Keuls. **(D)** Relação entre GSK-3 β total e a β -ACTINA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 3 experimentos individuais. *** $p < 0,001$, OUA vs salina. $n = 5$.

Pelo fato da GSK-3 β ser uma proteína chave na modulação de outras vias de sinalização, e conforme exposto no item 1.4 da introdução, participar da degradação do fator de transcrição β -CATENINA, protagonista da via canônica da WNT, foram realizados ensaios de Western Blot para verificar os níveis de fosforilação da proteína citosólica β -CATENINA nos resíduos Ser33/37/Thr41 que são os resíduos fosforilados pela GSK-3 β com a função de marcar a proteína para posterior degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Complementando os dados de fosforilação, também foi realizado ensaio de western blot da fração nuclear para verificar os níveis de translocação da β -CATENINA, estável pela diminuição de sua degradação. Os resultados sugerem diminuição da fosforilação da β -CATENINA em 10 h e 24 h (Figura 44), e aumento da translocação nuclear em 24 h (Figura 45).

Figura 44 - Modulação da translocação nuclear da β -CATENINA pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot. (A) autorradiografia das bandas, (B) análise densitométrica das bandas em unidades arbitrárias (U.A), por teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós-teste Bonferroni. A análise estatística sugere aumento da translocação nuclear da β -CATENINA em 24 h após a infusão de OUA. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais. * $p < 0,001$ OUA vs salina, $n=5$.**

Figura 45 - Modulação da fosforilação da β-CATENINA pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal, por Western Blot. (A) autorradiografia das bandas, **(B)** análise densitométrica das bandas em unidades arbitrárias (U.A.), por teste de Variância ANOVA duas vias seguido do pós-teste Bonferroni sugere diminuição da fosforilação dos resíduos Ser33/37/Thr41 da β-CATENINA citosólica. **(C)** Relação entre a fosforilação da β-CATENINA e β-ACTINA e **(D)** relação entre a β-CATENINA total e a β-ACTINA. Em **(C)** e **(D)** teste de variância ANOVA uma via seguido de pós-teste Newman-Keuls. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, de 3 experimentos individuais, n=5. *p<0,05 e ***p<0.001, OUA vs salina.

Com o objetivo de localizar em que tipo celular a sinalização da β -CATENINA estava aumentada e confirmar quantitativamente o aumento da translocação nuclear, foram realizados ensaios de imunofluorescência dos cortes de hipocampo de ratos após a cirurgia (sham), a infusão de Salina 0,9% (controle) e OUA 10 nM, em 24 h. Os resultados sugerem aumento nos neurônios de CA1 (Figura 57).

Para as triplas marcações de DAPI, β -CATENINA e GFAP, e DAPI, β -CATENINA e Iba-1 foram feitas fotografias apenas para verificar a localização, pois devido a ausência de co-localização, as imagens não foram quantificadas.

Figura 46 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência dos controles negativos. Ensaio de imunofluorescência feito em cortes do hipocampo de rato adulto, que recebeu a infusão de salina 0,9%, todas as fotos da região CA1 **(A)** marcador nuclear DAPI **(B)** marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Rabbit (DAR) 594, **(C)** marcação com o anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Mouse (DAM) 594, **(D)** marcação com DAPI do campo das fotos a seguir, **(E)** marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Rabbit 488 (DAR), **(F)** marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Goat (DAG) 594. Lente objetiva de 20x (escala de 100 μ m). As fotos foram tiradas com tempo de exposição superior ao utilizado nas demais fotos e sugerem baixa inespecificidade do anticorpo secundário.

▪ Tripla marcação: DAPI, β -CATENINA e GFAP

Figura 47 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e GFAP da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em vermelho, marcação para β -CATENINA, (C) em verde, marcação para GFAP, (D) composição da tripla marcação. Não foi observado co-localização da marcação de β -CATENINA com a marcação para astrócitos (GFAP). Lente objetiva de 20x (escala 100 μ m).

Figura 48 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e GFAP da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%, grupo 24 h. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em vermelho, marcação para β -CATENINA, (C) em verde, marcação para GFAP, (D) composição da tripla marcação. Não foi observado co-localização da marcação de β -CATENINA com a marcação para astrócitos (GFAP). Lente objetiva de 40x (escala 50 μ m).

Figura 49 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e GFAP da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM, grupo 24 h. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em vermelho, marcação para β -CATENINA, (C) em verde, marcação para GFAP, (D) composição da tripla marcação. A seta branca indica a co-localização em um núcleo de astrócito expressando β -CATENINA. Lente objetiva de 20x (escala 100 μ m).

▪ Tripla marcação: DAPI, β -CATENINA e Iba-1

Figura 50 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e Iba-1, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para β -CATENINA, (C) em vermelho, marcação para Iba-1, (D) composição da tripla marcação sugere ausência de co-localização. Lente objetiva de 40x (escala 50 μ m).

Figura 51 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e Iba-1, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%, grupo 24 h. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para β -CATENINA, (C) em vermelho, marcação para Iba-1, (D) composição da tripla marcação sugere ausência de co-localização. Lente objetiva de 40x (escala 50 μ m).

Figura 52 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e Iba-1, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM, grupo 24 h. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para β -CATENINA, (C) em vermelho, marcação para Iba-1, (D) composição da tripla marcação, as setas brancas indicam núcleos com co-localização da β -CATENINA, DAPI e marcação de Iba-1. Lente objetiva de 40x (escala 50 μ m).

▪ Tripla marcação: DAPI, β -CATENINA e NeuN

Figura 53 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e NeuN, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos sham. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para β -CATENINA, (C) em vermelho, marcação para NeuN, (D) composição da tripla marcação sugere baixa expressão de β -CATENINA e localização perinuclear. Lente objetiva de 20x (escala 100 μ m).

Figura 54 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e NeuN, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de Salina 0,9%, grupo 24 h. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para β -CATENINA, (C) em vermelho, marcação para NeuN, (D) composição da tripla marcação, sugere baixa expressão de β -CATENINA. Lente objetiva de 20x (escala 100 μ m).

Figura 55 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, β -CATENINA e NeuN, da região CA1 dorsal do hipocampo de ratos que receberam a infusão de OUA 10 nM, grupo 24 h. Ensaio de imunofluorescência com (A) marcador nuclear DAPI, (B) em verde, marcação para β -CATENINA, (C) em vermelho, marcação para NeuN, (D) composição da tripla marcação. O círculo branco indica a região de co-localização entre núcleos de neurônios (DAPI e NeuN) com a expressão de β -CATENINA, que inclusive aparece aumentada em relação aos grupos sham e controle. Lente objetiva de 20x (escala 100 μ m).

Figura 56 - Fotomicrografias representativas do ensaio de imunofluorescência dos controles negativos. Ensaio de imunofluorescência feito em cortes do hipocampo de rato adulto, que recebeu a infusão de salina 0,9%, todas as fotos da região CA1 **(A)** marcador nuclear DAPI **(B)** marcação com anticorpo secundário Alexa Fluor Donkey Anti-Rabbit (DAR) 488, as esferas verdes correspondem as microesferas fluorescentes utilizadas como padrão interno de fluorescência na intensidade 10% **(C)** marcação com o anticorpo secundário AlexaFluor Donkey Anti-Mouse (DAM) 594. Lente objetiva de 20x (escala de 100 µm). As fotos foram tiradas no tempo de exposição fixado para todas as fotos grupos sham, salina e OUA usadas na quantificação da expressão nuclear de β -CATENINA.

Figura 57 - Análise estatística da expressão de β -CATENINA por imunofluorescência. A Intensidade de fluorescência da β -CATENINA foi mensurada nos animais sham e após 24 h da infusão de Salina 0,9%, ou OUA 10 nM. Os resultados foram obtidos pela normalização da intensidade de fluorescência da marcação de β -CATENINA expressa em núcleos (DAPI) pela intensidade de fluorescência das microesferas, mantendo a mesma região de interesse (ROI). Teste de Variância ANOVA uma via seguido de pós-teste Newman-Keuls. As barras representam média de 12 fotos por animal, n=5, de 2 experimentos individuais. *** $p < 0.001$, OUA vs sham, OUA vs salina.

Assim, diante dos resultados até aqui descritos e conforme exposto anteriormente em itens da introdução, os próximos passos foram verificar a modulação da OUA 10 nM na transcrição do gene *Axina 2*, e verificar o nível de expressão proteica das proteínas c-Myc e CICLINA D1 (Quadro 3).

Quadro 3 - Esquema dos resultados do item 4.6. O tratamento com OUA aumenta a fosforilação da GSK-3 β (Ser9) pela via da AKT. O aumento da sua fosforilação representa aumento da inibição da sua atividade. Um dos papéis da GSK-3 β está relacionado com sua participação no complexo de destruição da via canônica da WNT. Nesse complexo, a atividade da GSK-3 β leva a fosforilação da proteína β -CATENINA, que é então marcada para destruição pelo sistema ubiquitina-proteassoma. No entanto, o aumento da fosforilação de GSK-3 β e a diminuição da sua atividade em 24 h culminam com a diminuição da fosforilação da β -CATENINA (em 10 h e 24 h) promovendo sua maior estabilidade e maior translocação nuclear (em 24 h). Uma vez no núcleo, a β -CATENINA pode desencadear a transcrição de genes específicos da via da WNT como *Axina 2*, que tem o papel de regulador negativo da ativação da via, e também de genes comuns as vias da AKT e ERK como *Ciclina D1* e *c-Myc*, importantes para a sobrevivência neuronal ou entrada da célula em apoptose. A seta pontilhada em cinza apontam hipóteses. Fonte: Orellana AMM.

Figura 58 - Modulação dos níveis de RNAm para *Axina 2* pelo tratamento com OUA, no decurso temporal, em hipocampo de ratos. Os níveis de RNAm codificando o gene *Axina 2*, foram mensurados em amostras de hipocampo de ratos submetidos a cirurgia de estereotaxia (sham) e à infusão de salina 0,9% (controle) e de OUA 10 nM. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (SEM), $n=5$ para cada grupo experimental. Teste de variância ANOVA uma via, seguido de pós-teste Newman Keuls, sugere aumento da expressão de RNAm para *Axina 2* em 24 h. ** $p<0.01$, salina vs OUA.

De acordo com o aumento da translocação nuclear da β -CATENINA em 24 h ocorre o aumento da transcrição do gene *Axina 2*, verificado por ensaio de RT-PCR tempo real. No entanto, ensaios de Western Blot para verificar o nível de expressão das proteínas c-MYC e CICLINA D1 mostram ausência de modulação pela OUA (Figura 59).

Figura 59 - Modulação das proteínas CICLINA D1 e c-MYC pela OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 24 h da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina ou sem nenhuma infusão (sham). **(A)** Autorradiografia representativa de Western Blot das proteínas CICLINA D1, c-MYC e β-ACTINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de CICLINA D1 em relação a β-ACTINA. **(C)** Relação entre c-MYC e a β-ACTINA. Resultados mostram ausência de modulação. N=2 experimentos individuais, Teste-T não pareado, salina x OUA. n=5.

4.7 OUA 10 nM como droga anti-apoptótica.

Essa sessão subdivide-se em duas, a primeira constitui uma etapa preliminar desenvolvida no Brasil no modelo *in vivo*, e uma segunda que constitui a etapa desenvolvida na Suécia, em um modelo *in vitro*.

4.7.1 Resultados no modelo de infusão intrahipocampal de OUA 10 nM, ou Salina 0,9% no decurso temporal.

Visto que a OUA modula vias de sinalização que estão diretamente envolvidas com crescimento, sobrevivência, proliferação (neurogênese, no caso da formação hipocampal) e diferenciação celular como as vias da AKT, da ERK, do

NFkB e da WNT, um ensaio de RT-PCR semi-quantitativo foi realizado para verificar se havia alteração na expressão de genes relacionados a apoptose, *Bax* e *Bcl-2*. Os resultados encontrados em nosso modelo sugerem aumento de *Bcl-2* (papel anti-apoptótico) em 1 h e diminuição do *Bax* em 10 h (fator pró-apoptótico). A relação entre a expressão dos dois genes em cada ponto do decurso parece não se alterar, conforme ilustrado na Figura 60.

Figura 60 – Efeitos da administração da OUA (10 nM), ao longo do decurso temporal, na expressão do RNAm dos genes *Bax* e *Bcl-2* em hipocampo de rato. (A) Fotografias representativas das bandas no gel de agarose após a RT-PCR semi-quantitativo. **(B)** Análise densitométrica das bandas. Relação entre a expressão de RNAm de *Bax* comparado ao *Bcl-2*, em cada tempo, sugere ausência de diferença estatística. **(C)** Relação entre os valores de *Bcl-2* normalizados pela intensidade das bandas relativas a expressão de RNAm do controle endógeno *Gapdh*. Aumento da expressão de RNAm de *Bcl-2* após 1 hora do tratamento com OUA 10 nM. **(D)** Relação entre os valores de *Bax* normalizados pelo *Gapdh*, ao longo do decurso, sugere diminuição da transcrição de *Bax* em 10 h após o tratamento com OUA 10 nM. Todas as análises foram feitas usando-se o Teste de Variância ANOVA duas vias, seguido de pós-teste Bonferroni. Valores expressos em unidades arbitrárias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para 2 experimentos individuais, n=5. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, Salina versus OUA.

4.7.2 Resultados do tratamento de OUA 10 nM em modelo de cultura primária embrionária de hipocampo de rato, frente a um estímulo excitotóxico (tratamento com NMDA).

Essa etapa foi realizada no período de doutorado sanduíche, no *Karolinska Institute*, em Estocolmo, Suécia (BEPE 2015/13295-4), sob a supervisão da Dra Anita Aperia e do Dr. Hjalmar Brismar.

Com o objetivo de melhor compreender a ação da OUA 10 nM na sobrevivência neuronal, neurônios hipocampais maduros, com conexões bem estabelecidas, foram expostos por 5 min ao NMDA 100 μ M, com ou sem OUA 10 nM, simulando o processo de excitotoxicidade, proposto e padronizado em D'Orsi et al., 2015 (79). O esquema de tratamento está ilustrado na Figura 12. Ensaio de TUNEL foram realizados. Os resultados sugerem que a OUA 10 nM é capaz de impedir a apoptose em neurônios expostos ao NMDA 100 μ M (tabela 2 e figura 61). Os neurônios tratados apenas com aCSF apresentaram uma média de 6% de neurônios em apoptose ($\pm 3,32\%$), no entanto, quando tratados por 5 min com NMDA 100 μ M essa média subiu para 19,7% ($\pm 6,63\%$), e finalmente quando a OUA era adicionada a taxa de apoptose reduzia-se para 8,7% ($\pm 2,58\%$). Neurônios tratados apenas com OUA 10 nM apresentam uma taxa de apoptose de 10,69% ($\pm 2,86\%$).

Figura 61 - Análise estatística do ensaio de TUNEL de neurônios hipocampais tratados com ou sem OUA 10 nM. Os neurônios derivam de cultura primária embrionária de hipocampo de rato, realizada no dia E18, e cultivada por 21 dias, quando receberam os tratamentos por 5 min, foram lavadas três vezes com aCSF seguida de uma incubação de 8 h com o meio de cultura Neurobasal contendo 2% B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,5 mM de

L-glutamina com ou sem adição de OUA 10 nM. Análise estatística do grupo controle (aCSF), NMDA, NMDA+OUA e OUA. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Bonferroni. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, para $n=4-6$, de 6 experimentos individuais. Imagens capturadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta, lente de imersão em óleo, 40x/1.30 DIC.

Figura 62 - Fotomicrografias da marcação de neurônios hipocâmpais para TUNEL. Os neurônios derivam de cultura primária embrionária de hipocampo de rato, realizada no dia E18, e cultivada por 21 dias, quando receberam os tratamentos por 5 min, foram lavadas três vezes com aCSF seguida de uma incubação de 8 h com o meio de cultura Neurobasal 2% B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,5mM de L-glutamina com ou sem OUA 10 nM. As setas brancas indicam os núcleos neuronais positivos para a marcação de TUNEL. As células receberam tripla marcação. Em vermelho, TUNEL, em verde Pan-Neuronal e em azul DAPI. **(A)** Grupo controle que recebeu apenas aCSF. **(B)** Neurônios foram tratados com NMDA. **(C)** Neurônios tratados com NMDA+OUA. **(D)** Neurônios tratados apenas com OUA.

Visto que a OUA 10 nM é capaz de impedir os neurônios de entrarem em apoptose frente a um estímulo excitotóxico, a próxima etapa foi verificar a expressão das proteínas Bax e Bcl-xL por imunofluorescência. O Bcl-xL é um importante fator anti-apoptótico e bastante expresso em neurônios. Os resultados sugerem que o tratamento com NMDA 100 μ M diminui a expressão de Bcl-xL ($0,02\% \pm 0,01\%$) quando comparada a expressão no grupo controle ($0,04\% \pm 0,02\%$). Quando os neurônios foram tratados com NMDA+OUA, houve um aumento da expressão de Bcl-xL ($0,03 \pm 0,01\%$) quando comparados aos que receberam apenas NMDA, embora o aumento não reestabeleça os níveis do grupo controle. Os neurônios tratados apenas com OUA não apresentam diferença estatística de expressão de Bcl-xL ($0,05 \pm 0,02\%$) comparados ao controle. O que sugere que a OUA é capaz de modular a sinalização anti-apoptótica frente a um estímulo lesivo (Figura 63). Os anticorpos usados para Bax não funcionaram, de forma que não foi possível obter resultados.

Figura 63 - Análise estatística do ensaio de imunofluorescência para Bcl-xL. O ensaio de imunofluorescência com tripla marcação para DAPI, Bcl-xL e Pan-Neuronal foi realizada 6 h após as células neuronais receberem tratamento. Os resultados foram obtidos pela comparação da fluorescência de uma região de interesse (ROI) do controle, com os grupos tratados, todos os valores normalizados pela intensidade de fluorescência no mesmo ROI das microesferas padrão, utilizadas nesse ensaio as de intensidade 0,3%. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, para $n=4-6$, de 5 experimentos individuais.

Figura 64 - Imunofluorescência de neurônios hipocâmpais com marcação para Bcl-xL. Neurônios derivados de cultura primária embrionária de hipocampo E18 foram cultivados por 21 dias quando receberam o tratamento por 5 min. Após o tratamento,

os neurônios foram incubados por 6 h após as quais o ensaio de imunofluorescência foi realizado. A coluna da esquerda agrupa os campos fotografados para a marcação em verde correspondente ao marcador neuronal Pan-Neuronal, a coluna central agrupa os campos fotografados com a marcação para Bcl-xL e a coluna a direita representa as composições de neurônios que expressam Bcl-xL. **(A)** Grupo controle tratado apenas com aCSF, **(B)** NMDA 100 μ M, **(C)** NMDA+OUA e **(D)** OUA 10 nM. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM Meta, lente de imersão em óleo, 63x/1.40.

Quadro 4 - Conclusão parcial dos resultados apresentados até o item 4.7. O panorama geral dos resultados até o momento apresentados permite inferir que a OUA 10 nM é capaz de promover uma série de modificações no ambiente celular, dentre os quais podemos citar ativação das vias AKT, ERK, NFkB, CREB-BDNF e canônica da WNT que possivelmente conferem a ela, OUA, um papel protetor frente a um estímulo excitotóxico moderado, impedindo a apoptose neuronal. Em consequência da ativação de diversas vias relacionadas à sobrevivência, crescimento e diferenciação, as próximas perguntas que surgiram foram referentes à capacidade da OUA em modular a plasticidade sináptica, levando a alterações morfológicas e melhora cognitiva. Fonte: Orellana AMM.

4.8 Coloração de Golgi Cox: OUA aumenta a arborização dendrítica

Para verificar se a OUA 10 nM tem algum efeito sob a morfologia neuronal o ensaio de coloração de Golgi-Cox (233) foi realizado após 7 e 14 dias da infusão de OUA 10 nM. Os resultados foram analisados pelo programa *ImageJ* (National Institute of Health, USA) que contém um “*Plug in*” chamado “*Sholl Analysis*”. A análise de Sholl é um método específico para a quantificação da árvore dendrítica, pois traça círculos consecutivos e concêntricos a partir do corpo celular e conta o número de intersecções dos dendritos (N) ao longo do raio crescente (r) (234), além de calcular diferentes variáveis, como o raio máximo, que corresponde a maior distância alcançada por um dendrito, o índice de ramificação (que é uma relação entre o valor máximo de intersecções calculado dividido pelo número de dendritos primários que saem do corpo celular) e também dá um “*valor médio*” que consiste no número máximo de intersecções dividido pela área total ocupada por toda árvore dendrítica do neurônio, dentre outros parâmetros (228).

Surpreendentemente encontramos aumento de arborização dendrítica na região CA1, após 7 dias e persistentemente após 14 dias. Na figura 65, podemos observar aumento na soma das intersecções, no número médio delas, no índice de ramificações, e no número máximo de intersecções relativo à área total, o que sugere que sete dias após receber OUA houve um aumento da árvore dendrítica pela OUA. Nada se observou no DG, em 7 dias (Figura 66). No grupo 14 dias, observamos que os animais que receberam OUA apresentaram dendritos mais compridos em relação ao grupo controle e sham (Figura 67A), assim como maior número de intersecções, índice de ramificação e “*valor médio*” (Figura 67). Quando analisamos a região do DG dos animais do grupo 14 dias (Figura 68) pudemos observar aumento da soma das intersecções (Figura 38 D) sem que nenhum outro parâmetro sofresse alteração. As fotomicrografias foram tiradas entre as coordenadas -2.8 mm e -4.5mm, em relação ao Bregma.

Figura 65 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região CA1 do hipocampo de ratos após 7 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham. Na parte superior fotos representativas de cada um dos grupos obtidas no programa Image J (preto e branco), na parte inferior, as fotos coloridas correspondem aos neurônios analisados com círculos concêntricos coloridos. Imagem fornecida pela Análise de Sholl. Na parte inferior, gráficos correspondentes ao Teste de Variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls **(A)** comparação do comprimento dendrítico máximo; **(B)** comparação entre o número de dendritos primários por corpo celular; **(C)** Soma das intersecções; **(D)** índice de ramificação **(E)** Valor Médio do neurônio; **(F)** A Soma das intersecções dividida pelo raio máximo alcançado. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais, e 6 campos por experimento. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, Salina x OUA, Sham x OUA.

Figura 66 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região Giro dentado do hipocampo de ratos após 7 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham, no CA1. Na parte superior fotos representativas de cada um dos grupos obtidas no programa Image J (preto e branco), na parte inferior, as fotos coloridas correspondem aos neurônios analisados com círculos concêntricos coloridos. Imagem fornecida na Análise de Sholl. Na parte inferior, gráficos correspondentes ao Teste de Variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls **(A)** comparação do comprimento dendrítico máximo; **(B)** comparação entre o número de dendritos primários por corpo celular; **(C)** Soma das intersecções; **(D)** A Soma das intersecções dividida pelo raio máximo alcançado; **(E)** índice de ramificação; **(F)** Valor Médio do neurônio. Não existe diferença estatística entre os grupos.

Figura 67 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região CA1 do hipocampo de ratos após 14 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham. Na parte superior fotos representativas de cada um dos grupos obtidas no programa ImageJ (preto e branco), na parte inferior, as fotos coloridas correspondem aos neurônios sob análise com círculos concêntricos coloridos. Imagem fornecida pela Análise de Sholl. Na parte inferior, gráficos correspondentes ao Teste de Variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls **(A)** comparação do comprimento dendrítico máximo; **(B)** comparação entre o número de dendritos primários por corpo celular; **(C)** Soma das intersecções; **(D)** A Soma das intersecções dividida pelo raio máximo alcançado; **(E)** índice de ramificação; **(F)** Valor Médio do neurônio. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais, e 20 campos por experimento. *** $P < 0,001$, salina x OUA, sham x OUA.

Figura 68 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região DG do hipocampo de ratos após 14 dias da infusão de OUA 10 nM, salina 0,9% e grupo sham, no CA1. Na parte superior fotos representativas de cada um dos grupos obtidas no programa ImageJ (preto e branco), na parte inferior, as fotos coloridas correspondem aos neurônios sob análise com círculos concêntricos coloridos. Imagem fornecida na Análise de Sholl. Na parte inferior, gráficos correspondentes ao Teste de Variância One-Way ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls **(A)** comparação do comprimento dendrítico máximo; **(B)** comparação entre o número de dendritos primários por corpo celular; **(C)** Soma das intersecções dividida pelo raio máximo alcançado; **(D)** Soma das intersecções; **(E)** índice de ramificação; **(F)** Valor Médio do neurônio. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, de 4 experimentos individuais, e 20 campos por experimento. ** $P < 0,01$, salina x OUA, sham x OUA.

4.9 O Labirinto Aquático de Morris

Para verificar se as alterações morfológicas observadas no item 4.8 repercutiam em melhora cognitiva, o teste comportamental Labirinto Aquático de Morris foi realizado. Esse teste é capaz de detectar lesões hipocampais sutis, assim como melhora na memória espacial e também na memória operacional. O esquema experimental executado está explicado na Figura 69.

Figura 69 - Esquema experimental do Labirinto Aquático de Morris. Ratos Wistar adultos foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implante de cânulas guia sobre a camada de neurônios piramidais do CA1 do hipocampo. Os animais permaneceram no biotério para plena recuperação cirúrgica por 10 dias. No décimo dia receberam a infusão de OUA 10 nM e salina 0,9%. O dia da infusão passa a ser considerado o dia 1 do protocolo experimental do teste de comportamento, pois, os animais permaneceram por mais 6 dias no biotério para que a arborização dendrítica ocorresse e no sétimo dia após a infusão os animais iniciariam o treino de memória de referência, com 4 tentativas por dia, de 2 min de duração, com intervalo entre tentativas (ITI) de 10 min. Os animais foram treinados por 7 dias e quando estavam no décimo quarto dia, supostamente no auge da arborização dendrítica observada, foram submetidos ao teste de Probe 1 (24 h após o último treino) e 48 h depois, ou seja, no décimo quinto dia foram submetidos ao teste de Probe 2. Os animais tiveram um dia de intervalo e no décimo sétimo dia do protocolo foram submetidos ao teste de Memória operacional, por 3 dias, 3 tentativas por dia, com 2 min de duração e ITI de 10 min. Após o término do protocolo experimental comportamental, no vigésimo dia, os animais foram submetidos a eutanásia e o encéfalo foi removido para coloração de Golgi Cox. Em paralelo, alguns dos animais que receberam a infusão no dia 01 do protocolo não foram submetidos aos testes de comportamento e permaneceram no biotério, nas mesmas condições dos grupos anteriores, para serem utilizados como controle dos grupos submetidos aos testes comportamentais, no ensaio de coloração de Golgi Cox, 20 dias após a infusão.

4.9.1 Resultados do Treino da Memória de Referência

Figura 70 - Treino de Memória de Referência, Teste comportamental Labirinto Aquático de Morris. Ratos Wistar adultos 7 dias após receberem infusão intrahipocampal de salina 0,9% ou OUA 10 nM foram submetidos ao treino de memória de referência por 7 dias. A cada dia, os animais passaram por 4 treinos de 2 min de duração e ITI de 10 min. **(A)** Média do tempo dispendido para achar a plataforma, a cada dia, ao longo dos sete dias. **(B)** Velocidade média de deslocamento dos animais, **(C)** Média do comprimento de trajeto percorrido para achar a plataforma. Teste de Variância ANOVA de duas vias, seguido de pós-teste Bonferroni. Os resultados estão expressos em média, $\pm$ erro padrão da média, $n=12$, salina vs OUA. Os resultados sugerem que os animais de ambos os grupos aprendem igualmente a tarefa, sem prejuízo de locomoção ou de motivação.

4.9.2 Resultados do Teste de Probe

Figura 71 - Teste de Probe de Memória de Referência, no Labirinto Aquático de Morris. Os testes de probe foram realizados 24 h e 48 h depois da última sessão de treino, ocorrendo no décimo quarto e décimo quinto dias, respectivamente, PT 1 e PT 2. Os parâmetros analisados permitem inferir que a OUA 10 nM é capaz de melhorar a memória espacial, sem prejuízo na locomoção ou na motivação com que os animais realizam a tarefa. Todos os gráficos foram obtidos por Teste de Variância ANOVA duas vias, seguido de pós-teste Bonferroni, analisando-se minuto a minuto. **(A)** Tempo que os animais exploram o quadrante da piscina onde durante os treinos se encontrava a plataforma. **(B)** Tempo que o animal dispende na área do contador da plataforma, **(C)** porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrante crítico, ou da plataforma, **(D)** frequência relativa do animal no quadrante crítico, **(E)** comprimento de trajeto percorrido, **(F)** ângulo inicial com que o animal sai em busca da plataforma, **(G)** tempo que o animal dispende no centro da piscina sugere que os animais do grupo OUA utilizam-se de diferentes estratégias para localizar a plataforma, quando comparado ao controle. **(H)** tempo dispendido no anel B, em torno do centro, **(I)** tempo no anel C, **(J)** velocidade de locomoção dos animais. A cada dia, os animais foram expostos a um teste de 3 min de duração. Os resultados estão expressos em média, $\pm$ erro padrão da média, $n=12$, salina vs OUA, * $p<0.05$; ** $p<0.01$ e *** $p<0.001$.

4.9.3 Memória de Trabalho

Figura 72 - Teste de Memória Operacional, Labirinto Aquático de Morris. O teste de memória operacional foi realizado ao longo de três dias, no qual a cada dia a plataforma oculta se encontrava em um quadrante diferente. Em cada um dos dias foram realizadas três tentativas, de 2 min de duração e ITI de 10 min. Todos os gráficos foram obtidos por Teste de Variância ANOVA duas vias, seguido de pós-teste Bonferroni, analisando-se a média dos 2 min a cada tentativa. **(A)** Latência, tempo que os animais demoraram a encontrar a plataforma. **(B)** Tempo que o animal dispendeu no quadrante onde está a plataforma, **(C)** tempo que o animal dispendeu no contador onde a plataforma estava no dia anterior, **(D)** frequência relativa do animal no quadrante onde estava a plataforma no dia anterior, **(E)** comprimento de trajeto percorrido, **(F)** velocidade de locomoção dos animais. Os resultados estão expressos em média, $\pm$ erro padrão da média, $n=12$, salina vs OUA, $*p<0.05$.

Assim, os animais que receberam a infusão de OUA 10 nM parecem se lembrar melhor, inicialmente, da posição da plataforma, após 24 h e parecem não ter esquecido após 48 h, comparado aos animais que receberam a infusão de Salina 0,9%, conforme Figura 71. Ambos os grupos tem mesma motivação para desempenhar a tarefa e apresentam mesma capacidade locomotora. No teste de memória operacional, realizado 24 h depois do último teste de memória de referência, os animais que receberam OUA 10 nM parecem lembra-se melhor da nova posição da plataforma, visto que apresentam uma latência menor para localizá-la e realizam um trajeto mais curto, conforme figura 72. No entanto, no segundo dia de teste de memória operacional os animais tratados com OUA parecem ter seu desempenho piorado em relação ao controle, no entanto a diferença não é significativa estatisticamente. No terceiro dia, no entanto, fica mais evidente que os animais que receberam OUA têm maior dificuldade de extinção de memória, pois além de demorarem mais para localizar a plataforma na nova posição, ainda passam mais tempo buscando pela plataforma na posição do dia anterior.

4.9.4 Coloração de Golgi Cox comparativa entre os animais submetidos ou não ao teste comportamental

Para verificar a morfologia desses neurônios e se a OUA 10 nM ainda era capaz de manter o aumento da rede dendrítica após 21 dias da infusão, os animais submetidos ao teste comportamental Labirinto Aquático de Morris e mais dois grupos que foram submetidos a cirurgia na mesma época, a infusão no mesmo dia, porém que permaneceram no biotério sedentários foram submetidos a eutanásia e seus encéfalos foram corados pelo método de Golgi Cox. A Análise de Sholl revela que apenas os animais submetidos a atividade física (Labirinto Aquático de Morris) e que receberam a infusão de OUA 10 nM mantiveram aumento de arborização dendrítica, conforme figura 73.

Figura 73 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração de Golgi-Cox da região CA1 do hipocampo de ratos após 21 dias da infusão de OUA 10 nM ou salina 0,9%, em animais submetidos ao teste comportamental Labirinto Aquático de Morris (LAM) ou que permaneceram no biotério (controle). Na parte superior fotos representativas de cada um dos grupos, obtidas no programa ImageJ (preto e branco), e a direita de cada uma sua respectiva imagem correspondente a análise com círculos concêntricos. Imagem fornecida pela Análise de Sholl. Na parte inferior, gráficos correspondentes ao Teste de Variância ANOVA duas vias, seguido do pós-teste Bonferroni **(A)** comparação do comprimento dendrítico máximo, revela um efeito do protocolo do teste comportamental LAM, pois os animais submetidos ao teste parecem ter dendritos mais curtos quando comparado aos animais controle. **(B)** Índice de ramificação, comparação da média de intersecções normalizada pela área ocupada pela árvore dendrítica. O resultado sugere que a OUA 10 nM é capaz de aumentar esse parâmetro quando comparado aos controles LAM e sedentário; **(C)** Soma das intersecções; **(D)** Número máximo de intersecções normalizado pelo número de dendritos primários. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=4$, e 10-15 campos por experimento. * $p<0,05$ e *** $P<0,001$, salina x OUA, controle sedentário vs LAM.

5 DISCUSSÃO

5.1 A administração de OUA 10 nM não altera a atividade da NKA

Os glicosídeos cardiotônicos têm sido usados por longa data para o controle de pragas e até mesmo em homicídios desde os remotos tempos da civilização Egípcia, do Império Romano e na China (235), porém foi no século XVIII que seu uso terapêutico teve início para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (236). Desde então muitos estudos sobre sua aplicação e efeitos no sistema cardiovascular têm sido publicados. Em 1992, Hamlyn e Manunta publicaram um estudo no qual a proposta era quantificar as concentrações plasmáticas fisiológicas da OUA endógena em seres humanos, cachorro e ratos. Os resultados sugeriam que em humanos a concentração fisiológica de OUA endógena estaria entre 0,6-1,0 nM, e parecia aumentar com a faixa etária, já para ratos adultos Sprague-Dawley essa faixa estava entre 0,8-1,2 nM e no cachorro entre 235- 415 pM. As dosagens foram realizadas pelas técnicas de radioimunoensaio e ELISA (237). Estudos posteriormente realizados em roedores mostraram ainda que, no sistema cardiovascular, doses de OUA entre 1-10 nM eram capazes de aumentar a atividade da NKA (238, 239).

Em cultura de células precursoras neuronais humanas (NT2) e em células de feocromocitoma da medula adrenal de ratos (PC2) o tratamento com OUA na faixa de 0,1-10 nM foi capaz de aumentar a viabilidade e a proliferação dessas células (240). Resultados parecidos foram observados em cultura de células do túbulo proximal de ratos (241, 242). No SNC, o trabalho de Song et al., sugere que OUA 3 nM adicionada a cultura primária embrionária mista de hipocampo de ratos é capaz de aumentar a oscilação dos níveis de Ca^{2+} potencializando os efeitos da sinalização glutamatérgica (243).

Alguns trabalhos propõem ainda que existe um IC₅₀ para a OUA (244-247) sendo que doses abaixo desse IC₅₀ teriam um efeito estimulador da atividade da NKA, enquanto que doses próximas ao IC 50 usados na clínica para tratar ICC e arritmias teriam um efeito inibitório sobre a atividade da bomba (248). Para o cérebro de roedores foi estabelecido o IC 50 das isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ nas doses de 1,3 mM, 4,5 μM e 2,9 μM , respectivamente (249). Oselkin e colaboradores trataram culturas de fatias de hipocampo de rato (*slice*) com OUA por 60 min, nas doses de 15 nM, 120 nM e 1,2 μM , ou seja, abaixo do IC₅₀ preconizado na literatura. Os

resultados observados sugerem que a dose de 1,2 μ M (próxima do IC₅₀) foi capaz de inibir a atividade das isoformas α 2 e α 3, enquanto que a dose de 120 nM foi capaz de aumentar a atividade da NKA, e em concordância com nossos dados (Figura 15), a dose de 15 nM não teve efeito na atividade da NKA (248), assim como a dose de 10 nM também não teve em hipocampo de ratos adultos sugerindo que os efeitos observados pelo tratamento com OUA não se devem a um efeito inibitório na atividade da bomba.

5.2 A OUA sinaliza pela via da Src-ERK1/2 e pela via MAPK-AKT

Em 2000, Haas et al., descreveram que a adição de baixas doses de OUA a cultura neonatal de cardiomiócitos era capaz de ativar rapidamente a Src (250) e com isso em 2002, Xie e Askari puderam verificar que a OUA em baixas doses ativava o complexo EGFR/Src-Ras-ERK1/2 (126). Em 2005, Tian et al., propuseram a existência de um *pool* inativo de Src que ficaria ligado aos domínios intracelulares das subunidades α da NKA (251). A partir daí vários trabalhos da literatura mostraram que a OUA ativa a ERK1/2, (125, 158) sendo que em 2013 De Sá Lima et al., sugeriram o envolvimento da via NMDA-Src-Ras-MAPK na ativação do NF κ B pela OUA em cultura de células primárias granulares do cerebelo (232).

Também em 2013, Wu et al., mostraram que a existência do complexo pré-formado entre a Src e a NKA seria irrelevante para a ativação da PI3K-AKT, mas importante para a ativação da ERK1/2. Nesse trabalho, o grupo observou que quando uma linhagem de fibroblastos deficiente em Src (células SYF) era tratada com OUA, não havia comprometimento na ativação da PI3K e da AKT, porém, a ativação da ERK1/2 deixava de ocorrer (160).

Assim, fomos verificar o perfil de modulação da Src, ERK1/2, P38 e da via da AKT pela OUA no decurso temporal. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com OUA diminui a fosforilação do resíduo inibitório da Src na tirosina (Y529) após 10 h da infusão, o que sugere que pode haver aumento da atividade da Src em 10 h (Figura 17). Como, provavelmente, a Src seja a responsável pela ativação da ERK1/2 observada em 1 hora (Figura 18), acreditamos que talvez a Src possa ser ativada num período anterior há 1 hora, no entanto, nenhum ensaio foi feito para verificar tal hipótese. Achados do grupo Ketchem et al., mostraram que células do túbulo proximal renal humanas (HKC11) quando tratadas com OUA 10

nM apresentam ativação da Src em 15 minutos (252). Além disso, cultura primária de neurônios cerebelares quando tratadas com OUA 10 μ M por 2 h, também apresentaram aumento da ativação da Src nesse período (de Sá Lima et al., 2013).

A proteína quinase Src tem sua atividade regulada com bastante precisão. Um dos importantes resíduos de fosforilação da Src é a Tirosina 529 (Y529), situada em posições intramoleculares dos domínios SH2, que quando fosforilado torna-a inativa. Quando a Src se torna disponível para a ativação, ocorre a desfosforilação desse resíduo Y529 e a autofosforilação do resíduo Y418, presente no loop de ativação e que, portanto irá promover a atividade de quinase da Src (253). Não há modulação aparente da P38 (Figura 19).

Em relação à via da AKT, os resultados sugerem ativação da via AKT/mTOR em 1 h pelo aumento na fosforilação da AKT na Serina 473 (via mTOR)(Figura 20) e aumento da fosforilação no resíduo Thr 308 (via PI3K) em 24 h (Figura 21). A PI3K fosforila o anel inositol do fosfatidil inositol (4,5) bisfosfato (PIP2) na posição D-3 para formar o fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato (PIP3), o qual é necessário para ativação da quinase AKT. Uma vez recrutada à membrana plasmática, a AKT pode ser fosforilada em dois sítios diferentes: um deles é o sítio catalítico Thr308, fosforilado pela PDK1 (*phosphoinositol-dependent kinase 1*), e o outro é o domínio regulatório S473 fosforilado pelo mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*)(254). A via da PI3K/AKT exerce papel fundamental na sinalização de sobrevivência de neurônios (255), mas também é importante para a proliferação celular, para o controle do metabolismo e crescimento (256-258). Fato interessante sugerido pela literatura é que a ativação da via PI3K/AKT pode levar a transativação do NF κ B, aumento da sua translocação nuclear (258, 259).

5.3 OUA ativa a via do NF κ B

Alguns trabalhos da literatura sugerem que a OUA é capaz de ativar a via do NF κ B, em células do epitélio renal (129) em células do túbulo proximal de ratos (149, 150), em hipocampo de ratos (162), em cultura neuronal de cerebelo (232) e em cultura de glia (260).

Em concordância com os dados da literatura, pudemos observar que a OUA ativou o NF κ B em 1 h e 10 h, mas não em 24 h (Figura 22). Dados não mostrados nessa tese por não fazer parte do decurso temporal desse estudo mostram ainda

que a OUA 10 nM é capaz de promover a ativação de NF κ B após 48 h da infusão intrahipocampal (dados não publicados). Assim, a ativação do NF κ B parece ter um perfil inconstante e oscilatório ao longo do decurso temporal proposto. Além disso, o ensaio de *super-shift* identificou a composição dos dímeros nucleares como sendo de p65 e p50 (Figura 23).

De acordo com a literatura, em célula de mamíferos, vários sinais como hormônios, citocinas, e o próprio contato célula-célula provocam mudanças na expressão gênica mediada por fatores de transcrição. Muitos fatores de transcrição tardios induzem genes que promovem um ciclo de retroalimentação ou *feedback*, que normalmente são responsáveis por terminar a sinalização iniciada por fatores de transcrição. Esses ciclos determinados pela retroalimentação negativa é que permitem ao fator de transcrição oscilar entre o estado ativo e inativo por horas (261-263).

O NF κ B é um exemplo clássico de fator de transcrição sujeito aos ciclos de retroalimentação negativa. Nas células em repouso, predominam os dímeros p50/p65 que estão em sua maioria complexados à proteína inibitória I κ B, no citoplasma (171). Muitos sinais estimulatórios desta via induzem a degradação da proteína inibitória I κ B através da fosforilação pelo complexo das IKKs. Esse processo permite que o NF κ B ativo transloque para o núcleo e ative a expressão de genes alvo, incluindo alguns genes responsáveis pela resposta de retroalimentação negativa (171), como o *Nfkb1a*, que codifica mais I κ B α .

O NF κ B é expresso em todo o organismo, porém no sistema imune de mamíferos ele desempenha seu papel principal que é regular a expressão de genes envolvidos na resposta imune adaptativa e inata, resposta inflamatória e sobrevivência celular (264). Já no SNC participa de diversos processos de desenvolvimento neural, incluindo regulação da neurogênese (265, 266) e no adulto, parece desempenhar um importante papel em diversos aspectos do processo de aprendizado e memória (181, 187, 267), além de participar do crescimento de neuritos, da formação e do remodelamento de conexões sinápticas (181, 187, 268-271).

Porém, esses efeitos parecem estar relacionados à ativação transitória do NF κ B em neurônios, uma vez que as evidências sugerem que a sua ativação em células da glia está associada à sinalização inflamatória e que, portanto, na vigência de um

estímulo crônico pode resultar em danos neurais (176). De fato, Maqbool et al., mostraram que a ativação sustentada de NFκB, por semanas, em neurônios do DG, do CA1, do córtex e do estriado de camundongos foi capaz de levar a neurodegeneração no DG, com consequente perda de memória espacial verificada por piora no desempenho no teste comportamental do Labirinto Aquático de Morris e ainda a diminuição na expressão de BDNF e Bcl-xL (272), uma vez que o NFκB parece modular genes envolvidos com a apoptose (273).

Curiosamente, nossos resultados sugerem que a translocação nuclear dos dímeros p65 e p50 ocorra predominantemente em neurônios e principalmente nos neurônios granulares do DG (Figuras de 25-38).

Estudos recentes sugerem que sub-regiões do DG e o CA3 podem estar envolvidos com a separação de padrões espaciais, um processo que consiste em transformar representações similares em memórias bastante distintas ou em representações não sobrepostas (274, 275). Estudo realizado pelo grupo de Imielsky sugere que o NFκB participa da regulação da homeostase tecidual no DG adulto, ou seja, participa do equilíbrio entre a morte neuronal e a neurogênese (276). Além disso, a complexidade dendrítica de neurônios piramidais corticais foi reduzida após a inibição de NFκB (Gutierrez e Davies 2011) e uma das possíveis explicações pode estar relacionada aos achados de que o NFκB é capaz de aumentar a transcrição de PKA, levando a maior ativação de CREB em neurônios (184, 276, 277).

5.4 OUA ativa CREB/BDNF

Alguns estudos têm demonstrado evidências de que o BDNF pode ser um alvo importante do NFκB, no processo de neuroproteção desencadeado pela ativação de receptores NMDA (278-280). O BDNF é uma neurotrofina essencial para a formação das bases moleculares da memória e aprendizado (72, 73, 281) regula a sobrevivência, o desenvolvimento e a função dos neurônios (282), sendo importante para a regeneração dos axônios, para a formação das sinapses (283), na plasticidade sináptica (284) e na diferenciação de células precursoras (285).

Em nosso modelo, a OUA 10 nM foi capaz de ativar o CREB e o BDNF, de acordo com dados publicados anteriormente (162, 232). A OUA aumentou a fosforilação do CREB nuclear no resíduo Ser 133 em 1 h e 10 h (Figura 39), nos mesmos períodos observados para a ativação do NFκB, ativando o CREB em 10 h,

por ensaio de EMSA (Figura 40) e foi capaz de aumentar a transcrição de RNAm de *Bdnf* em 1 h (Figura 41) e a expressão das proteínas BDNF em 10 h (Figura 42).

O BDNF, por sua vez, pode ser ativado por CREB e pode ser ativador da transcrição dependente de CREB (286). Em neurônios hipocampais, por exemplo, a ativação do receptor tipo TrkB pelo BDNF regula a expressão gênica dependente de CREB, pois ativa a cascata de sinalização da ERK que parece fosforilar o CREB na Ser133 (286). Como a ativação da ERK1/2 ocorre em 1 h da infusão de OUA, acreditamos que o CREB ativado seja o responsável pela elevação de BDNF. De fato, a ativação do CREB ocorre no mesmo período onde observamos o pico de ativação de BDNF.

O CREB foi clonado em 1988 como um fator de transcrição que se liga ao elemento responsivo ao AMPc (CRE)(70). Estudos subsequentes mostraram que o CREB pertencia a família CREB/ATF juntamente com o ATF-1, o modulador do elemento responsivo ao AMPc (CREM), ATF-2, ATF-3 e ATF-4, que são altamente homólogos a estrutura primária do CREB (287). No cérebro, o CREB é expresso em diferentes regiões e atua regulando uma variedade de funções, como o crescimento celular, a proliferação e a memória, em resposta a uma variedade de eventos celulares. O CREB está situado na cascata de transdução de sinal do Ca^{2+} e do AMPc, sendo que a ativação da transcrição do CREB depende de sua fosforilação na serina 133 (Ser133) (287-291), que ocorre pela proteína kinase A (PKA), pela quinase IV dependente de Cálcio/Calmodulina (CaMKIV) (292) ou por outras quinases. Uma vez que a Ser133 está fosforilada, o CREB pode então interagir com a proteína ligadora de CREB (CBP), que é um co-ativador transcripcional levando a transcrição gênica (290, 292). Alguns dos genes alvo do CREB são o *c-Fos*, a proteína associada à regulação da atividade do citoesqueleto (*Arc*) e o *Bdnf* (292-295).

Em 2009, Luc Desfrere realizou um trabalho em cultura primária embrionária de neurônios corticais (E18) em que mostrou que a transdução de sinal da NKA era capaz de gerar dendritogênese pela ativação transcripcional do CREB, primeiramente via CaMK, quando a cultura era tratada com concentrações de OUA que não alteravam o potencial de repouso da membrana. As oscilações persistentes de Ca^{2+} e a fosforilação sustentada da MAPK também parecem atuar nessa cascata, pois

quando Desfrere realizou o bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo L ou da MEK, os efeitos observados foram suprimidos (145).

Vários trabalhos têm demonstrado, inclusive, a participação de algumas proteínas intracelulares e de alguns fatores de transcrição na regulação do crescimento dendrítico e axônico, dentre elas: PI3K, GSK-3 β , CaMKs, MAPK, CREB e NF κ B (181). Além disso, em 2003, Yu e Malenka, mostraram que a superexpressão de β -CATENINA em cultura primária pós-natal (P0) de neurônios hipocampais favorecia o aumento da arborização dendrítica, enquanto que o bloqueio da expressão dessa proteína diminuía não só a arborização dendrítica como também a morfogênese dendrítica (212).

5.5 A OUA modula a atividade da GSK-3 β e a via canônica da WNT

A proteína GSK-3 β foi identificada na década de 70 e teve a ela atribuída, inicialmente, funções de controle do metabolismo da glicose e síntese de glicogênio (296). Anos mais tarde, Hoeflich et al., publicaram um trabalho que mostrava, de forma elegante, que camundongos nocaute para a isoforma β da proteína GSK-3 não eram viáveis pois enquanto embriões apresentavam um fenótipo de degeneração severa do fígado, caracterizado por um aumento excessivo nos níveis de TNF, quadro bastante parecido com o de animais que tinham o gene para IKK β nocauteado ou ainda o gene para a isoforma p65 do NF κ B. Também observaram que os embriões se tornavam viáveis quando o TNF era inibido, o que os remeteu a ideia de que o GSK-3 β poderia ser um modulador da ativação da via do NF κ B. No entanto, os mecanismos envolvidos não foram explorados (208).

Em 2003, Demarchi et al., sugeriram que o GSK-3 β regularia a estabilidade da p105, precursora da subunidade p50, componente do NF κ B que pode associar-se a outro monômero de p50 ou ao p65, conforme observado em nosso modelo por ensaio de *super shift* (Figura 23). O trabalho publicado por Demarchi et al. propôs que na ausência de estímulo, quando a GSK-3 β está ativa, o p105 era fosforilado por ela o que aumentava sua estabilidade. Na presença de um estímulo ativador da via do NF κ B como o TNF, por exemplo, o IKK seria ativado, fosforilando o p105 previamente estabilizado pelo GSK-3 β . O TNF ativa a via PI3K/AKT, logo, simultaneamente, a ativação da via da AKT irá fosforilar o GSK-3 β tornando-o inativo. Nessa condição, o p105 recém-sintetizado na célula não irá ser fosforilado

pelo GSK-3 β , conseqüentemente não será fosforilado pelo IKK e não será degradado sendo processado em p50 (297).

Ocorre que, segundo o trabalho do grupo de Schneider, quando o aumento da produção de p50 se dá na ausência da atividade de GSK-3 β , predominantemente irá ocorrer a formação de homodímeros de p50 que irão competir com os heterodímeros de p50p65 no sítio de ligação no núcleo, porém a subunidade p50 não tem o domínio de transativação e, portanto, a capacidade de promover a ativação da transcrição de genes modulados pela via do NF κ B (297, 298). Nossos achados são condizentes com essa hipótese, uma vez que verificamos aumento da fosforilação da GSK-3 β em 24 h (Figura 43), implicando em sua inativação, e nesse mesmo período não se observa ativação da via do NF κ B (Figura 22), embora existam dímeros de p65 e p50 no núcleo, como se pode observar pelo ensaio de *super shift* (Figura 23). O que sugere que o GSK-3 β pode estar envolvido no circuito de retroalimentação negativa que confere o perfil oscilatório da sinalização do NF κ B.

Além disso, em razão da GSK-3 β ser uma proteína chave da sinalização da via canônica da WNT (299) e esta ser uma via de grande relevância para o processo de formação de memórias e aprendizado (300), fomos verificar se a OUA 10 nM era capaz de modulá-la. Nossos resultados sugerem diminuição da fosforilação da β -CATENINA em 10 h e 24 h (Figura 44), sendo que em 24 h essa diminuição certamente é consequência da inativação da GSK-3 β , que coincide com o aumento da translocação nuclear da β -CATENINA em neurônios da camada C1 em 24 h (Figura 45-57) e em consequência de sua translocação nuclear, verificamos que a via da WNT está ativa em 24 h devido ao aumento da transcrição do gene *Axina 2*, por ensaio de RT-PCR em tempo real (Figura 58).

No entanto, ensaios de Western Blot para verificar o nível de expressão das proteínas c-MYC e CICLINA D1 mostraram ausência de modulação pela OUA (Figura 59). De acordo com a literatura, quando a β -CATENINA nuclear se liga a região consenso TCF/LEF pode culminar na transcrição de uma variedade de genes alvo, como *Axina 2*, *c-Myc* (301) e *Ciclina D1* (197, 302). A β -CATENINA é uma proteína multifuncional envolvida em dois tipos de sinalização principais, uma delas é nas junções aderentes, no processo de adesão célula-célula onde é capaz de mediar a associação da E-CADERINA com o citoesqueleto e a outra função é como componente crítico da via canônica da WNT (303). No presente trabalho, a

participação da β -CATENINA nas junções aderentes não foi explorado, no entanto verificamos que a OUA parece ativar a via canônica da WNT, pois em 24 h observamos a diminuição da fosforilação da β -CATENINA, aumento da sua translocação nuclear e ativação de um gene específico da via. De forma curiosa, verificamos que a OUA foi capaz de diminuir a fosforilação da β -CATENINA já em 10 h.

Em 1999, Hart et al., sugeriram que algumas quinases como a CK1/GSK-3 β , PKA/GSK-3 β e a PKC α eram capazes de promover a fosforilação dos resíduos de Ser33/37 da porção N-terminal da β -CATENINA, levando-a a degradação via ubiquitina-proteassoma (304). Diante dessa informação, Gwak e colaboradores mostraram em um estudo *in vitro* feito em cultura de células HEK293 que a PKC α era capaz de fosforilar os resíduos Ser33/37/Thr41 da β -CATENINA na presença de Ca²⁺, pois quando as células eram transfectadas com RNA de interferência e os níveis de PKC α eram depletados, mesmo na presença de uma droga ativadora da WNT, a fosforilação e degradação da β -CATENINA eram reduzidas (305). Anos mais tarde, no mesmo modelo celular, Gwak mostrou que de fato existe uma interação entre a PKC α e a porção N-terminal da β -CATENINA, capaz de ser interrompida pela adição de AXINA, atenuando a fosforilação da β -CATENINA de forma dose dependente (306). Além disso, a ligação da OUA a NKA pode ativar diversas vias de sinalização como previamente discutido, podendo levar a oscilação nos níveis de Ca²⁺ (148) e com isso à ativação da PKC (307). No entanto, a via da OUA-PKC não foi explorada.

A AXINA é um componente fundamental da via canônica da WNT, pois garante a supressão da atividade da via na ausência do ligante WNT, uma vez que interage com a APC, a GSK-3 β e a β -CATENINA compondo o complexo de destruição e modulando positivamente a fosforilação da β -CATENINA pela GSK-3 β , assim como sua degradação (308, 309). Em 2002, um papel complementar para a AXINA 2 foi proposto: a de que ela seria transcrita cada vez que a via fosse estimulada pela WNT, gerando um circuito de retroalimentação negativa capaz de silenciar a via após a transdução do sinal (310, 311). De fato, o aumento da sua transcrição em 24 h nos leva a conclusão que a OUA ativa a via canônica da WNT em 24 h e aumenta a estabilidade da β -CATENINA citosólica independentemente da ativação da via da WNT.

5.6 Aumento da complexidade da árvore dendrítica dos neurônios da região CA1 do hipocampo

Diante dos resultados apresentados até o presente momento pudemos concluir que a OUA é capaz de promover alterações no microambiente celular, de longa duração, que parecem favoráveis à sobrevivência celular. Pelo fato das vias de sinalização ativadas em cascata pela OUA terem um importante papel na plasticidade sináptica, realizamos um ensaio de coloração de Golgi Cox para verificar se a OUA 10 nM era capaz de promover qualquer alteração morfológica nos neurônios da região CA1.

Os resultados encontrados sugerem pela primeira vez em estudos *in vivo* que a OUA parece aumentar o índice de ramificação dos neurônios do CA1, após 7 e 14 dias (Figuras 65 a 68), no entanto em 21 dias verificou-se o retorno do índice de ramificação ao nível basal. No entanto, os animais que foram submetidos ao protocolo de natação do teste comportamental do LAM e que receberam OUA sustentaram o aumento de arborização até o vigésimo primeiro dia (Figura 73), o que sugere que as alterações micro ambientais provocadas pela OUA no hipocampo favorecem a plasticidade frente a um estímulo que demande atividade do sistema, como uma tarefa de aprendizado.

Embora na literatura existam dados que mostre que o treino espacial aumenta a LTP, a geração de espinhas dendríticas e a ramificação dendrítica tanto nas células granulares do giro dentado quanto nos neurônios da camada CA1 de camundongos, 24 h após o treino (312), não observamos alteração na ramificação dendrítica em decorrência do treinamento, em concordância com outro trabalho da literatura que também não observou alteração de número e morfologia dendrítica após 14 dias de treino espacial de camundongos no LAM (313). As alterações morfológicas observadas nos animais treinados certamente são em decorrência do tratamento com OUA, corroborando com os achados de Desfrere et al., realizados em cultura primária de neurônios corticais (Desfrere et al., 2009).

O desenvolvimento da árvore dendrítica é um processo complexo que envolve múltiplas etapas divididas didaticamente em: (i) etapa que ocorre o surgimento de neuritos, seu crescimento e direcionamento, (ii) etapa em que ocorre uma leva de arborização, que culmina com a formação das sinapses, e por último (iii) etapa em que ocorre a estabilização da morfologia desse neurônio (314-319). A duração de

cada uma dessas etapas varia conforme a espécie, mas no geral a literatura sugere que a etapa (i) ocorra em aproximadamente 24 h enquanto que a etapa (ii) na qual verifica-se que a árvore dendrítica de um neurônio pode expandir-se até 4 vezes ocorre no intervalo de 48 h. Isso foi observado por imagem ao vivo de neurônios de *Xenopus laevis* (Wu et al., 1999). No entanto, a fase (iii) de estabilização da árvore dendrítica é um processo que ocorre no decurso de um longo período de tempo. Wu et al., realizaram essas observações ao longo de 6 dias e constataram que o sistema nervoso maduro ainda preserva algum grau de plasticidade morfológica (316, 320).

Um achado bastante interessante da literatura sugere que a plasticidade morfológica é de certa forma dependente de atividade e que a arborização dendrítica está bastante relacionada à sinalização dos receptores glutamatérgicos tipo NMDA e AMPA e principalmente a elevação nos níveis intracelulares de Ca^{2+} (321, 322). Além disso, Jaworki et al., e Kumar et al., investigaram vias de sinalização celular envolvidas com a arborização dendrítica dependente de neurotrofinas e com o desenvolvimento de espinhas dendríticas e concluíram que a atividade aumentada da Ras levava ao aumento no número total de dendritos primários assim como na complexidade da árvore dendrítica, em cultura de neurônios hipocampus. Dentre as proteínas alvo da Ras, os grupos optaram por verificar os efeitos da via PI3K e verificaram que sua inibição levava a retração da árvore dendrítica (323, 324).

Outras proteínas quinases também foram descritas por influenciar o complexo processo de arborização, dentre elas podemos citar a CaMK (212, 315, 325-330), a MAPK (331), a PKA (332), a PI3K (323, 324, 331), a GSK-3 β (333) e o receptor TrkB (334, 335).

O BDNF sinalizando via receptor TrkB é capaz de modular a complexidade dendrítica em neurônios do córtex e cerebelo (334, 336-339), assim como em neurônios do DG (340, 341). Em neurônios da região CA1 do hipocampo, o grupo de Pozzo-Miller tem demonstrado que a exposição das células ao BDNF por 24 h foi capaz de aumentar a densidade de espinhas dendríticas na região apical dos neurônios piramidais de CA1, mas não a complexidade da árvore dendrítica (342, 343).

Em 2004, o mesmo grupo de Pozzo-Miller tentou demonstrar um dos possíveis mecanismos envolvidos nessa modulação sugerindo que a ativação da via

da ERK1/2 seria a responsável pela ativação de CREB e pelo aumento da expressão de BDNF que promoveria o aumento das espinhas dendríticas nessas células (344). Outros grupos reportaram a hipótese de que a ERK poderia mediar mudanças estruturais desencadeadas pelo BDNF via receptores TrkB, anteriormente (345), assim como os efeitos do BDNF na plasticidade sináptica e na formação de memórias (294, 346-349).

A ação do BDNF na regulação da formação de espinhas dendríticas parece ocorrer em cooperação com a via da WNT (300). Wu e Malenka, por sua vez, mostraram que a superexpressão de β -CATENINA em cultura primária de neurônios hipocampais aumentava a arborização dendrítica desses neurônios, enquanto que o sequestro da β -CATENINA tinha o efeito oposto. No entanto, o mais interessante desse trabalho é que ele mostra que as ações da β -CATENINA são independentes de sua translocação nuclear e da ativação de genes alvo, pois está relacionada diretamente com o aumento de sua estabilidade citoplasmática e da sua interação com a E-CADERINA, modulando a estabilidade da β -ACTINA no citoesqueleto dos novos dendritos (212), e essa função pode explicar o aumento que observamos da estabilidade da β -CATENINA no citoplasma em 10 h sem que ocorresse a translocação nuclear e a ativação de genes.

De fato, as alterações moleculares descritas pela OUA 10 nM são capazes de promover as alterações morfológicas observadas. Em relação ao papel do NF κ B no processo de arborização dendrítica, este é ainda controverso, pois embora seu papel na formação de memórias seja bem estabelecido (182), seu envolvimento no processo de arborização parece ocorrer predominantemente durante a fase de desenvolvimento (181, 350).

5.7 OUA melhora memória de referência espacial e piora a extinção de memórias

Na versão da memória de referência do Labirinto Aquático de Morris, a plataforma de escape é mantida em uma posição fixa ao longo de todos os dias de treino e a informação adquirida em 1 dia serve para auxiliar na resolução da tarefa nos dias subsequentes. Ao contrário, na versão de memória operacional do LAM aplicada nesse estudo, a plataforma era trocada de posição todos os dias, sendo mantida na mesma posição durante as três tentativas do mesmo dia. Dessa forma, a

informação adquirida em um dia não ajuda a solucionar as tarefas nos dias subsequentes, que irão requerer uma atualização da informação espacial importante para a tarefa do dia. Além disso, enquanto a tarefa da memória de referência exige a memória de longa duração, a tarefa da memória operacional demanda um tipo de memória de curta duração, mensurando tipos de memórias diferentes (351). A tarefa de memória operacional é mais desafiadora quando comparada a tarefa de memória de referência, pois o animal tem que abandonar a estratégia bem sucedida adotada no dia anterior para conseguir concluir a tarefa do dia presente. Isso requer uma flexibilidade comportamental que parece ser dependente das funções do DG (351-353).

Em nossos resultados pudemos observar que os animais tratados com OUA lembram-se melhor da posição da plataforma após 24 h do término dos treinos, mas não extinguiram a memória após 48 h, comparado ao grupo de animais que recebeu salina (Figura 71). Ambos os grupos não apresentam diferenças quanto a motivação para desempenhar a tarefa uma vez que a velocidade de locomoção em ambos os grupos não varia e também não apresentam prejuízo na capacidade locomotora, uma vez que ambos os grupos apresentam comprimentos de trajeto bastante semelhantes.

Estudos previamente publicados com animais tratados com OUA e que foram submetidos a testes de aprendizado espacial sugerem que a OUA é prejudicial ao aprendizado. No trabalho publicado por Zhan et al., 2004 (354), este realizou infusão intra-cérebro-ventricular por 7 dias, continuamente, em ratos, totalizando 200 μL de OUA infundida nas doses de 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M. No entanto, essas doses são maiores que a IC₅₀ e capazes de inibir todas as isoformas da bomba promovendo um desbalanço osmótico e iônico (354). Em trabalho mais recente, Amodeo et al., utilizando a OUA para mimetizar um modelo de mania, administraram 1 μM de OUA num total de 5 μL por via intra-cérebro-ventricular em ratos adultos e puderam observar diminuição da expressão de BDNF no córtex frontal dos ratos, assim como piora de desempenho nas tarefas de aprendizado (355).

Animais com lesão de hipocampo ou lesão septo-hipocampal que seguramente induzem hiperatividade, certamente irão apresentar déficits no LAM (356). Nossos resultados então nos asseguram de que a OUA 10 nM não foi capaz

de causar lesão hipocampal, nem provocar hiperatividade e sugere ainda pela primeira vez na literatura que baixas doses de OUA são capazes de melhorar a memória de referência dependente da formação hipocampal e a memória operacional, num primeiro momento. Além disso, o paradigma do LAM se relaciona a memória de longa duração e ao funcionamento dos receptores NMDA, o que o transforma numa técnica eficiente para estudar o circuito hipocampal, e suas relações com o córtex entorrinal, perirrinal, pré-frontal, córtex cingulado, neocórtex e de forma limitada, a função cerebelar (356-358).

No teste de memória operacional, realizado 24 h depois do último teste de memória de referência, os animais que receberam OUA 10 nM parecem lembrar-se melhor da nova posição da plataforma na segunda tentativa do primeiro dia, visto que apresentaram uma latência menor para localizar a plataforma e realizaram um trajeto mais curto (Figura 72). No entanto, no segundo dia de teste de memória operacional os animais tratados com OUA parecem ter um desempenho pior em relação ao controle. No terceiro dia, ficou mais evidente que os animais que receberam OUA têm maior dificuldade de extinção de memória, pois demoram mais para localizar a plataforma na nova posição, e passam mais tempo buscando pela plataforma na posição do dia anterior. Isso nos remete a duas conclusões: A OUA melhora a memória espacial e piora a extinção da memória, na qual o animal precisa abrir mão da memória do dia anterior para engajar-se na tarefa de aprender a nova posição da plataforma e não o faz. A mesma conclusão pode ser feita com o segundo dia de teste de Probe, no qual os animais tratados deveriam esquecer a posição da plataforma, assim como os animais controle, uma vez que foram submetidos no dia anterior (PT1) a um novo aprendizado referente a ausência da plataforma.

As regiões cerebrais que estão envolvidas com a extinção de memórias são a região dorsal e ventral do hipocampo, o córtex parietal, retroesplênico, os corpos mamilares e a amígdala. No entanto, os mais especificamente relacionados com a extinção de memórias espaciais são a região dorsal do CA1, CA3 e o giro dentado ventral (359, 360).

Para tentarmos entender o possível mecanismo envolvido no déficit de extinção sugerido, verificamos na literatura a possível participação da β -CATENINA. Ocorre que as CADERINAS são moléculas de adesão que tem papel central na

regulação da mudança das forças sinápticas e de sua estabilidade durante a LTP e a LTD (361) e o maior regulador da estabilidade das caderinas é a β -CATENINA (362).

Estudos *in vitro* sugerem que a interação β -CATENINA/N-CADERINA seja dinamicamente regulada em resposta a atividade sináptica, permitindo que a β -CATENINA modifique a estabilidade das CADERINAS durante diferentes formas de plasticidade sináptica. O aumento da atividade neuronal parece estar associado ao aumento da interação entre a β -CATENINA e a N-CADERINA nas espinhas dendríticas, estabilizando as CADERINAS nas sinapses (363, 364). Em contraposição, manipulações farmacológicas que induzem a LTD rompem as interações β -CATENINA/N-CADERINA (365), assim como modelos com deleção de β -CATENINA apresentam bloqueio na consolidação da memória indicando que a β -CATENINA é importante na formação de memórias de longa duração (366).

Com o objetivo de entender melhor o papel da β -CATENINA na LTD, o grupo de Bamji realizou um estudo em 2014 no qual através de um sistema Cre/loxP eles geraram um modelo de camundongos que expressava uma forma estável da β -CATENINA, especificamente em neurônios hipocámpais e demonstraram que esse aumento de β -CATENINA era suficiente para causar um prejuízo significativo na flexibilidade cognitiva, abolindo o LTD sem no entanto interferir no LTP. Eles verificaram que o aumento da estabilidade da β -CATENINA resultava em aumento das interações com a N-CADERINA, nas sinapses, prejudicando a endocitose das CADERINAS e dos receptores AMPA de forma atividade-dependente. Testes comportamentais que envolviam apenas a LTP hipocámpal ou outras regiões do cérebro que não o hipocampo, como condicionamento contextual de medo, reconhecimento do objeto novo e o treino de aquisição da memória espacial realizado no início do protocolo do Labirinto Aquático de Morris, foram realizados com esses animais que não revelaram nenhuma perda cognitiva em decorrência desse aumento da estabilidade da β -CATENINA, o que só foi visto quando a LTD era necessária para a aquisição de novas informações (50).

Porém segundo a literatura, também são importantes para a ocorrência normal tanto da LTP quanto da LTD, o BDNF (72, 367-372) e o NF κ B (373). Assim, podemos concluir que a OUA ao ativar as vias descritas favorece a formação de memórias de longa duração de forma que a extinção delas fica prejudicada. No

entanto, desconhecemos diante dos dados obtidos até aqui qual das vias é a responsável por tal efeito.

5.8 O papel anti-apoptótico da OUA

O modelo de excitotoxicidade induzido pelo tratamento com NMDA foi escolhido baseado no modelo estabelecido e padronizado pelo grupo de Prehn e colaboradores (83). Esse estudo mostrou de forma elegante, que quando culturas primárias de neurônios corticais de camundongo eram expostas a diferentes doses de NMDA (30, 100 e 300 μM) por 5 min, era possível verificar três diferentes perfis de oscilação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Quando as células receberam 30 μM de NMDA, os neurônios foram capazes de reestabelecer os níveis citosólicos basais de Ca^{2+} após a remoção do tratamento de NMDA e simultaneamente uma hiperpolarização extensiva do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) foi observado, seguido de repolarização. Esse grupo de neurônios foi classificado como tolerantes. No entanto, quando neurônios foram expostos a 100 μM de NMDA eles apresentaram recuperação dos níveis basais de Ca^{2+} citosólico após a remoção do tratamento, mas apresentaram um novo pico de oscilação nos níveis de Ca^{2+} tardio ao tratamento, ou seja, 6 h depois da remoção do NMDA, e esse pico tardio foi chamado de desregulação tardia de Ca^{2+} , ou *delayed calcium deregulation* (DCD). O interessante que a DCD sempre ocorria subsequente a despolarização tardia do $\Delta\psi\text{m}$ da membrana mitocondrial, em torno de 30 min após. Esse grupo apresentava morte neuronal predominantemente por apoptose e foi chamado de apoptótico/DCD. Finalmente, o grupo que recebeu 300 μM de NMDA não foi capaz de recuperar os níveis basais de Ca^{2+} e apresentou uma desregulação sustentada e imediata do $\Delta\psi\text{m}$, apresentando extensa morte neuronal por necrose (D'Orsi et al., 2012).

Os resultados sugerem que a OUA 10 nM é capaz de evitar que neurônios hipocâmpais entrem em apoptose após 5 min de tratamento com NMDA 100 μM , pois quando tratados com NMDA a taxa de morte por apoptose era de aproximadamente 20%, enquanto que quando tratados com NMDA e OUA essa taxa diminuía para 9%, sendo comparada a média dos controles (Figura 61-62). Esses resultados estão de acordo com dados prévios da literatura que sugerem efeitos anti-apoptóticos da OUA. Golden e Martin mostraram que a co-injeção de OUA (0,01 nM) e ácido caínico (KA)(8 nM) no estriado de ratos neonatos era capaz de reduzir

a taxa de neurônios apoptóticos em torno de 73-90% após 24 h do tratamento. Também verificaram o aumento na expressão nuclear de Bcl-2 e uma diminuição da fração mitocondrial de Bcl-2 após 6 h (374).

Em oposição a hipótese de alguns trabalhos da literatura que sugerem que a OUA nas concentrações de nM- μ M seria responsável por causar ou potencializar a excitotoxicidade em neurônios (375-378) nossos resultados apontam para os efeitos protetores, pois a exposição crônica (8 h) dos neurônios a OUA 10 nM levou a uma taxa de morte por apoptose de 10,7% ($\pm$ 2,86%) comparável ao controle que apresentou 6% ($\pm$ 3.2%). Além disso, estudo prévio realizado pelo grupo de Aperia e colaboradores mostrou em um modelo bem estabelecido de soro privação em células renais de embrião de rato, que mimetiza as condições que levam a má formação do néfron fetal pelo aumento da taxa de apoptose, que quando essas células eram tratadas com OUA 10 nM a taxa de apoptose diminuía. Para confirmar os dados obtidos *in vitro*, o grupo realizou estudo *in vivo*, onde ratas prenhas foram submetidas a uma dieta de baixa ingesta de proteínas, e tratadas ou não com OUA. Os resultados encontrados *in vivo* mimetizaram os encontrados *in vitro*, sugerindo ainda proteção contra a má formação (144). Outro trabalho do grupo publicado anos depois mostrou que células de túbulo proximal de rim de ratos expostas a toxina Shiga 2 (Stx2) apresentavam elevada taxa de apoptose com aumento da expressão de Bax e diminuição da expressão de Bcl-xL, no entanto, quando incubadas juntamente com OUA 5 nM esses efeitos foram abolidos (241).

O mesmo efeito foi observado na modulação da expressão de Bcl-xL nos neurônios expostos ao NMDA, nossos resultados sugerem uma diminuição da expressão de Bcl-xL em torno de 44,31% quando comparado ao controle (100%), no entanto quando tratados conjuntamente com NMDA+OUA os níveis de Bcl-xL subiram para 68% da expressão do controle (Figura 63). Além disso, um estudo baseado nos efeitos da administração intrahipocampal de OUA 10 nM + NMDA 1 μ M em ratos adultos mostrou aumento da expressão dos níveis de RNAm de Bcl-2 em 1 hora, quando comparado aos níveis do grupo tratado apenas com NMDA (162).

Assim, quando verificamos a expressão dos genes *Bax* e *Bcl-2* em nosso modelo pudemos observar que a OUA 10 nM foi capaz de aumentar a expressão de RNAm de *Bcl-2* em 1 h e diminuir a expressão de RNAm de *Bax* em 10 h, sem alterar a proporção entre eles (Figura 60). Os mecanismos pelos quais as proteínas

da família BCL-2 parecem atuar na via intrínseca da apoptose são bastante complexos e não necessariamente precisam do aumento da transcrição gênica, mas certamente dependem da translocação das proteínas do citoplasma para a membrana da mitocôndria (85, 241). Além disso, a descoberta de novas funções dessas proteínas no SNC sugere que a proteção contra a morte celular é uma função integrada a outras não menos importantes, como o controle bioenergético das mitocôndrias, a liberação de neurotransmissores, a reciclagem de vesículas sinápticas e o crescimento de neuritos (96).

6 CONCLUSÃO

Assim chegamos à conclusão de que a OUA modifica o ambiente celular, levando à ativação de vias que o tornam mais favorável a aquisição de novas memórias como o engajamento em uma tarefa de aprendizado espacial e mais resistente frente a desafios, como um estímulo excitotóxico provocado por NMDA.

Figura 74 - Resumo dos resultados. A figura sobrepõe a idéia de um relógio a estrutura básica de uma célula para facilitar a visualização das alterações moleculares e morfológicas ao longo do tempo. A figura foi dividida em quatro quadrantes, sendo que os três primeiros quadrantes sintetizam todas as alterações moleculares observadas nas células em decorrência do tratamento com OUA 10 nM, ao longo do decurso temporal de 24 h. O quarto quadrante representa os fenômenos morfológicos e comportamentais observados em decorrência das alterações do microambiente celular. Em cinza estão representadas as proteínas que não foram mensuradas, assim como a seta tracejada aponta uma hipótese. A gravura dos animais na piscina foi adaptado da capa da revista Learn Mem. Edição de Julho, 2011;18(7).

REFERÊNCIAS*

1. de Nó RL. Studies on the structure of the cerebral cortex II: continuation of the study of the ammonic system. 1934;46:113–77
2. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*. 2014;34:6-17.
3. Moser EI. The multi-laned hippocampus. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):407-8.
4. Helene AF, Xavier GF. Building attention from memory. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003;25 Suppl 2:12-20.
5. Kandel E, Schwartz J, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. *Princípios de Neurociência*. 5 ed. Porto Alegre: AMGH Editora; 2014. 1596 p.
6. Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(8):a021766.
7. Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*. 2002;12(5):609-36.
8. Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*. 1999;103(1):1-11.
9. Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res*. 2008;169:323-38.
10. Aben B, Stapert S, Blokland A. About the Distinction between Working Memory and Short-Term Memory. *Front Psychol*. 2012;3:301.
11. Baddeley A. Working memory. *Science*. 1992;255(5044):556-9.
12. Kolb B, Wishaw IQ. *Fundamentals of Human Neuropsychology*. 6 ed. New York: Worth Publisher; 2007. 857 p.
13. Baddeley A. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci*. 2000;4(11):417-23.
14. Baddeley A, Hitch GJ. *The psychology of learning and motivation: Working memory*. G.H. Bower edition. New York: New York Academic Press; 1974. 305 p.
15. Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol*. 1998;9(5-6):421-7.
16. Nadel L, Hardt O. Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(1):251-73.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

17. Lent R. Neurociência da mente e do comportamento. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 356 p.
18. O'Keefe J. Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? *Hippocampus*. 1999;9(4):352-64.
19. Danielson NB, Zaremba JD, Kaifosh P, Bowler J, Ladow M, Losonczy A. Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1. *Neuron*. 2016;91(3):652-65.
20. O'Keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. 1 ed. Oxford: Oxford University Press; 1978. 570 p.
21. Igarashi KM, Ito HT, Moser EI, Moser MB. Functional diversity along the transverse axis of hippocampal area CA1. *FEBS Lett*. 2014;588(15):2470-6.
22. Basu J, Zaremba JD, Cheung SK, Hitti FL, Zemelman BV, Losonczy A, et al. Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. *Science*. 2016;351(6269):aaa5694.
23. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):65-75.
24. Hartley T, Lever C, Burgess N, O'Keefe J. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1635):20120510.
25. Bray N. Learning and memory: Coordinating intervals. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(3):136-7.
26. Witter MP, Amaral DG. Hippocampal formation in: *The Rat Nervous System*. 3 ed. Amsterdam: Elsevier; 2004. 635-74.
27. Igarashi KM, Lu L, Colgin LL, Moser MB, Moser EI. Coordination of entorhinal-hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature*. 2014;510(7503):143-7.
28. Deshmukh SS, Knierim JJ. Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Front Behav Neurosci*. 2011;5:69.
29. Tsao A, Moser MB, Moser EI. Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Curr Biol*. 2013;23(5):399-405.
30. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436(7052):801-6.
31. Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, McNaughton BL, Witter MP, Moser MB, et al. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science*. 2006;312(5774):758-62.
32. Taube JS, Muller RU, Ranck JB, Jr. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J Neurosci*. 1990;10(2):420-35.

33. Taube JS, Muller RU, Ranck JB, Jr. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J Neurosci.* 1990;10(2):436-47.
34. Finkelstein A, Las L, Ulanovsky N. 3-D Maps and Compasses in the Brain. *Annu Rev Neurosci.* 2016;39:171-96.
35. Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser MB, Moser EI. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science.* 2008;322(5909):1865-8.
36. Lever C, Burton S, Jeewajee A, O'Keefe J, Burgess N. Boundary vector cells in the subiculum of the hippocampal formation. *J Neurosci.* 2009;29(31):9771-7.
37. Komorowski RW, Manns JR, Eichenbaum H. Robust conjunctive item-place coding by hippocampal neurons parallels learning what happens where. *J Neurosci.* 2009;29(31):9918-29.
38. Muzzio IA, Levita L, Kulkarni J, Monaco J, Kentros C, Stead M, et al. Attention enhances the retrieval and stability of visuospatial and olfactory representations in the dorsal hippocampus. *PLoS Biol.* 2009;7(6):e1000140.
39. Manns JR, Eichenbaum H. A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learn Mem.* 2009;16(10):616-24.
40. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(10):655-69.
41. Malik R, Dougherty KA, Parikh K, Byrne C, Johnston D. Mapping the electrophysiological and morphological properties of CA1 pyramidal neurons along the longitudinal hippocampal axis. *Hippocampus.* 2016;26(3):341-61.
42. Gray J, A. M, N. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.* Oxford: Oxford University Press; 1982.424 p.
43. van Groen T, Wyss JM. Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol.* 1990;302(3):515-28.
44. Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 1992;324(2):180-94.
45. Stark E, Roux L, Eichler R, Senzai Y, Royer S, Buzsaki G. Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations. *Neuron.* 2014;83(2):467-80.
46. Valero M, Cid E, Averkin RG, Aguilar J, Sanchez-Aguilera A, Viney TJ, et al. Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nat Neurosci.* 2015;18(9):1281-90.
47. Kentros CG, Agnihotri NT, Streater S, Hawkins RD, Kandel ER. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron.* 2004;42(2):283-95.

48. Nicholls RE, Alarcon JM, Malleret G, Carroll RC, Grody M, Vronskaya S, et al. Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron*. 2008;58(1):104-17.
49. Dong Z, Bai Y, Wu X, Li H, Gong B, Howland JG, et al. Hippocampal long-term depression mediates spatial reversal learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology*. 2013;64:65-73.
50. Mills F, Bartlett TE, Dissing-Olesen L, Wisniewska MB, Kuznicki J, Macvicar BA, et al. Cognitive flexibility and long-term depression (LTD) are impaired following beta-catenin stabilization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8631-6.
51. Kemp A, Manahan-Vaughan D. Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8192-7.
52. Manahan-Vaughan D, Braunewell KH. Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8739-44.
53. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331-56.
54. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. *Synapses and Memory Storage*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 42012.
55. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci*. 2006;24(3):645-53.
56. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. *Principles of Neural Science*. 4th. ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
57. Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell*. 1994;76(6):1099-114.
58. Brunelli M, Castellucci V, Kandel ER. Synaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science*. 1976;194(4270):1178-81.
59. Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*. 2012;5:14.
60. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 1997;17:2295–313.
61. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 1998;20:709–26.
62. Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(5):R1053-69.
63. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(1):7-23.

64. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:289–317.
65. Chao M. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Rev Neurosci.* 2003;4:299–309.
66. Reichardt L. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans R Soc B.* 2006;361:1545–64.
67. Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron.* 1990;5:297–306.
68. Knusel B, Hefti F. F K-252b is a selective and nontoxic inhibitor of nerve growth factor action on cultured brain neurons. *J Neurochem.* 1991;57:955–62.
69. Grothe C, Unsicker K. Neuron-enriched cultures of adult rat dorsal root ganglia: establishment, characterization, survival, and neuropeptide expression in response to trophic factors. *J Neurosci Res.* 1987;18(539-550).
70. Hofer MM, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature.* 1988;331:261–2.
71. Kalcheim C, Gendreau M. Brain-derived neurotrophic factor stimulates survival and neuronal differentiation in cultured avian neural crest. *Brain Res.* 1988;469:79–86.
72. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(19):8856–60.
73. Korte M, Staiger V, Griesbeck O, Thoenen H, Bonhoeffer T. The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris.* 1996;90(3-4):157–64.
74. Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* 1996;16:1137–45.
75. Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, et al. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5723–8.
76. Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 2007;6(3):337–50.
77. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(10):682–96.
78. Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.* 2010;15(11):1382–402.
79. D'Orsi B, Kilbride SM, Chen G, Perez Alvarez S, Bonner HP, Pfeiffer S, et al. Bax regulates neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J Neurosci.* 2015;35(4):1706–22.

80. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:31-108.
81. Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 1995;34(1):1-26.
82. Cristofanilli M, Akopian A. Calcium channel and glutamate receptor activities regulate actin organization in salamander retinal neurons. *J Physiol.* 2006;575(Pt 2):543-54.
83. D'Orsi B, Bonner H, Tuffy LP, Düssmann H, Woods I, Courtney MJ, et al. Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *J Neurosci.* 2012;32(5):1847-58.
84. Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6a):2263-80.
85. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231-41.
86. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12).
87. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-89.
88. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11549-56.
89. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647-56.
90. Galonek HL, Hardwick JM. Upgrading the BCL-2 network. 8 ed. London: Nat Cell Biol; 2006. p. 1317-9.
91. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
92. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):3668-72.
93. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol.* 1998;143(1):207-15.
94. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb j.* 2002;16(6):607-9.
95. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(7):481-94.
96. Jonas EA, Porter GA, Alavian KN. Bcl-xL in neuroprotection and plasticity. *Front Physiol.* 2014;5:355.

97. Skou J. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*. 1957;23:394–401.
98. Fuller W, Tulloch LB, Shattock MJ, Calaghan SC, Howie J, Wypijewski KJ. Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(8):1357-80.
99. Post RL, Jolly PC. The linkage of sodium, potassium, and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1957;25(1):118-28.
100. Schatzmann H. Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. *Physiol Pharmacol Acta*. 1953;11(4):346-54.
101. Schatzmann HJ, Witt PN. Action of k-strophanthin on potassium leakage from frog sartorius muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1954;112(4):501-8.
102. Kuhlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(4):282-95.
103. Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*. 1998;46(1):84-101.
104. Kaplan JH. Biochemistry of NA, K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:511-35.
105. Gloor SM. Relevance of Na, K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett*. 1997;412:1.
106. Blanco G, Mercer R. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1998;275:F633-F50.
107. Glynn IM. All hands to the sodium pump. *J Physiol(Lond)*. 1993;462:1.
108. Blanco G, Koster JC, Sánchez G, Mercer RW. Kinetic properties of the alpha 2 beta 1 and alpha 2 beta 2 isozymes of the Na,K-ATPase. *Biochemistry*. 1995;34(1):319-25.
109. Post RL, Hegyvary C, Kume S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*. 1972;247(20):6530-40.
110. Toyoshima C, Kanai R, Cornelius F. First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure*. 2011;19(12):1732-8.
111. Kanai R, Ogawa H, Vilsen B, Cornelius F, Toyoshima C. Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺,K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature*. 2013;502(7470):201-6.
112. Sweadner KJ. Two molecular forms of (Na+K⁺)- stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J Biol Chem*. 1979;254:6060–7.
113. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na, K-ATPase. *J Biol Chem*. 1994;269:19659.
114. Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gros P, Levenson R. Identification of the Mammalian Na,K-ATPase b3 Subunit. *The Journal of Biol Chem*. 1996;271(37):22754-8.

115. Mercer RW. Structure of the Na, K-ATPase. *Int Rev Cytol.* 1993;137:139.
116. Pressley TA. Structure and Function of the Na, K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metabol.* 1996;22:264.
117. Hasler U, Wang X, Crambert G, Béguin P, Jaisser F, Horisberger JD, et al. Role of beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30826-35.
118. Shamraj OI, Lingrel JB. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(26):12952-6.
119. Geering K. Functional roles of Na, K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(5):526-32.
120. Sweadner KJ, Rael E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics.* 2000;68:41-56.
121. Crambert G, Geering K. FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na⁺,K⁺-ATPase. *Sci STKE.* 2003;166:RE1.
122. Chow DC, Forte JG. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J Exp Biol.* 1995;198:1-17.
123. Lingrel J. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:395-412.
124. Bottger P, Doganli C, Lykke-Hartmann K. Migraine- and dystonia-related disease-mutations of Na⁺/K⁺-ATPases: relevance of behavioral studies in mice to disease symptoms and neurological manifestations in humans. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012;36(2):855-71.
125. Karpova LV, Bulygina E, Boldyrev AA. Different neuronal Na⁺/K⁺-ATPase isoforms are involved in diverse signaling pathways. *Cell Biochem Funct.* 2010;28:135-41.
126. Xie Z, Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* 2002;269:2434-9.
127. Reinhard L, Tidow H, Clausen MJ, Nissen P. Na⁺,K⁺-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(2):205-22.
128. de Lores Arnaiz GR, Ordieres MG. Brain Na⁺, K⁺-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci.* 2014;10(2):85-102.
129. Aizman O, Uhlen P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(23):13420-4.
130. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem.* 2002;269:2440-8.
131. Nesher M, Shpolansky U., Rosen H., Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci.* 2007;80(23):2093-107.

132. Larre I, Cereijido M. Na,K-ATPase is the putative membrane receptor of hormone ouabain. *Commun Integr Biol*. 2010;3:625-8.
133. Cereijido M, Contreras RG, Shoshani L, Larre I. The Na⁺-K⁺-ATPase as self-adhesion molecule and hormone receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(3):C473-81.
134. Tymiak AA, Norman JA, Bolgar M, Di Donato GC, Lee H, Parker WL, et al. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *PNAS*. 1993;90:8189–93.
135. Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, et al. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem*. 1998;273:784-92.
136. Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert GTJ, et al. On the structure of endogenous ouabain. *PNAS*. 1999;96:6654–9.
137. Komiyama Y, Nishimura N, Munakata M, Mori T, Okuda K, Nishino N, et al. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells. *J Hypertens*. 2001;19:229-36.
138. Lichtstein D, Rosen H, Dvela M. Cardenolides and bufadienolides as hormones: what is missing? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; 302: F957-8.
139. Dvela M, Rosen H, Cohen-Ben AH, Lichtstein D. Endogenous ouabain regulates cell viability. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(2):C442-52.
140. Blaustein MP. Endogenous Ouabain: Physiological Activity and Pathophysiological Implications. *Clin Investig*. 1994;72:706-7.
141. Hamlyn JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, et al. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin Exp Hypertens*. 1998;20(5-6):523-33.
142. Bagrov AY, Shapiro JL. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(7):378-92.
143. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(2):C509-36.
144. Li J, Khodus GR, Kruusm M, Kamali-Zare P, Liu XL, Ekl AC, et al. Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. *Nat Commun*. 2010;1(42):1-7.
145. Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjö S, Nanou E, Estrada M, et al. Na, K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *PNAS*. 2009;7(106):2212-7.
146. Graves SW, Valdes R, B.A. B, Knight AB, Craig HR. Endogenous digoxin-immunoreactive substance in human pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;58:748-51.
147. Hilton PJ, White RW, Lord GA, Garner GV, Gordon DB, Hilton MJ, et al. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *Lancet*. 1996;348(9023):303-5.

148. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.* 2007;261(1):44-52.
149. Fontana JM, Burlaka I, Khodus G, Brismar H, Aperia A. Calcium oscillations triggered by cardiotonic steroids. *Febs j.* 2013;280(21):5450-5.
150. Aizman O, Aperia A. Na,K-ATPase as a signal transducer. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;986:489-96.
151. Zhang S, Malmersjö, S., Li, J., Ando, H., Aizman, O., Uhlén, P., Mikoshiba, K., Aperia, A. Distinct Role of the N-Terminal Tail of the Na, K-ATPase Catalytic Subunit as a Signal Transducer. *J Biol Chem.* 2006;281:21954-62.
152. Berridge M. The AM and FM of calcium signalling. *Nature.* 1997;386(6627):759-60.
153. De Koninck P, Schulman H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science.* 1998;279(5348):227-30.
154. Meldolesi J. Calcium signalling. Oscillation, activation, expression. *Nature.* 1998;392(6679):863-6.
155. Liu L, Zhao X, Pierre SV, Askari A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293(5):C1489-97.
156. Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1998;273:15249-56.
157. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 2002;277:18694–702.
158. Pierre S, Xie Z. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell Biochem Biophys.* 2006;46(3):303-16.
159. Gable ME, Abdallah SL, Najjar SM, Liu L, Askari A. Digitalis-induced cell signaling by the sodium pump: on the relation of Src to Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(4):1151-4.
160. Wu J, Akkuratov EE, Bai Y, Gaskill CM, Askari A, Liu L. Cell signaling associated with Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. *Biochemistry.* 2013;52(50):9059-67.
161. Bersier MG, Arnaiz GRL. Intracerebroventricular Administration of Ouabain to Rats Changes the Expression of NMDA Receptor Subunits in Cerebral Cortex and Hippocampus. *Neurochem Res.* 2009;34:1650–7.
162. Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amaral FG, 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.* 2012;90:213–28.

163. Kinoshita S, Yasuda H, Taniguchi N, Katoh-Semba R, Hatanaka H, Tsumoto T. Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J Neurosci*. 1999;19(6):2122-30.
164. Kinoshita PF, Leite JA, Orellana AM, Vasconcelos AR, Quintas LE, Kawamoto EM, et al. The Influence of Na(+), K(+)-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. *Front Physiol*. 2016;7:195.
165. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986;47(6):921-8.
166. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kB: Ten years after. *Cell*. 1996;87:13-20.
167. Siebenlist U. NF-kB/IkB proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1332:7-13.
168. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kB and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
169. Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene*. 1999;18:6888-95.
170. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-66.
171. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195-224.
172. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(6):280-8.
173. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ*. 2006;13:861-72.
174. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:49-62.
175. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech Dev*. 1993;43:135-47.
176. Camandola S, Mattson MP. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11(2):123-32.
177. O'Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in Neuroscience*. 1997;20:252-8.
178. Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001;107(3):247-54.
179. Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):852-60.

180. Tang RH, Zheng XL, Callis TE, Stansfield WE, He J, Baldwin AS, et al. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3362-7.
181. Gutierrez H, Davies AM. Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappaB. *Trends Neurosci*. 2011;34(6):316-25.
182. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:69.
183. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci*. 2003;6(10):1072-8.
184. Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, et al. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol*. 2006;26(8):2936-46.
185. Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci*. 2010;33(5):230-40.
186. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.
187. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(3):a001271.
188. Inestrosa NC, Arenas E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(2):77-86.
189. Varela-Nallar L, Inestrosa N. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7(100).
190. Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
191. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996;382(6588):225-30.
192. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000;407(6803):535-8.
193. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, et al. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*. 2001;407(6803):527-30.
194. Huang H, He X. Wnt/ b-catenin signaling: neu (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(119-125).
195. Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford RT, Mieszczynek J, Bienz M. Dishvelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating b-catenin. *PNAS*. 2011;108:1937-42.

196. Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, et al. Wnt induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishvelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science*. 2007;316:1619-22.
197. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398(6726):422-6.
198. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281(5382):1509-12.
199. Freese JL, Pino D, Pleasure SJ. Wnt signaling in development and disease. *Neurobiol Dis*. 2010;38(2):148-53.
200. Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
201. Angers S, Moon RT. Proximal Events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;7:468-77.
202. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127:469-80.
203. Hu LW, Kawamoto EM, Brietzke E, Scavone C, Lafer B. The role of Wnt signaling and its interaction with diverse mechanisms of cellular apoptosis in the pathophysiology of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;15(35):11-7.
204. Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:997-1014.
205. Terstappen G, Gaviraghi G, Caricasole A. The Wnt signaling pathway as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *IDrugs*. 2006;9:35-8.
206. Verkaar F, van der Stelt M, Blankesteyn WM, van der Doelen AA, Zaman GJR. Discovery of Novel Small Molecule Activators of b-Catenin Signaling. *PLoS One*. 2011;6(4):1-7.
207. Bournat JC, Brown AM, Soler AP. Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappaB in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 2000;61(1):21-32.
208. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000;406(6791):86-90.
209. Holmes T, O'Brien TA, Knight R, Lindeman R, Symonds G, Dolnikov A. The role of glycogen synthase kinase-3beta in normal haematopoiesis, angiogenesis and leukaemia. *Curr Med Chem*. 2008;15(15):1493-9.
210. Vlantis K, Wullaert A, Sasaki Y, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K, Roskams T, et al. Constitutive IKK2 activation in intestinal epithelial cells induces intestinal tumors in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2781-93.
211. Sopjani M, Alesutan I, Wilmes J, Sopjani MD, Lam RS, Koutsouki E, et al. Stimulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity and Na⁺ coupled glucose transport by b-catenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;402:467-70.

212. Yu X, Malenka RC. Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci.* 2003;6(11):1169-77.
213. Fortress AM, Schram SL, Tuscher JJ, Frick KM. Canonical Wnt signaling is necessary for object recognition memory consolidation. *J Neurosci.* 2013;33(31):12619-26.
214. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. North Ryde, New South Wales, Australia: Academic; 1986.
215. Ruiter M, Duffy P, Simasko S, Ritter RC. Increased hypothalamic signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation after hindbrain leptin injection. *Endocrinology.* 2010;151(4):1509-19.
216. Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods.* 1998;79(1):1-4.
217. Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem.* 1996;67(2):662-8.
218. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72:248-54.
219. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
220. Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci.* 2010;30(41):13690-8.
221. Scavone C, Munhoz, C.D., Kawamoto, E.M., Glezer, I., de Sá Lima, L., Marcourakis, T., Markus, R.P. Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na,K-ATPase activity. *Neurobiology of Aging.* 2005;26:907-16.
222. Kawamoto E, Munhoz, CD., Lepsch, LB., de Sá Lima, L., Glezer, I., Markus, RP., de Silva, CL., Camarini, R., Marcourakis, T., Scavone, C. Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity. *Neurobiol Aging.* 2008;11:1712-20.
223. Feschenko MS, Sweadner, K.J. Phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase C at Ser18 occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997;272:17726-33.
224. De Martino C, Zamboni, L. Silver methenamine stain for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 1967;19(3):273-82.
225. Orellana AM, Vasconcelos AR, Leite JA, de Sa Lima L, Andreotti DZ, Munhoz CD, et al. Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3beta and WNT/ beta-CATENIN signaling in rat hippocampus. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1094-111.
226. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982;297(5868):681-3.

227. Arqués O, Chicote I, Tenbaum S, Puig I, Palmer HG. Standardized Relative Quantification of Immunofluorescence Tissue Staining. Nat Protocol Exchange; 2012.
228. Ristanovic D, Milosevic NT, Stulic V. Application of modified Sholl analysis to neuronal dendritic arborization of the cat spinal cord. J Neurosci Methods. 2006;158(2):212-8.
229. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 2002;30(9):e36.
230. Bakalkin G, Yakovleva T, Terenius L. NF-kappa B-like factors in the murine brain. Developmentally-regulated and tissue-specific expression. Brain Res Mol Brain Res. 1993;20(1-2):137-46.
231. Schmidt-Ullrich R, Mémet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphaël M, Israel A. NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. Development. 1996;122(7):2117-28.
232. de Sa Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AM, Curi R, et al. Ouabain activates NFkappaB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. Neuropharmacology. 2013;73:327-36.
233. Ramon y Cajal S. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébres. 2nd ed. Madri: Instituto Ramon y Cajal; 1972. p. 986.
234. Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. J Anat. 1953;87(Pt 4):387-406.1.
235. Greeff K, Schadeewaldt H. Introduction and Remarks on the History of Cardiac Glycosides. In: Greeff K, editor. Cardiac Glycosides: Part I: Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1981. p. 1-12.
236. Withering W. An account of the Foxglove and Some of its Medical Uses. Birmingham, United Kingdon: Ed. M. Swinney; 1785.
237. Hamlyn JM, Manunta P. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. J Hypertens Suppl. 1992;10(7):S99-111.
238. Gao J, Wymore RS, Wang Y, Gaudette GR, Krukenkamp IB, Cohen IS, et al. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. J Gen Physiol. 2002;119(4):297-312.
239. Padilha AS, Rossoni LV, Xavier FE, Vassallo DV. Ouabain at nanomolar concentration promotes synthesis and release of angiotensin II from the endothelium of the tail vascular bed of spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2004;44(3):372-80.
240. Dvela M, Rosen H, Ben-Ami HC, Lichtstein D. Endogenous ouabain regulates cell viability. Am J Physiol Cell Physiol. 2012;302(2):C442-52.

241. Burlaka I, Liu XL, Rebetz J, Arvidsson I, Yang L, Brismar H, et al. Ouabain protects against Shiga toxin-triggered apoptosis by reversing the imbalance between Bax and Bcl-xL. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(9):1413-23.
242. Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):1848-57.
243. Song H, Thompson SM, Blaustein MP. Nanomolar ouabain augments Ca²⁺ signalling in rat hippocampal neurones and glia. *J Physiol*. 2013;591(7):1671-89.
244. Boyer PK, Poindexter, C.A. The influence of digitalis on the electrolyte and water balance of heart muscle. *Am. Heart J*. 1940. p. 556–91.
245. Cohen I, Daut J, Noble D. An analysis of the actions of low concentrations of ouabain on membrane currents in Purkinje fibres. *J Physiol*. 1976;260(1):75-103.
246. Godfraind T, Ghysel-Burton J. Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump. *Nature*. 1977;265(5590):165-6.
247. Ghysel-Burton J, Godfraind T. Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardioactive steroids in relation to their binding sites and their inotropic effect on guinea-pig isolated atria. *Br J Pharmacol*. 1979;66(2):175-84.
248. Oselkin M, Tian D, Bergold PJ. Low-dose cardiotonic steroids increase sodium-potassium ATPase activity that protects hippocampal slice cultures from experimental ischemia. *Neurosci Lett*. 2010;473(2):67-71.
249. Jamme I, Petit E, Gerbi A, Maixent JM, MacKenzie ET, Nouvelot A. Changes in ouabain affinity of Na⁺, K⁺-ATPase during focal cerebral ischaemia in the mouse. *Brain Res*. 1997;774(1-2):123-30.
250. Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 2000;275(36):27832-7.
251. Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, et al. Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):317-26.
252. Ketchum CJ, Conner CD, Murray RD, DuPlessis M, Lederer ED, Wilkey D, et al. Low dose ouabain stimulates NaK ATPase alpha1 subunit association with angiotensin II type 1 receptor in renal proximal tubule cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(11):2624-36.
253. Roskoski R, Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(1):1-14.
254. Yang WL, Wu CY, Wu J, Lin HK. Regulation of Akt signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle*. 2010;9(3):487-97.
255. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11(3):297-305.

256. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):59-71.
257. Granic I, Dolga AM, Nijholt IM, van Dijk G, Eisel UL. Inflammation and NF-kappaB in Alzheimer's disease and diabetes. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(4):809-21.
258. Shi ZM, Han YW, Han XH, Zhang K, Chang YN, Hu ZM, et al. Upstream regulators and downstream effectors of NF-kappaB in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2016;366:127-34.
259. Rojo AI, Salinas M, Martin D, Perona R, Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci.* 2004;24(33):7324-34.
260. Liu XL, Miyakawa A, Aperia A, Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *Neuroreport.* 2007;18(6):597-600.
261. Nelson DE, Ihekweba, A.E.C., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.A., Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.A., Spiller, D.G., Edwards, S.W., McDowell, H.P., Unitt, J.F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D.B., White, M.R.H. Oscillations in NF-{kappa}B signaling control the dynamics of gene expression. *Science.* 2004;306:704-8.
262. Hoffmann A, Baltimore, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev.* 2006;210:171-86.
263. Geva-Zatorsky N, Rosenfeld, N., Itzkovitz, S., Milo, R., Sigal, A., Dekel, E., Yarnitzky, T., Liron, Y., Polak, P., Lahav, G., Alon, U. Oscillations and variability in the p53 system. *Mol Syst Biol.* 2006;2:1-13.
264. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:693-733.
265. Denis-Donini S, Dellarole A, Crociara P, Francese MT, Bortolotto V, Quadrato G, et al. Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF-kappaB p50-deficient mice. *J Neurosci.* 2008;28(15):3911-9.
266. Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(6):2669-74.
267. Romano A, Freudenthal R, Merlo E, Routtenberg A. Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur J Neurosci.* 2006;24(6):1507-16.
268. Christoffel DJ, Golden SA, Dumitriu D, Robison AJ, Janssen WG, Ahn HF, et al. IkappaB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J Neurosci.* 2011;31(1):314-21.
269. Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, et al. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J Neurosci.* 2009;29(11):3529-37.

270. Boersma MC, Dresselhaus EC, De Biase LM, Mihalas AB, Bergles DE, Meffert MK. A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *J Neurosci.* 2011;31(14):5414-25.
271. Schmeisser MJ, Baumann B, Johannsen S, Vindedal GF, Jensen V, Hvalby OC, et al. IkappaB kinase/nuclear factor kappaB-dependent insulin-like growth factor 2 (Igf2) expression regulates synapse formation and spine maturation via Igf2 receptor signaling. *J Neurosci.* 2012;32(16):5688-703.
272. Maqbool A, Lattke M, Wirth T, Baumann B. Sustained, neuron-specific IKK/NF-kappaB activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging. *Mol Neurodegener.* 2013;8:40.
273. Sarnico I, Lanzillotta A, Boroni F, Benarese M, Alghisi M, Schwaninger M, et al. NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia. *J Neurochem.* 2009;108(2):475-85.
274. Bakker A, Kirwan CB, Miller M, Stark CE. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science.* 2008;319(5870):1640-2.
275. Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science.* 2007;315(5814):961-6.
276. Imielski Y, Schwamborn JC, Luningschror P, Heimann P, Holzberg M, Werner H, et al. Regrowing the adult brain: NF-kappaB controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus. *PLoS One.* 2012;7(2):e30838.
277. Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, et al. GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 2009;29(25):7966-77.
278. Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, et al. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J Neurochem.* 2001;78(2):254-64.
279. Jiang X, Tian F, Mearow K, Okagaki P, Lipsky RH, Marini AM. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2005;94(3):713-22.
280. Kawamoto EM, Munhoz CD, Lepsch LB, de Sa Lima L, Glezer I, Markus RP, et al. Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity. *Neurobiol Aging.* 2008;29(11):1712-20.
281. Lim JY, Park, S.I., Oh, J.H., Kim, S.M., Jeong, C.H., Jun, J.A., Lee, K.S., Oh, W., Lee, J.K., Jeun, S.S. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res.* 2008;86(10):2168-78.
282. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.

283. Vicario-Abejón C, Owens, D., McKay, R., Segal, M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(12):965-74.
284. Zhang X, Poo, MM. Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron.* 2002;36(4):675-88.
285. Ahmed S, Reynolds, B.A., Weiss, S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci.* 1995;15(8):5765-78.
286. Lesiak A, Pelz C, Ando H, Zhu M, Davare M, Lambert T, et al. A Genome-Wide Screen of CREB Occupancy Identifies the RhoA Inhibitors Par6C and Rnd3 as Regulators of BDNF-Induced Synaptogenesis. *PLoS One.* 2013;8(6):e64658.
287. Brindle P, Montminy M. The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev.* 1992;2:199-204.
288. Gonzalez G, Yamamoto K, Fischer W, Karr D, Menzel P, Biggs W, et al. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature.* 1989;337:749-52.
289. Gonzalez G, Montminy M. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 1989;59:675–80.
290. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *nature.* 1993;365(855-859).
291. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci.* 1998;21:127–48.
292. Kida S. A Functional Role for CREB as a Positive Regulator of Memory Formation and LTP. *Exp Neurobiol.* 2012;21(4):136-40.
293. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 1991;252:1427–30.
294. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron.* 1997;19(5):1031-47.
295. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, et al. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *PNAS.* 2009;106:316–21.
296. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 1980;107(2):519-27.
297. Demarchi F, Bertoli C, Sandy P, Schneider C. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39583-90.
298. Haefner B. A model for NF-kappa B regulation by GSK-3 beta. *Drug Discov Today.* 8. England2003. p. 1062-3.

299. Balda MS, Matter K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology*. 2003;13(6):310-18.
300. Hiester BG, Galati DF, Salinas PC, Jones KR. Neurotrophin and Wnt signaling cooperatively regulate dendritic spine formation. *Mol Cell Neurosci*. 2013;56:115-27.
301. He TC SA, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, . Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281(1509-1512).
302. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5522-7.
303. Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, Verma U, Verma IM, Byers S, et al. Regulation of beta-catenin function by the IkappaB kinases. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42276-86.
304. Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, et al. The F-box protein beta TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol*. 1999;9(4):207-10.
305. Gwak J, Cho M, Gong SJ, Won J, Kim DE, Kim EY, et al. Protein-kinase-C-mediated beta-catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 22):4702-9.
306. Gwak J, Yoo YS, Choi YJ, Oh S. Interaction of PKCalpha with the armadillo repeats facilitates the N-terminal phosphorylation of beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(4):1673-8.
307. Mohammadi K, Kometiani P, Xie Z, Askari A. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42050-6.
308. Jho E, Lomvardas S, Costantini F. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;266(1):28-35.
309. Willert K, Shibamoto S, Nusse R. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev*. 1999;13(14):1768-73.
310. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2002;22(4):1172-83.
311. Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Quirk R, Hanash S, et al. Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21657-65.
312. Jiang X, Chai GS, Wang ZH, Hu Y, Li XG, Ma ZW, et al. Spatial training preserves associative memory capacity with augmentation of dendrite ramification and spine generation in Tg2576 mice. *Sci Rep*. 2015;5:9488.
313. Trinchero MF, Koehl M, Bechakra M, Delage P, Charrier V, Grosjean N, et al. Effects of spaced learning in the water maze on development of dentate granule cells generated in adult mice. *Hippocampus*. 2015;25(11):1314-26.

314. Kossel AH, Williams CV, Schweizer M, Kater SB. Afferent innervation influences the development of dendritic branches and spines via both activity-dependent and non-activity-dependent mechanisms. *J Neurosci.* 1997;17(16):6314-24.
315. Wu GY, Cline HT. Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII. *Science.* 1998;279(5348):222-6.
316. Wu GY, Zou DJ, Rajan I, Cline H. Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *J Neurosci.* 1999;19(11):4472-83.
317. Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci.* 2003;23(18):7129-42.
318. Williams DW, Truman JW. Mechanisms of dendritic elaboration of sensory neurons in *Drosophila*: insights from in vivo time lapse. *J Neurosci.* 2004;24(7):1541-50.
319. Scott EK, Luo L. How do dendrites take their shape? *Nat Neurosci.* 2001;4(4):359-65.
320. Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2008;68(2):264-88.
321. Konur S, Ghosh A. Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron.* 2005;46(3):401-5.
322. Redmond L, Ghosh A. Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell Calcium.* 2005;37(5):411-6.
323. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci.* 2005;25(49):11300-12.
324. Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci.* 2005;25(49):11288-99.
325. Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron.* 2002;34(6):999-1010.
326. Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Schulman H, Meyer T. Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron.* 2003;39(2):283-97.
327. Gaudilliere B, Konishi Y, de la Iglesia N, Yao G, Bonni A. A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron.* 2004;41(2):229-41.
328. Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, et al. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron.* 2006;50(6):897-909.
329. Hoogenraad CC, Milstein AD, Ethell IM, Henkemeyer M, Sheng M. GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 2005;8(7):906-15.

330. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, et al. Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma. *Neuron*. 2007;54(5):755-70.
331. Dijkhuizen PA, Ghosh A. BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J Neurobiol*. 2005;62(2):278-88.
332. Leemhuis J, Boutillier S, Barth H, Feuerstein TJ, Brock C, Nurnberg B, et al. Rho GTPases and phosphoinositide 3-kinase organize formation of branched dendrites. *J Biol Chem*. 2004;279(1):585-96.
333. Naska S, Park KJ, Hannigan GE, Dedhar S, Miller FD, Kaplan DR. An essential role for the integrin-linked kinase-glycogen synthase kinase-3 beta pathway during dendrite initiation and growth. *J Neurosci*. 2006;26(51):13344-56.
334. Yacoubian TA, Lo DC. Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci*. 2000;3(4):342-9.
335. Yan Y, Eipper BA, Mains RE. Kalirin is required for BDNF-TrkB stimulated neurite outgrowth and branching. *Neuropharmacology*. 2016;107:227-38.
336. McAllister AK, Lo DC, Katz LC. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*. 1995;15(4):791-803.
337. Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron*. 1997;19(2):269-81.
338. Shimada A, Mason CA, Morrison ME. TrkB signaling modulates spine density and morphology independent of dendrite structure in cultured neonatal Purkinje cells. *J Neurosci*. 1998;18(21):8559-70.
339. Mertz K, Koscheck T, Schilling K. Brain-derived neurotrophic factor modulates dendritic morphology of cerebellar basket and stellate cells: an in vitro study. *Neuroscience*. 2000;97(2):303-10.
340. Danzer SC, Crooks KR, Lo DC, McNamara JO. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures. *J Neurosci*. 2002;22(22):9754-63.
341. Tolwani RJ, Buckmaster PS, Varma S, Cosgaya JM, Wu Y, Suri C, et al. BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience*. 2002;114(3):795-805.
342. Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci*. 2001;21(12):4249-58.
343. Tyler WJ, Pozzo-Miller L. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol*. 2003;553(Pt 2):497-509.

344. Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem.* 2004;11(2):172-8.
345. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89.
346. Gottschalk WA, Jiang H, Tartaglia N, Feng L, Figurov A, Lu B. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Learn Mem.* 1999;6(3):243-56.
347. Blanquet PR. Identification of two persistently activated neurotrophin-regulated pathways in rat hippocampus. *Neuroscience.* 2000;95(3):705-19.
348. Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus.* 2002;12(4):551-60.
349. Alonso M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.* 2002;22(5-6):663-74.
350. Aloor R, Zhang C, Bandyopadhyay M, Dasgupta S. Impact of nuclear factor-kappaB on restoration of neuron growth and differentiation in hippocampus of degenerative brain. *J Neurosci Res.* 2015;93(10):1471-5.
351. Xavier GF, Oliveira-Filho FJ, Santos AM. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus.* 1999;9(6):668-81.
352. Motta-Teixeira LC, Takada SH, Machado-Nils AV, Nogueira MI, Xavier GF. Spatial learning and neurogenesis: Effects of cessation of wheel running and survival of novel neurons by engagement in cognitive tasks. *Hippocampus.* 2016;26(6):794-803.
353. Xavier GF, Costa VC. Dentate gyrus and spatial behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009;33(5):762-73.
354. Zhan H, Tada T, Nakazato F, Tanaka Y, Hongo K. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. *Neurol Res.* 2004;26(1):35-40.
355. Amodeo DA, Grospe G, Zang H, Dwivedi Y, Ragozzino ME. Cognitive flexibility impairment and reduced frontal cortex BDNF expression in the ouabain model of mania. *Neuroscience.* 2016.
356. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1(2):848-58.
357. Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci.* 1989;48(1-2):29-69.
358. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001;36(1):60-90.

359. Mendez-Couz M, Conejo NM, Vallejo G, Arias JL. Spatial memory extinction: a c-Fos protein mapping study. *Behav Brain Res.* 2014;260:101-10.
360. Mendez-Couz M, Gonzalez-Pardo H, Vallejo G, Arias JL, Nelida CM. Spatial memory extinction differentially affects dorsal and ventral hippocampal metabolic activity and associated functional brain networks. *Hippocampus.* 2016.
361. Brigidi GS, Bamji SX. Cadherin-catenin adhesion complexes at the synapse. *Curr Opin Neurobiol.* 2011;21(2):208-14.
362. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem.* 2001;276(15):12301-9.
363. Murase S, Mosser E, Schuman EM. Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron.* 2002;35(1):91-105.
364. Bamji SX, Rico B, Kimes N, Reichardt LF. BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin-beta-catenin interactions. *J Cell Biol.* 2006;174(2):289-99.
365. Tai CY, Mysore SP, Chiu C, Schuman EM. Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron.* 2007;54(5):771-85.
366. Maguschak KA, Ressler KJ. Beta-catenin is required for memory consolidation. *Nat Neurosci.* 2008;11(11):1319-26.
367. Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology.* 1998;37(4-5):553-9.
368. Chen G, Kolbeck R, Barde YA, Bonhoeffer T, Kossel A. Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 1999;19(18):7983-90.
369. Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, et al. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci.* 1999;19(12):4972-83.
370. Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, et al. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron.* 2001;32(1):123-40.
371. Novkovic T, Mittmann T, Manahan-Vaughan D. BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. *Hippocampus.* 2015;25(1):1-15.
372. Aarse J, Herlitze S, D. M-V. The requirement of BDNF for hippocampal synaptic plasticity is experience-dependent. *Hippocampus.* 2016;26(6):739-51.
373. Albeni BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse.* 2000;35(2):151-9.

374. Golden WC, Martin LJ. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo. *Neuroscience*. 2006;137(1):133-44.
375. Brines ML, Robbins RJ. Inhibition of alpha 2/alpha 3 sodium pump isoforms potentiates glutamate neurotoxicity. *Brain Res*. 1992;591(1):94-102.
376. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci*. 2002;22(4):1350-62.
377. Xiao AY, Wang XQ, Yang A, Yu SP. Slight impairment of Na⁺,K⁺-ATPase synergistically aggravates ceramide- and beta-amyloid-induced apoptosis in cortical neurons. *Brain Res*. 2002;955(1-2):253-9.
378. Veldhuis WB, van der Stelt M, Delmas F, Gillet B, Veldink GA, Vliegenthart JF, et al. In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(1):62-74.