JACQUELINE ALVES LEITE

AVALIAÇÃO DO PAPEL MODULADOR DA OUBAÍNA NO EIXO HIPOTALÂMICO-PITUITÁRIO-ADRENAL EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo 2018

JACQUELINE ALVES LEITE

AVALIAÇÃO DO PAPEL MODULADOR DA OUBAÍNA NO EIXO HIPOTALÂMICO-PITUITÁRIO-ADRENAL EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Farmacologia Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone Versão Original

> São Paulo 2018

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)

Alves Leite, Jacqueline AVALIAÇÃO DO PAPEL MODULADOR DA OUBAÍNA NO EIXO HIPOTALÂMICO-PITUITÁRIO-ADRENAL EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL / Jacqueline Alves Leite; orientador Cristoforo Scavone. -- São Paulo, 2018. 140 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. . I. Scavone, Cristoforo , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jacqueline Alves Leite

Título da Tese: Avaliação do papel modulador da ouabaína no eixo hipotalâmicopituitário-adrenal em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível

Orientador(a): Cristoforo Scavone

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:
Examinador(a):
Assinatura
Nome:
Instituição:
-
Examinador(a):
Assinatura
Nome:
Instituição:
2
Examinador(a).
Assinatura:
Nome [,]
Instituição
ากรแนเงื่อง
Drasidanta
Assistant
Assinatura
Instituiçao:



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 52 nas fls. 19 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 "Avaliação do papel modulador da ouabaína no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível" do qual participam o(s) aluno(s) Jacqueline Alves Leite 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 09.06.2014, com validade de 4 anos.

São Paulo, 11 de junho de 2014.

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

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



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.072.2018

São Paulo, 14 de junho de 2018.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "Avaliação do papel modulador da Ouabaína no Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível", registrado sob o protocolo nº 52/2014 e aprovado em 09/06/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi prorrogado até 09/06/2022.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade
Ratus norvegicus	Wistar	Macho	60 dias	200

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Luciane valitie Str Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Cristoforo-Scavone** Departamento de *Farmacologia* Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Eu sou de uma terra que o povo padece Mas não esmorece e procura vencer. Da terra querida, que a linda cabocla De riso na boca zomba no sofrer Não nego meu sangue, não nego meu nome Olho para a fome, pergunto o que há? Eu sou brasileiro, filho do Nordeste, Sou cabra da Peste, sou do Ceará.

Patativa do Assaré

AGRADECIMENTOS

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À Deus, por ter me abençoado nas horas de incerteza e frustração, sempre me mostrando o próximo passo a ser seguido.

Aos animais que doaram suas vidas para que a realização deste trabalho fosse possível.

Aos meus pais, que primaram pela minha educação, que sempre me incentivaram e torceram por minha vitória, por entenderem as minhas faltas e momentos de reclusão, por terem trabalhado sempre por mim, por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos para realizarem os meus, painho e mainha, meu muito obrigada, amo vocês! Aos meus irmãos, Jardel e Geraldo Junior, pela amizade, generosidade, e por sempre estarem perto dos nossos pais nos dias de minha ausência, pelo apoio, amizade e torcida nessa longa caminhada, amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, pela confiança depositada, incentivo e dedicação a este trabalho, por ser um exemplo de professor e pesquisador, por sua generosidade e ensinamentos que inspiram além da ciência, meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Karin Lykke-Hartmann pela atenciosa orientação durante minha estadia na Dinamarca, por sua generosidade e confiança depositada, pelos ensinamentos científicos. Aos meus colegas de laboratório da Universidade de Aarhus Toke Isaksen, Line Steffensen, Anders Heuck, Emil, Julie e Mahboobeh por toda ajuda dispensada e momentos de descontração no Reino da Dinamarca.

À professora Dra. Carolina Munhoz, e seus alunos Nilton e Leonardo por todas as discussões científicas e colaboração com esse trabalho.

À Profa. Dra. Elisa, por contribuir para minha formação, pela colaboração e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas e companheiras de bancada, Diana Andreotti, Ana Maria e Amanda Galvão por contribuírem diretamente para a realização deste trabalho, por serem exemplos de competência e dedicação, por me incentivarem nos momentos mais difíceis do doutorado, por todo carinho e cuidado a mim dispensados, pelas risadas nos cafezinhos.

À Larissa, "supermãe" do laboratório, por ter contribuído tecnicamente par realização deste trabalho, e por sempre estar disposta a ajudar, por seu carinh amizade.

Aos amigos do laboratório de neurofarmacologia: Paula Kinoshita (Paura), Natália Mello (Nazinha), Caio Mazucante (Cainho), João Victor (Joãozinho), Bia Sakashita (Saka), Andrea Vasconcelos (Deinha), Marina (Marinhinha), Geovanni Morais (Gigio), Amanda Midori (Amanda Verde), Paula Canoas (Canoinha), Vinicius Nakao (Vina), Paloma (Palomex) e Lídia (Grandes Olhos), por toda ajuda dispensada, alegrias e descontração no cafezinho, vocês tornaram essa caminhada mais leve, meu muito obrigada!

A minha amiga Amanda Roberta, pela segurança afetiva e presença nos momentos mais difíceis da minha jornada em São Paulo.

Aos professores deste programa de Pós-graduação, pela contribuição na minha formação.

A todos os funcionários da Pós-graduação, em especial, Mônica, Camila e Manuel por toda competência desenvolvida em seus trabalhos.

Aos processos nº 2014/10171-0 e nº 2016/21343-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e apoio financeiro da CAPES e CNPq

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Leite JA. Avaliação do papel modulador da ouabaína no eixo hipotalâmico-pituitárioadrenal em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível. [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

A ouabaína (OUA), um inibidor da Na⁺,K⁺-ATPase, foi identificada como uma substância endógena presente no plasma humano, e parece estar envolvida na resposta ao estresse agudo, em animais e seres humanos. O estresse crônico é um importante fator agravante de doenças psiquiátricas, incluindo depressão e ansiedade. Além disso, problemas cognitivos são cada vez mais reconhecidos como importantes componentes da ansiedade e depressão. Diante disto, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da OUA (1,8 µg/kg) na hiperatividade do eixo HPA, na neuroinflamação, na expressão de receptores e proteínas envolvidos na plasticidade sináptica, nos efeitos comportamentais (como déficit de memória de longa duração, depressão e ansiedade) e atividade da Na⁺,K⁺-ATPase induzidos pelo protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS) realizado ao longo de 14 dias em ratos. Nossos resultados demonstraram que o tratamento intermitente com OUA é capaz de reverter a hiperatividade do eixo HPA induzido pelo CUS, por meio da redução de glicocorticoide, redução na expressão de CRH-CRHR1, bem como diminuir a neuroinflamação, e aumentar os níveis de BDNF e fazer o que na expressão dos receptores CRHR2. Essas alterações bioquímicas contribuíram para uma reversão nos prejuízos na memória de longo prazo induzida pelo CUS. Ademais os animais tratados apenas com OUA, bem como os submetidos ao CUS e tratados com OUA obtiveram uma melhora na memória emocional, averiguada no teste comportamental de condicionamento da memória ao medo. Os resultados encontrados sugerem que o protocolo de CUS por 14 dias promove uma adaptação neuronal facilitando a redesignação da memória ao medo, agui configurado pelo choque, e o tratamento com a OUA abrevia esse processo. Em conclusão os nossos resultados sugerem que o tratamento intermitente com OUA suscita uma adaptação no eixo HPA, por meio de alterações na expressão dos receptores para CRH no hipocampo e hipotálamo, resultando em uma adaptação na memória emocional relacionada ao medo.

Palavras-Chaves: Estresse Crônico Imprevisível, Ouabaína, memória, eixo hipotálamo-pituitária–adrenal.

ABSTRACT

Leite JA. Evaluation of the role of ouabain in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats submitted to unpredictable chronic stress. [PhD Thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

Ouabain (OUA), an inhibitor of Na⁺, K⁺ -ATPase, has been identified as an endogenous substance present in human plasma, and appears to be involved in the response to acute stress in animals and humans. Chronic stress is an important aggravating factor of psychiatric illness, including depression and anxiety. In addition, cognitive problems are increasingly recognized as important components of anxiety and depression. The present work aimed to investigate the effects of OUA (1.8 µg/kg) on HPA axis hyperactivity, neuroinflammation, expression of receptors and proteins involved in synaptic plasticity, behavioral effects (such as long-term memory deficit duration, depression and anxiety) and Na⁺,K⁺-ATPase activity induced by the unpredictable chronic stress protocol (CUS) performed over 14 days in rats. Our results demonstrated that intermittent treatment with OUA was able of reversing CUS-induced HPA axis hyperactivity, by reducing glucocorticoid levels, CRH-CRHR1 expression, as well as reducing CUS-induced low-grade neuroinflammation, and increase BDNF levels and expression of CRHR2 receptors. These biochemical changes contributed to a reversal in CUS-induced long-term memory impairment. In addition, animals treated only with OUA, as well as those submitted to CUS, and also treated with OUA obtained an improvement in emotional memory, which was explored in the fear conditioning test. These results suggest that the CUS protocol of 14 days promotes a neural adaptation facilitating a reassignment of the memory to the fear, here configured by the shock, and the treatment with the OUA shortens that process. In conclusion, our results suggest that intermittent treatment with OUA induces an adaptation on the HPA axis, through alterations in the expression of receptors for CRH in the hippocampus and hypothalamus, resulting in an adjustment in fear-related emotional memory

Keywords: Unpredictable chronic stress, Ouabain, memory, HPA axis

Sumário

INTRODUÇÃO	13
1.1. Estresse	13
1.2. Glicocorticóides	15
1.3. Receptores de CRH e seus ligantes	17
1.4. Estresse e Inflamação	20
1.5. Ouabaína	21
2. OBJETIVO	24
2.1. Geral	24
2.2. Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Animais	26
3.2. Modelo de estresse crônico imprevisível	26
3.3. Obtenção das estruturas	30
3.4. Dosagem de corticosterona, ACTH, CRH, citocinas pro-inflamatórias e BDNF	.30
3.5. Extração de proteínas citosólicas e nucleares	30
3.6. Determinação da concentração de proteínas	31
3.7. Ensaio de Western blot	31
3.8. Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	32
3.8.1. Marcação da sonda	32
3.8.2. Reação de Ligação e corrida do gel	33
3.9. Dosagem da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase	34
3.10. Ensaio da atividade da NOS	35
3.11. RT-PCR em Tempo Real (qPCR)	36
3.12. Testes comportamentais:	37
3.12.1. Reconhecimento do objeto novo	37
3.12.2. Teste de preferência por sacarose	38
3.12. 3. Condicionamento de medo ao contexto e avaliação da extinção da respos de medo ao contexto	sta 39
3.12.3.1. Condicionamento de medo ao contexto:	39
3.12.3.2. Avaliação da Extinção da memória	39

3.13. Análise dos resultados4	11
4. RESULTADOS4	12
4.1. Avaliação do efeito do tratamento com OUA nos níveis de corticosterona, ACTI e CRF de animais submetidos ao CUS4	H 12
4.2. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão de Crh, Crhr1 e Crhr2 no hipocampo e hipotálamo de animais submetidos ao CUS4	14
4.3. Avaliação do efeito do tratamento com OUA no nível de GR citosólico por Western Blot4	16
4.4. Avaliação do efeito do tratamento com OUA nos níveis das citocinas TNF-α e Il 1β de animais submetidos ao CUS4	L- 18
4.5. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na atividade da NOS	51
4.6. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão de enzimas envolvidas no estresse oxidativo	55
4.7. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão de receptores AMPA das proteínas PSD 95 e Sinaptofisina	۹ 57
4.8. Avaliação do efeito do tratamento com OUA nos níveis de BDNF	32
4.9. Avaliação do efeito do tratamento com OUA sobre a ativação do CREB6	34
4.10. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão da Proteína de Resposta ao Crescimento Imediato-1 (Egr-1) no hipocampo e hipotálamo de anima submetidos ao CUS	is 70
4.11. Efeito da OUA sobre a memória de longo prazo utilizando o teste de reconhecimento de objeto novo7	72
4.12. Efeito da OUA sobre a preferência por sacarose	73
4.13. Efeitos do tratamento crônico com OUA na memória do medo condicionado e na extinção da resposta ao medo condicionado em animais submetidos ao CUS7	75
4.13. Efeito da ouabaína na atividade da enzima NKA	77
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO) 0
REFERÊNCIAS) 2
Anexos)3

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

A resposta ao estresse é um mecanismo de adaptação que permite ao organismo manter a homeostase durante desafios ambientais, sendo coordenada pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária–adrenal (HPA). As mudanças em curto prazo que ocorrem no eixo HPA, preparam o organismo para enfrentar diferentes estímulos ambientais (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005; GILLESPIE; NEMEROFF, 2005).

O eixo HPA é composto por um conjunto complexo de interações entre hipotálamo, glândula pituitária e córtex da adrenal, que medeia a resposta ao estresse através das ações de glicocorticóides. Em resposta ao estresse, o núcleo paraventricular (PVN) libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina vasopressina (AVP), que entram na circulação portal hipofisária e estimulam a síntese e secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para a circulação periférica. Quando o CRH e AVP ligam-se em seus respectivos receptores hormônio liberador de corticotróficas da hipófise, induzem a produção de pró-opiomelanocortina (POMC), molécula precursora do ACTH e lipotropinas (LPH) (VALE et al., 1981).

O ACTH estimula a produção e secreção de esteróides nas glândulas adrenais, sendo o cortisol produzido em humanos e a corticosterona em roedores. Este processo é mediado pela interação do ACTH com seu receptor de melanocortina tipo 2 (MC2) no córtex da adrenal (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). A regulação do eixo HPA é mantida por meio da atuação direta do cortisol ou corticosterona no PVN, inibindo por retroalimentação negativa a síntese de CRH e POMC (Figura 1) (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Além disso, o cortisol age em regiões extrahipotalâmicas, tais como hipocampo e amígdala, mantendo a homeostase corporal (ZIEGLER, 2002).





O CRH produzido no PVN do hipotálamo atuam estimulando a síntese e secreção de ACTH na pituitária anterior. O ACTH promove a produção e liberação de glicocorticoides (GCs) a partir do córtex adrenal. Em condições normais, a atividade do eixo HPA é controlada através de uma retroalimentação negativa dos GCs na pituitária, PVN e sistema límbico através da ativação dos receptores GR e MR, inibindo a produção e liberação de CRH. Durante o estresse crônico, esse controle exercido pela retroalimentação negativa está diminuído reforçando a liberação de glicocorticoide.

1.2. Glicocorticóides

A secreção de glicocorticóides pelas adrenais é pulsátil, seguindo o ritmo circadiano que coordena e sincroniza acontecimentos diários e relacionados ao sono (LIGHTMAN et al., 2008). No entanto, o controle da liberação desse hormônio pode ser facilmente acometido pela perda da homeostasia fisiológica, pelo próprio processo de envelhecimento ou pelo estresse (YOUNG; ABELSON; LIGHTMAN, 2004).

Mediante uma situação de estresse, por exemplo, o glicocorticóide é capaz de afetar a liberação de glicose na circulação sanguínea, suprimir funções do sistema imunológico e afetar o processamento de informação nas redes neuronais límbicas envolvidas na emoção, cognição, e formação da memória (DE KLOET et al., 2009). Devido a estes efeitos deletérios da exposição prolongada de glicocorticóide, a atividade do eixo HPA é modulada por uma retroalimentação negativa induzida por glicocorticóides e ACTH que atuam no hipocampo, PVN e glândula pituitária (PAPADIMITRIOU; PRIFTIS, 2009).

Uma vez secretado na corrente sanguínea o cortisol encontra-se normalmente ligado à globulina ligadora de cortisol (CBG), e somente na sua forma livre atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e membranas celulares. Os glicocorticóides se ligam a dois tipos de receptores nucleares que apresentam atividade de fatores de transcrição: o receptor de mineralocorticóide ou tipo I (MR) e o receptor de glicocorticóide ou tipo II (GR). O GR encontra-se amplamente expresso no SNC, enquanto que, o MR é expresso principalmente em áreas límbicas, tais como no hipocampo e amígdala (TER HEEGDE; DE RIJK; VINKERS, 2015). Os MRs apresentam maior afinidade para glicocorticóides que os GRs (revisado em Heeged, 2015), logo, os MRs estão envolvidos na manutenção basal do eixo HPA (ritmos circadianos), enquanto que os efeitos mediados pelos GRs são acionados principalmente em decorrência de situações de estresse, onde os níveis de glicocorticóide circulante encontram-se aumentados (TER HEEGDE; DE RIJK; VINKERS, 2015).

Na ausência de seus ligantes, os receptores para glicocorticóides encontramse no citoplasma na forma de um complexo multiprotéico, associados às proteínas de choque térmico (HSP90, HSP70 e HSP65). Estes complexos de proteínas são importantes para a estabilização dos receptores no citosol (DE KLOET et al., 1998; SCHESCHOWITSCH; LEITE; ASSREUY, 2017). Quando ativados, tanto os GRs quanto os MRs modulam a expressão gênica por mecanismos de transativação ou transrepressão. A transativação envolve o processo de homodimerização dos receptores, que, em seguida, ligam-se ao elemento responsivo aos glicocorticóides (GRE) no DNA para induzir ou inibir a transcrição, enquanto que a transrepressão ocorre por interação direta com outros fatores de transcrição como o NF-κB, CREB e proteína ativadora 1 (AP1), ambas as vias modulam a síntese de proteínas (SCHESCHOWITSCH; LEITE; ASSREUY, 2017).

O estresse agudo aumenta os níveis de glicocorticóides e receptores GR no cérebro, sendo que no córtex pré-frontal (PFC) esse aumento é capaz de suprimir a resposta do eixo HPA (BELDA et al., 2008; FUCHS; FLÜGGE, 2003). Entretanto, no estresse crônico níveis elevados circulantes de ACTH e glicocorticóide estão relacionados com alterações na expressão dos receptores GR e MR em diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC), incluindo hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo, e foi observado que após o período de recuperação ao estresse houve uma diminuição na expressão do RNAm de CRH no PVN, bem como para MR e GR no hipocampo e PVN (MARQUES; SILVERMAN; STERNBERG, 2009; SILVERMAN; STERNBERG, 2012).

Apesar de o glicocorticóide ter ações anti-inflamatórias bem estabelecidas no sistema periférico, estudos têm demonstrado que, durante o modelo de estresse crônico imprevisível (CUS), o aumento nos níveis de glicocorticóides pode potencializar a ativação do NF- κ B induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS), bem como expressão de citocinas pró-inflamatórias no córtex frontal e hipocampo, mas não no hipotálamo. Os efeitos pró-inflamatórios do CUS foram mediados via receptores GR, uma vez que os efeitos de potencialização do estresse na ativação do NF- κ B foram antagonizados na vigência de RU-486, um antagonista para receptores GR (MUNHOZ, 2006). Isso sugere que o estresse pode acelerar a neurodegeneração, provavelmente via aumento de corticosteróides de forma prolongada. Além disso, outros trabalhos mostraram que os glicocorticóides promovem um aumento no número de células inflamatórias, tais como granulócitos, monócitos/macrófagos e ativação da microglia no hipocampo, bem como a produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α (DINKEL; MACPHERSON; SAPOLSKY, 2003; MUNHOZ et al., 2010).

No entanto, os efeitos dos glicocorticóides na neuroinflamação são controversos, visto que outros estudos demonstraram que os glicocorticóides inibem

a ativação da microglia, reduzindo as reações inflamatórias no encéfalo (NADEAU; RIVEST, 2003; SUGAMA et al., 2009). Mais recentemente foi observado que o aumento de glicocorticóide durante o estresse agudo é capaz de promover um controle na ativação da microglia limitando sua capacidade em produzir mediadores envolvidos na inflamação (SUGAMA et al., 2013). Além disso, a administração de dexametasona parece suprimir a ativação do NF-κB induzida por LPS tanto perifericamente como no SNC (Munhoz et al., 2006). Estas ações paradoxais dos glicocorticóides sobre a ativação da microglia podem ser atribuídas aos diferentes modelos experimentais, às diferentes abordagens farmacológicas, ou às diferentes concentrações de hormônios esteroides (MACPHERSON; DINKEL; SAPOLSKY, 2005).

1.3. Receptores de CRH e seus ligantes

O CRH foi descoberto por Vale et al. (1981) como um neuropeptídeo endógeno formado por 41 resíduos de aminoácidos. Este neuropeptídeo encontra-se amplamente distribuído no SNC, predominantemente no PVN, PFC, núcleo central da amígdala, cerebelo e tronco cerebral (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). A expressão de CRH é estimulada por neurotransmissores, como serotonina (Laflamme et al., 1999), norepinefrina (ITOI et al., 1994) e citocinas como fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-1 e IL-6 (TURNBULL; RIVIER, 1999).

O CRH liga-se aos receptores CRHR que existem em duas isoformas o Receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina (CRHR1) e o Receptor 2 do hormônio liberador de corticotropina (CRHR2), ambos são receptores metabotrópicos pertencentes à família de receptores acoplados a proteína-G (GPCRs). A ativação dos receptores de CRF predominantemente leva à sinalização pela adenilato ciclase via Gs, promovendo o aumento dos níveis de AMPc, mas eles também podem sinalizar com outras proteínas G, como Gq/11 e G₀ dependendo especificamente do tecido onde se encontram (BLANK et al., 2003). Em células corticotróficas da pituitária, o receptor CRHR1 é o principal responsável pela regulação da síntese e secreção de ACTH, que por sua vez, estimula a libertação de glicocorticóides a partir do córtex adrenal (MAJZOUB, 2006). Por outro lado, a ativação do CRHR2 promove supressão do apetite e age como um antidepressivo. Assim, o CRHR1 participa da resposta

normal ao estresse, enquanto que o CRHR2 medeia uma resposta de ajuste ao estresse. Além disso, os dois receptores para CRH têm funções opostas na regulação do comportamento, onde o CRHR1 tem efeito ansiogênico e o CRHR2 efeito ansiolítico (BALE; VALE, 2004; MAJZOUB, 2006), conforme ilustrado na figura 2.

Além do CRH, uma família de ligantes do receptor de CRH foi encontrada em mamíferos, denominados Urocortinas (Ucn) (Figura 2). As Ucns são neuropeptídeos com estruturas semelhante ao CRF e apresentam três isoformas diferentes: Ucn-1, Ucn-2 e Ucn-3, sendo expressas sistemicamente. A Ucn1 apresenta 45% de homologia com o CRH sendo expressa no SNC em regiões como o núcleo de Edinger-Westphal e hipotálamo (BITTENCOURT et al., 1999; MACPHERSON; DINKEL; SAPOLSKY, 2005; WONG et al., 1996), e em maior expressão nos sistemas periféricos, como trato gastrointestinal, testículos, coração (BOORSE; DENVER, 2006).

Figura 2 - Esquema representativo dos receptores CRH e efeitos fisiológicos/ comportamentais decorrentes da sua ativação.



O CRH apresenta baixa afinidade pelo CRHR2 em relação ao CRHR1. A ligação do hormônio liberador de corticotropina ao CRHR1 participa da regulação do eixo HPA, induzindo a produção de ACTH e glicocorticóide pela adrenal, bem como promove ativação do SNS (Sistema Nervoso Simpático) e favorece a depressão. No entanto, o CRHR2 promove supressão do apetite e induz efeitos antidepressivos. A Urucortina 1 (UcnI) tem atividade semelhante nos receptores CRHR1 e CRHR2, enquanto que as UcnII e UcnII apresentam maior afinidade pelos receptor CRHR2. Adaptado de Bale e Vale (2004) (BALE; VALE, 2004).

1.4. Estresse e Inflamação

Além das regulações neuro-endócrinas citadas anteriormente relacionadas ao eixo HPA, achados recentes mostram que o estresse infeccioso/inflamatório pode ativar o eixo HPA aumentando os níveis de ACTH e glicocorticóide plasmáticos, levando à supressão do sistema imunológico, prevenindo uma superativação da resposta inflamatória (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; CHESNOKOVA; MELMED, 2002). As citocinas são mediadores importantes da interação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico.

A interleucina (IL)-1β apresenta um importante papel regulador do eixo HPA (GOSHEN; YIRMIYA, 2009) encontrando-se expressa em todas as regiões deste, interferindo na secreção de CRH, ACTH e glicocorticóide a partir do hipotálamo, hipófise e córtex adrenal, respectivamente. Além disso, a IL- 1β, via ativação de seus receptores IL-1RI presentes na pituitária e supra-renal, pode induzir diretamente a secreção de ACTH e glicocorticóide (MOHN et al., 2011). Ademais, tem sido observado que a IL-1β promove uma redução na neurogênese hipocampal, bem como na ativação de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) que estão envolvidos na formação da memória e aprendizado, sendo que, no geral, as citocinas pró-inflamatórias levam a uma redução nos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e córtex pré-frontal de animais submetidos a modelos de estresse crônico (WOHLEB et al., 2016).

O fator nuclear kappa B (NF-κB) pode se ligar a regiões promotoras do gene CRH levando a sua ativação, dessa forma o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α pode levar a ativação do eixo HPA uma vez que são ativadoras da via de sinalização do NF-κB (KAGEYAMA et al., 2010).

O estresse oxidativo apresenta um importante papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e da depressão, a exposição ao estresse crônico pode interferir nos sistemas antioxidantes, tanto os enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD) e catalase, bem como os não enzimáticos como glutationa (GSH), no mais, foi observado um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em pacientes com depressão maior (BILICI et al., 2001; LUCCA et al., 2009).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre com funções de sinalização no SNC e periférico, sendo produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), durante a conversão da L-arginina para L-citrulina. Existem três isoformas de NOS descritas, a

NOS neuronal (NOSn) principal forma expressa no encéfalo (BREDT; SNYDER, 1994; MORENO-LÓPEZ et al., 2000), a NOS endotelial (NOSe) e a NOS induzida (NOSi) (PAAKKARI; LINDSBERG, 1995). No SNC, o NO desempenha funções fisiológicas e patológicas importantes, modulando a atividade sináptica durante a potenciação de longo prazo (LTP), a neurogênese, a sinaptogênese, processos de neurodegeneração, sobrevivência e diferenciação neuronal (CHO et al., 2009; ZHOU; ZHU, 2009).

Diferentes trabalhos tem relacionado o papel da NOSn com doenças psiquiátricas tais como, depressão (ZHOU; ZHU, 2009), ansiedade (ZHANG et al., 2010), esquizofrenia (O'DONOVAN et al., 2008; SHINKAI et al., 2002) e agressividade (CHIAVEGATTO et al., 2001). O estresse crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de depressão em indivíduos com vulnerabilidade genética (TSANKOVA et al., 2006; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006), devido a hiperatividade do eixo HPA, que se correlaciona diretamente com a função prejudicada dos receptores GR no hipocampo, córtex e hipotálamo sendo um importante fator etiológico no desenvolvimento de doenças psiquiátricas (BOYLE et al., 2005). Além disso, vários estudos têm indicado que inibidores da NOS apresentam propriedades semelhantes a antidepressivos, sob condições fisiológicas (JOCA; GUIMARÃES, 2006).

Outro importante ponto é a relação que tem sido observada entre o aumento da atividade da NOSn e a redução de receptores de GR no hipocampo de camundongos (ZHOU et al., 2011). Níveis elevados de glicocorticóides induzem um aumento na expressão de NOSn no hipocampo via ativação de receptores MR, e por sua vez, promove uma redução nos níveis de GR na região hipocampal, com consequente ativação da via da ERK (ZHOU et al., 2011).

1.5. Ouabaína

A ouabaína (OUA) é um glicosídeo cardiotônico esteroidal classicamente conhecido por inibir a Na⁺,K⁺-ATPase (NKA). A OUA foi primeiramente descrita como um composto de origem vegetal e utilizada para tratamento da insuficiência cardíaca (BLAUSTEIN, 1993), sendo posteriormente descrita como um componente endógeno presente em mamíferos superiores (HAMLYN et al., 1991). Este digitálico pode ser

encontrado no plasma humano em concentrações nanomolares, sendo produzido pela adrenal, hipotálamo e hipófise (FERRANDI et al., 1997; HAMLYN et al., 1991), e apresentando características químico-estruturais, biológicas e imunológicas comparáveis as da OUA encontrada em vegetais (FERRANDI et al., 1997; HAMLYN et al., 1991; SCHONER, 2000). Evidências sugerem que a síntese de OUA pode ser modificada de acordo com o estado fisiológico do organismo. Níveis elevados deste digitálico foram encontrados em pacientes hipertensos (SCHONER, 2000), assim como em diferentes modelos de ratos com hipertensão (HUANG; LEENEN, 1996). A OUA também participa da resposta do organismo ao estresse agudo, onde o exercício físico é capaz de aumentar seus níveis em ratos, cachorros e seres humanos minutos após o início da atividade física (GOTO et al., 1992).

Também tem sido demonstrado o efeito modulatório da OUA em eventos como, o crescimento celular, migração e morte celular programada (ABRAMOWITZ et al., 2003; BARWE et al., 2005; LIU et al., 2004) por meio da enzima NKA, que além de seu papel regulatório na homeostasia iônica, desempenha um papel na transdução de sinal e na ativação da transcrição gênica (KOMETIANI et al., 1998; PENG et al., 1996; TIAN; GONG; XIE, 2001; XIE; ASKARI, 2002).

Uma das vias ativadas pela interação entre a NKA e a OUA é a via IP3/Ca²⁺ (Inositol-trifosfato/Cálcio). 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 Ca²⁺ IP3R, presente no retículo endoplasmático, resultando em abertura e fechamento ritmados do canal. A OUA, também é capaz de promover a oscilação de Ca²⁺, por via dos canais de Ca²⁺-voltagem dependente (AIZMAN; APERIA, 2003; ZHANG et al., 2006).

Além da sinalização por Ca²⁺, a enzima NKA é capaz de ativar a via da Src quinase (CEREIJIDO et al., 2012; TIAN et al., 2006), via interação proteína-proteína, levando a consequente transativação do EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), e ativação da via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (CEREIJIDO et al., 2012). A via da MAPK, por sua vez pode ativar vários fatores de transcrição, tais como CREB (elemento de resposta ligado ao AMP cíclico) e NF- κ B, os quais estão associados transcrição de inúmeros fatores neurotróficos e citocinas (AIZMAN; APERIA, 2003). A NKA parece ainda modular a liberação de glutamato e a expressão de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (BERSIER; RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, 2009; KAWAMOTO et al., 2012).

Estudos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que a administração intra-hipocampal de 10 nM de OUA em ratos aumentou, após 1 hora, a expressão de genes associados à sinalização inflamatória e fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) e possível neuroproteção pela modulação do fator nuclear κB (NF-κB). Essa modulação se deve em parte pela ação dos receptores glutamatérgicos tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato) (KAWAMOTO et al., 2012). Além disso, estudos em cultura de células primárias de cerebelo de rato mostraram o envolvimento da via NMDA-Src-Ras-MAPK na ativação do NF-κB e na modulação destes genes pela OUA (DE SA LIMA et al., 2013). Os resultados desses estudos confirmam a existência de um novo tipo de sinalização para a OUA no SNC (KAWAMOTO et al., 2012). Ademais, foi demonstrado em modelo, in vivo, que a injeção intra-hipocampal de OUA 10 nM promoveu um aumento na ramificação dendrítica, bem como melhorou a memória espacial e prejudicou a extinção da memória operacional e estes efeitos foram decorrentes da ativação das vias de sinalização, importantes na regulação de sinapses, CREB-BDNF, NF-κB, GSK-3β e Wnt/β-Catenina (ORELLANA et al., 2018).

Interessantemente, estudos tem demonstrado a participação de compostos semelhantes aos digitálicos no desenvolvimento da depressão, bem como foi observado alterações genéticas nas isoformas alfas da NKA em pacientes com transtorno bipolar (GOLDSTEIN et al., 2009, 2012). Diante disto, nosso trabalho teve como objetivo avaliar o papel do tratamento crônico imprevisível com OUA em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Investigar o papel modulador do tratamento crônico com a ouabaína no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em ratos expostos ao estresse crônico imprevisível (CUS).

2.2. Específicos

- Estudar o efeito da OUA nos níveis séricos de corticosterona, ACTH, CRF e citocinas pró-inflamatórias nos animais submetidos ao CUS;
- Investigar se o tratamento crônico com OUA altera a expressão de CRH, CRHR1 e CRHR2 em diferentes regiões do cérebro dos animais submetidos ao CUS;
- Avaliar se o tratamento com OUA modula a expressão de proteínas envolvidas nas sinapses: AMPAR, PSD95 e sinaptofisina;
- Investigar se o tratamento com OUA interfere na expressão de proteínas antioxidantes, SOD1, SOD2 e GRx, bem como citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β) em diferentes regiões do cérebro de animais expostos ao CUS;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com OUA nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e BDNF em diferentes regiões do cérebro de animais expostos ao CUS;
- Investigar os efeitos do tratamento com OUA na atividade da NKA e NOS;
- Estudar os efeitos da OUA na ativação do fator de transcrição CREB em diferentes regiões do cérebro;

 Investigar os efeitos comportamentais decorrente do tratamento com OUA nos animais submetidos ao CUS, no processo de formação de memória, depressão e ansiedade dos animais submetidos ao CUS: prejuízos na memória, depressão e ansiedade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos (250-300 g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos de manipulação dos animais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas segundo as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo registrado n.52; fls 19; livro 03. 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 ($22 \pm 2 \, ^{\circ}$ C), sob ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 6 – 18h) e fornecimento de água e ração *ad libitum*.

3.2. Modelo de estresse crônico imprevisível

Para avaliação do efeito da OUA na ativação do eixo HPA foi utilizado o modelo de estresse crônico imprevisível (CUS), no qual ratos foram submetidos a diferentes estímulos estressores durante 14 dias (MUNHOZ, 2006). Os animais foram divididos em quatro grupos: PBS estéril (Salina fosfatada tamponada); Ouabaína (OUA); CUS (*chronic unpredictable stress*) e CUS + OUA.

Os tratamentos foram administrados por via intra-peritoneal 1 hora antes do protocolo de estresse ser realizado. A solução de OUA foi preparada diluindo-se a OUA em PBS, administrada na dose de 1,8 µg/kg (KINOSHITA et al., 2014). Os animais dos grupos controle (PBS e OUA) foram mantidos em suas gaiolas durante o período de estresse. Os diferentes estímulos estressores encontram-se descritos abaixo, bem como o cronograma de experimentação. O desenho experimental está ilustrado na figura 3.

<u>Natação forçada</u>: Os animais foram colocados por, no máximo, 15 minutos em tanques de paredes escuras com capacidade para 60 litros preenchidos com água à

temperatura ambiente. A qualquer sinal de cansaço o animal foi retirado do tanque, para evitar afogamento.

Imobilização: Os animais foram colocados por 60 minutos em cilindros de PVC opacos, medindo 20 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro com furos para circulação de ar, sendo que uma das extremidades fechada.

Luz apagada ou acesa: Para luz apagada, o animal foi mantido em sala escura por 120 min durante a fase de claro. Para luz acesa os animais foram mantidos em ambiente iluminado durante todo o período de escuro.

Isolamento frio: Os animais foram colocados em refrigerador com luz apagada durante 90 min, sob temperatura de $4 \pm 2^{\circ}$ C

Privação de água e alimento: A ração e as garrafas de água foram retiradas por 14 h na fase de escuro.

Tabela 1 - Cronograma dos estímulos estressores utilizados no modelo de estresse crônicoimprevisível.

1º dia	Imobilização 60 minutos	Tarde
2º dia	Natação forçada 15 minutos	Manhã
3º dia	Isolamento/frio 90 minutos	Tarde
4º dia	Luz acesa à noite	Noite
5º dia	Natação forçada 5 minutos	Manhã
6º dia	Privação de água e alimento	Noite
7º dia	Imobilização 120 minutos	Tarde
8º dia	Luz apagada por 2 horas	Tarde
9º dia	Natação forçada 5 minutos	Manhã
10º dia	Luz acesa à noite	Noite
11º dia	Isolamento/frio 90 minutos	Manhã
12º dia	Imobilização 60 minutos	Tarde
13º dia	Privação de água e alimento	Noite
14º dia	Imobilização 60 minutos	Manhã
15º dia		Eutanásia

Figura 3 - Representação esquemática dos procedimentos realizados para avaliação do efeito do tratamento crônico com OUA no estresse crônico imprevisível.



Estesse crônico Imprevisível - CUS

Os animais foram divididos em quatro grupos: PBS, OUA, CUS e CUS + OUA. Foi realizado um tratamento intermitente, logo no dia 1 os animais do grupo CUS e CUS + OUA foram expostos somente ao estímulo estressor, ademais, no dia 2 os animais dos CUS e OUA + CUS foram tratados com PBS ou Ouabaína 1 hora antes do estímulo estressor, logo o tratamento foi mantido de forma alternada durante 14 dias. Os animais controles (PBS e OUA) também foram tratados em dias alternados, porém após o tratamento, os mesmos foram devolvidos as gaiolas. Após 24 horas do último estímulo estressor os animais foram eutanásiados e as estruturas hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo foram armazenadas para estudos bioquímicos. Além disso, o soro foi colhido para análise de corticosterona, ACTH, CRH e citocinas. PBS: animais tratados com solução salina tamponada de fosfato; OUA: animais tratados com ouabaína; CUS: animais submetidos ao estresse Crônico Imprevisível; OUA + CUS: animais tratados com OUA e submetidos ao CUS.

3.3. Obtenção das estruturas

Após 24 horas do último estímulo estressor, os animais foram previamente anestesiados com isofluorano e submetidos a eutanásia por decapitação, sempre das 9 h às 12 h da manhã. As regiões hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecadas e armazenadas em freezer a -80 °C para posterior processamento e realização dos estudos moleculares. Além disso, o sangue dos animais foi coletado e centrifugado por 15 minutos a 2.000g para obtenção do soro e posterior análise dos níveis de corticosterona, ACTH, CRF, BDNF e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).

3.4. Dosagem de corticosterona, ACTH, CRH, citocinas pro-inflamatórias e BDNF

As dosagens de corticosterona, ACTH, CRH, citocinas (IL-1 β e TNF- α) e BDNF foram feitas por kits de ELISA, seguindo instruções dos fabricantes: kit Corticosterona EIA (Enzo LifeSciences), kit ACTH ELISA (PHOENIX), kit CRF (PHOENIX), kit para IL-1 β e TNF- α (eBioscience) e kit BDNF ELISA (Promega), e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 450 nm em um leitor de microplacas (Epock, Biotech).

3.5. Extração de proteínas citosólicas e nucleares

O método utilizado foi descrito em Rong e Baudry (1996). 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, KH₂PO₄ 1,27 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 0,5 M; leupeptina 2,5 µg/mL; antipaína 2 µg/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 segundos a 4 °C. O *pellet* foi

ressuspendido em 400 μ L de tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e incubado em gelo durante 10 minutos. Foi adicionado em seguida 10 μ L de NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 12.000 x g por 30 segundos a 4°C, e o sobrenadante correspondente ao extrato citosólico foi armazenado. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 100 μ l de tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25%; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 μ g/mL; antipaína 2 μ g/mL; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e incubado 20 minutos em gelo, centrifugou-se o extrato a 12.000 x g por 20 minutos 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 de *western blot* e EMSA.

3.6. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976) 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 fornece a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.7. Ensaio de Western blot

As amostras para o ensaio de *western blot* foram preparadas como descrito no item anterior. O ensaio de *western blot* usado é baseado no descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram ajustadas na quantidade de 10 µg com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCI; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromofenol blue; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95 °C. As amostras foram aplicadas no gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37, 5:1), 1% SDS) para que haja a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel

foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base; 0,192 M de glicina; 0,1% de SDS. O gel foi corrido por volta de 60 minutos a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) por aproximadamente 90 minutos 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 60 minutos a 4ºC numa solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água), 0,5% de BSA e 0,05% de Tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anti-GR (1:500, Santa Cruz-1004), anti-GLUR1 (1:1000, Cell Signaling- 13185), anti-PSD95 (1:1000, Santa Cruz-71933), anti-Sinaptofisina (1:1000, Abcam- 8049), anti-β-actina (1:20000, Santa Cruz) todos diluídos em TBS e incubados overnight a 4 °C. Após o período de incubação as membranas foram então lavadas 5 vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:2000) ou anti-mouse (1:4000) por 60 minutos. A revelação foi feita através de kit de quimioluminescência (Millipore, Bellerica, MA, EUA).

3.8. Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

3.8.1. Marcação da sonda

O oligonucleotídeo do CREB contendo a sequência 5⁻- AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG- 3⁻ foi marcado 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/µL de T₄ quinase, 1 µL de γ -³²P ATP (3Ci/mmol), 1 µl de tampão T₄ Kinase Buffer (10 X) em 10 µL de volume de reação). Após incubação a 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Colunas (Microspin G-25) foram posicionadas em um tubo de microcentrífuga, centrifugando-se por 1 minuto 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/µL. O método está padronizado no nosso laboratório como descrito em Kawamoto et al., 2012 e Munhoz et al., 2010.

3.8.2. Reação de Ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4µL 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 dldc 0,25 µg/µL; glicerol 20 %), extrato nuclear (2,5 µg de proteína) e H₂O q.s.p. para 20 µL de volume final. O tubo foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 µL), e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Para visualizar a corrida adicionou-se 1 µL 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 horas a 150-160 V. Ao final desta, o gel foi seco e permaneceu definitivamente fixado em um 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 para o CREB.

3.9. Dosagem da atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase

Os tecidos, hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal, foram homogeneizados em tampão contendo: 20 mM HEPES pH 7,4; 0,32 M sacarose; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 1,0 mM PMSF; 10 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL aprotinina. Em seguida, essa suspensão de tecido foi centrifugada a 1.000 x g x 10 min e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12.000 x g x 20 min, 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem da enzima NOS e o pellet ressuspendido para avaliação da atividade da NKA. O método se baseia na detecção de moléculas de fosfato provenientes da hidrólise de ATP, na presença e na ausência de OUA. O fosfato na forma livre foi quantificado por espectofotometria após a reação de complexação com molibdato de amônio, gerando um cromóforo cuja absorbância foi determinada a 690 nm (ESMANN, 1988; FESCHENKO; SWEADNER, 1994). As amostras (20 μg em 40 μL) foram incubadas com 360 μl de tampão Histidina (140 mM NaCl; 20 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 30 mM Histidina; 3mM ATP - pH = 7.2) na ausência (ATPase TOTAL) ou na presença de ouabaína (3 µM ou 3 mM), para a determinação da atividade insensível à ouabaína. Os tubos de reação foram incubados a 37°C por 20 min. A reação foi interrompida através da adição de 600 µl do Tampão Término de Reação (H₂SO₄ 1N e molibdato de amônio 0,5%). Em seguida, 10 μl da solução redutora (Fiske-Subarrow - Sigma-Aldrich $0.05\mu g/\mu L$) foram adicionados em todos os tubos. Alíquotas de 200 μ L foram transferidas dos tubos de ensaio para placa de ELISA 30 min após a adição da solução redutora e a absorbância em 690 nm foi medida em leitor de microplaca. A concentração de fosfato inorgânico (Pi), nas amostras, liberado na hidrólise do ATP pela NKA, foi determinada interpolando-se os valores obtidos em uma curva padrão de KH₂PO₄. O ensaio permitiu a determinação da concentração de Pi na faixa de 0,05 até 0,35 µmoles. A atividade da ATPase sensível à ouabaína (NKA) foi calculada através da diferença entre as atividades obtidas no grupo com OUA 3 mM (ATPase insensível à OUA) e às obtidas no grupo sem a OUA (ATPase TOTAL). As atividades das isoformas $\alpha_{2,3}$ (diferença entre atividade total e 3 µM) e α 1 NKA (diferença entre OUA 3 µM e OUA 3 mM).

3.10. Ensaio da atividade da NOS

O método usado baseia-se na estimativa da atividade da NOS pela conversão de L-Arginina em L-Citrulina (BREDT; SNYDER, 1994), desenvolvido em nosso laboratório a partir dos ensaios descritos em Mckee et al. (1994) (MCKEE; SCAVONE; NATHANSON, 1994). Os tecidos, hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal foram homogeneizados em tampão contendo: 20 mM HEPES pH 7,4; 0,32 M sacarose; 0,1 mM EDTA; 1,0 mM DTT; 1,0 mM PMSF; 10 µg/mL leupeptina; 2µg/mL aprotinina. Em seguida, as suspensões dos tecidos foram centrifugadas a 1000 x g x 10 min e o sobrenadantes foram novamente centrifugados a 12.000 x g x 20 min, 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para a dosagem da enzima NOS, sendo 500 µL aplicado em uma coluna de 0,3 mL de resina DOWEX 50WX8 200-400 na forma sódica para retirar a arginina endógena. Após a determinação da concentração proteica da amostra pelo kit da Bio-Rad, as amostras foram diluídas para a concentração de 1µg/µL. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C em 200 μ L de meio reacional contendo: 20 μ M de arginina (0,5 μ Ci), 4 μ M de FAD, 4 μ M de FMN, 10 µM de BH4, 10 µg/ml de Calmodulina, e 1mM de NADPH e 100µl de amostra. Para verificar a atividade da NOSi, foi feito um novo meio reacional contendo 5 mM de EGTA no lugar da calmodulina. Para parar a reação, os tubos foram colocados no gelo, e 1 mL de HEPES 20 mM pH 5,5 foi adicionado. O volume total contido no tudo de reação foi transferido para uma coluna com 0,3 ml de resina DOWEX na forma sódica, recolhendo-se o eluato num recipiente para espectrofotometria de cintilação. Para lavar a resina e garantir máxima recuperação do produto, outros 1 mL de HEPES pH 5,5 e 1 mL de água destilada foram aplicados à coluna, recolhendo-se também o eluato no mesmo recipiente. Foi adicionado 8 mL de líquido de cintilação (Ultima Gold™) em um recipiente e a atividade presente nas amostras foram determinadas com o auxílio de um contador de radiação β (Perkin Elmer; modelo: Tri-Carb 2800TR). As contagens em c.p.m. (contagem por minuto) foram convertidas para d.p.m.(decaimento por minuto) e a atividade específica foi calculada em pmol.mg⁻¹.min⁻¹, segundo a seguinte fórmula:

Atividade (pmol/mg.min) = <u>n° de moléculas de arginina – [³H-citrulina] – branco</u> (Total – branco) x tempo reação x [proteína]
O controle negativo usado como branco da reação foi obtido usando-se o mesmo procedimento de obtenção de uma amostra, porém adicionando-se tampão de homogeneização no lugar da amostra.

3.11. RT-PCR em Tempo Real (qPCR)

O RNA total dos tecidos (Hipotálamo e Hipocampo) foi isolado e purificado utilizando o E.Z.N.A total RNA KIT I (OMEGA, Georgia, EUA). O RNA foi quantificado e 1µg foi tratado com DNAse I e submetido à transcrição reversa utilizando oligo dT(12-18), *random primer* e a transcriptase reversa IMPROM II de acordo com as instruções do fabricante (Promega Corporation,USA).

Para confirmar a o efeito do tratamento crônico com OUA na modulação do eixo HPA a expressão dos genes CRH, CRHR1 e CRHR2 foram mensuradas pela técnica de RT-PCR em tempo real (qPCR) utilizando o ensaio de expressão gênica da sonda TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), especificamente Crh, Crhr1, Crhr2. Além disso, foram avaliados genes envolvidos no estresse oxidativo e inflamação por meio dos seguintes ensaios TaqMan, SOD1, SOD2, GSR, TNF-α e IL-1β. Ademais, a expressão de EGR-1 foi avaliada para determinação da atividade neuronal por meio do ensaio Taqman.

Como controle endógeno da reação de qPCR foi utilizado a sonda TaqMan para o gene *Hprt-1* (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1* As informações referentes a todas as sondas usadas estão listadas na tabela 4. A reação de qPCR foi realizada no Termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada reação em duplicata continha 4uL de cDNA, 6,25uL do TaqMan FAST Advanced Master Mix (Applied Biosystems), 0,625uL da sonda TaqMan e 1,62uL de água nuclease free (Applied Biosystems) totalizando um volume de 12,5uL por poço. O primeiro passo da reação foi de amplicação a 95 °C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos a 95° por 3 segundos (denaturação) e 60 °C a 30 segundos (anelamento e extensão). O método comparativo de delta-delta-Ct foi utilizado para quantificação da diferença na amplificação entre as amostras normalizadas pelo calibrador de referência (controle endógeno).

Gene	Identificação Sonda	Comprimento do	Ref Seq
	TacqMan	amplicon (em pb)	
SOD-1	Rn00566938_m1	62	NM_017050.1
SOD-2	Rn00690588_g1	64	NM_017051.2
Glutationa	Rn01482159_m	64	NM_053906.2
Redutase			
TNF-alpha	Rn01525859_g1	92	NM_012675.3
IL-1β	Rn00580432_m1	74	NM_031512.2
EGR1	Rn00561138_m1	64	NM_012551.2
CRH-R1	Rn00578611_m1	112	NM_031019.1
CRH-R2	Rn00575617_m1	82	NM_022714.1
Hprt-1	Rn012527840_m1	64	NM_012583.2

Tabela 4 - Informações das sondas TaqMan utilizadas para cada gene estudado.

3.12. Testes comportamentais:

3.12.1. Reconhecimento do objeto novo

O teste de reconhecimento de objeto novo (NOR) é um ensaio comportamental simples para mensurar a memória a partir de um comportamento exploratório inato do roedor, na ausência de regras ou de reforço, que tende a explorar mais um objeto novo (ANTUNES; BIALA, 2012).

Esta tarefa é composta de três fases: habituação (10 min), treinamento (5 min) e teste (5 min) e foi realizada no aparelho de campo aberto. A fase de habituação foi realizada 24 h após o ultimo estímulo estressor. Os ratos foram colocados no centro do aparato onde exploraram livremente a arena do campo aberto na ausência de objetos. Após 24h da habituação, os animais foram submetidos à fase de treinamento, onde o animal foi devolvido ao aparato só que dessa vez contendo dois objetos idênticos (**A + A**), os quais foram colocados a uma distância de 10 cm da parede da arena. Transcorridas 24 h da fase de treinamento, os animais retornaram ao aparelho

de campo aberto para testar a memória de longo prazo, onde um objeto novo foi colocado e um objeto já conhecido por eles durante a fase de treino foi mantido (**A** + **B**). Os testes foram filmados, e posteriormente o tempo de exploração de cada objeto foi mensurado a cego, com auxílio de um cronômetro. Animais que apresentaram tempo de exploração \leq 10 segundos foram excluídos. O índice de discriminação foi calculado como a diferença do tempo de explorar o objeto novo e o antigo, expressa como razão em relação ao tempo total gasto (ROOZENDAAL et al., 2006).

3.12.2. Teste de preferência por sacarose

Para avaliar o comportamente de anedonia, foi realizado o teste de preferência por sacarose, 24 horas após o ultimo estímulo estressor. Os animais foram individualizados e expostos, por dois dias de habituação, a solução de sacarose 1% (w/v) em água. Para tanto, uma garrafa contendo água e outra contendo solução de sacarose 1% foram disponibilizadas aos animais *ad libitum*, por 24 horas, após as quais as garrafas foram trocadas de posição. Após a habituação, os animais foram privados de água e comida durante 24 horas. Para a avalição do teste de preferência por sacarose duas garrafas idênticas, uma contendo água e outra solução de sacarose1% foram disponibilizadas para os animais por 24 horas.

A preferência de sacarose é medida pelo volume consumido de água e solução de sacarose, aferido pela medida de peso das garrafas antes e depois do teste. Os cálculos seguem a equação abaixo:

% PS = Consumo de sacarose (g)/Consumo total (H2O+Sacarose)x100

3.12. 3. Condicionamento de medo ao contexto e avaliação da extinção da resposta de medo ao contexto

3.12.3.1. Condicionamento de medo ao contexto:

Para a realização do ensaio destinado à avaliação do medo condicionado ao contexto foram utilizados dua arenas distintas: uma caixa de condicionamento e uma caixa neutra (arena não pareada, NP). A caixa de condicionamento (28 x 26 x 23 cm) é composta de por três paredes brancas, uma tampa e uma parede de acrílico transparente, e uma base formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica disposta de forma linear (diâmetro de 0,4 cm e espaçamento entre elas de 1,05 cm) e conectadas a um gerador de choque elétrico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto-SP). No dia do treino, 24 h após o último estímulo estressor, cada animal foi introduzido, individualmente, na caixa de condicionamento pelo período de 2 minutos, seguido do estímulo incondicionado (EI) de choque nas patas. O EI foi composto por uma única sessão de choque (0,5 mA) com duração de 1 segundo, após 15 segundo os animais foram reconduzidos à suas respectivas gaiolas.

3.12.3.2. Avaliação da Extinção da memória

Após 24 h do treino, foi realizado o primeiro dia de avaliação da extinção da memória ao medo condicionado, onde os animais foram reconduzidos a caixa de condicionamento, onde permaneceram por um periodo de 10 minutos, sem a presença do El. Esse procedimento foi repetido por 6 dias consecutivos. A medida de análise de comportamento de medo foi o tempo de congelamento (freezing), definido como uma completa imobilidade do animal, com ausência de movimento de vibrissas e farejamentos. Ademais, um grupo de animais foi conduzido a arena não pareada (NP), 24 horas após o El, sendo o controle do experimento. Após a realização de cada teste as caixa de condicionamento pareado e não pareado foram limpas com álcool 5% para evitar pistas olfatórias. Todo o porcedimento de treino e testes foram

registrados por uma câmera de vídeo e análise do comportamento foi realizada a cego.

Figura 4 - Representação esquemática dos testes comportamentais realizados para avaliação dos efeitos do CUS e do tratamento intermitente com OUA na formação da memória.



Fluxograma dos testes comportamentais

Após 24 horas da realização do último protocolo de CUS iniciou-se os testes comportamentais. (A) Esquema representativo do teste de reconhecimento do objeto novo realizado no décimo quarto dia com a adaptação e 24 h depois o teste. (B) Esquema representativo do teste de preferência por sacarose, 24 horas após o último estímulo estressor os animais eram a uma garrafa contendo água e outra sacarose (1%), posteriormente as garrafas eram trocadas de posição, e no décimo sétimo dia foi realizado o teste de PPS (C) Esquema ilustrativo do protocolo de teste de condicionamento do medo ao contexto. O primeiro contato com o teste foi realizado no décimo quinto dia, quando os animais receberam um choque. Após 1 dia foram reexpostos a arena e foi realizada a medida de consolidação da memória. Nos sete dias consecutivos foi avaliada a extinção da memória. RON: Reconhecimento do objeto novo; PPS: Preferência por sacarose; CUS: Estresse Crônico Imprevisível. OUA: Ouabaína.

3.13. Análise dos resultados

Os dados decorrentes do ensaio de EMSA e de *Western blot* foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa *"ImageJ"* (National Institute of Health, EUA).

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e a diferença entre os diferentes grupos foi avaliada por comparação das médias de 2 grupos pelo test-T de student ou por análise de variância (ANOVA) de duas vias, conforme o necessário, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, respectivamente. Em todos os casos o nível de significância mínimo considerado foi de *p* < 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito do tratamento com OUA nos níveis de corticosterona, ACTH e CRF de animais submetidos ao CUS

O estresse crônico induz a uma hiperatividade do eixo HPA que é modulado pelo aumento nos níveis dos hormônios. Diante disto, avaliamos o efeito do tratamento crônico com OUA nos níveis séricos de animais submetidos ao protocolo do CUS.

Na figura 5A, foi possível observar que apenas o tratamento com OUA na dose de 1,8 µg/kg não interferiu nos níveis basais de corticosterona. No entanto, os animais submetidos ao CUS apresentaram um aumento nos níveis de corticosterona 24 h após o último estímulo estressor quando comparado ao grupo controle demonstrando assim, a funcionalidade do modelo. Interessantemente, os animais submetidos ao CUS e tratados com OUA apresentaram uma redução nos níveis de corticosterona, quando comparado ao grupo CUS.

No entanto, nas figuras 5B e 5C, não observamos alterações nos níveis séricos de ACTH e CRH 24 h após o último estímulo estressor dos animais submetidos ao CUS quando comparados ao grupo controle (CTR). Além disso, o tratamento com OUA não interferiu no nível destes hormônios.



Figura 5 - O tratamento crônico intermitente com OUA interfere nos níveis séricos de corticosterona em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS).

(A) O gráfico representa um aumento nos níveis séricos de corticosterona (ng/dL) nos animais do grupo CUS, 24 horas após o último estímulo estressor, em relação ao grupo CTR (n=7), e o tratamento crônico com OUA reduz a concentração de corticosterona em relação ao grupo CUS. (B) e (C) as concentrações séricas de ACTH (ng/dL) (n= 9-10) e CRF (ng/dL) (n= 13-15) não tiveram alterações nos diferentes grupos estudados, 24 horas após o último estímulo estressor. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls), onde as diferenças estatísticas foram representadas por ***p < 0,001.

4.2. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão de Crh, Crhr1 e Crhr2 no hipocampo e hipotálamo de animais submetidos ao CUS

O CRH é um neuropeptídeo importante na regulação do estresse e ativação do eixo HPA, o mesmo desenvolve seus efeitos via ativação dos receptores CRHR1 e CRHR2. Diante disto, avaliamos o efeito do tratamento cônico com OUA na expressão de CRH, CRHR1 e CRHR2 no hipocampo e hipotálamo.

O resultado apresentado na figura 6A demonstra que os animais submetidos ao CUS apresentaram uma redução na expressão de *Crh* quando comparado ao grupo controle no hipocampo (P= 0,005). Além disso, no hipocampo dos animais submetidos ao CUS não apresentaram alterações na expressão do receptor *Crhr1* quando comparado ao grupo controle (Figura 6B), entretanto, foi observado que o tratamento com OUA de animais submetidos ao CUS, apresentaram uma redução significativa na expressão de *Crhr1* em relação ao grupo OUA (p<0,01) (Figura 6B). Ademais, na figura 6C, foi possível observar que os animais tratados com OUA e expostos ao CUS apresentaram uma redução significativa na expressão do receptor *Crhr2*.

No hipotálamo, os resultados demonstraram um aumento significativo na expressão de *Crh* nos animais submetidos ao CUS quando comparados ao grupo controle, que foi revertido pelo tratamento com OUA (Figura 6D). Além disso, na figura 6F foi observado que o tratamento apenas com OUA reduziu a expressão do receptor *Crhr1*, nos animais submetidos ao CUS. Ademais, foi demonstrado na figura 6F que os animais tratados com OUA e submetidos ao protocolo do CUS apresentaram um aumento significativo na expressão do receptor *Crhr2* quando comparado aos demais grupos estudados.



Figura 6 - O CUS e o tratamento com OUA modulam a expressão de genes envolvidos na ativação do eixo HP.

(A) Animais submetidos ao protocolo do CUS apresentaram uma redução na expressão de *Crh* no hipocampo (P=0,005). (B) O estresse não altera a expressão de *Crhr1* no hipocampo de animais submetidos ao CUS em relação aos grupos controles, mas o tratamento com OUA é capaz de aumentar a expressão de Crhr1 sendo que na vigência de CUS, a OUA apresenta uma redução significativa em relação ao grupo OUA controle (P=0,02) (C) O tratamento com OUA aumenta a expressão de *Crhr2* no hipocampo dos animais submetidos ao CUS em relação ao grupo CUS. (D) O gráfico apresenta um aumento na expressão de *Crh* no hipotálamo dos animais submetidos ao CUS em relação ao grupo CUS em relação ao grupo CTR, e o tratamento com OUA reverte esse efeito. (E) Tanto o tratamento com OUA assim como o CUS reduzem a expressão do receptor Crhr1 em comparação ao grupo CTR no hipotálamo dos animais. (F) Os animais do grupo OUA+CUS apresentaram um aumento na expressão de Crhr2 no hipotálamo. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls), onde as diferenças estatísticas foram representadas por *p < 0,05 e **p<0,01.

4.3. Avaliação do efeito do tratamento com OUA no nível de GR citosólico por Western Blot

Fundamentados em dados na literatura onde o estresse crônico reduz a expressão de receptores GR no hipotálamo e regiões do sistema límbico (hipocampo e córtex), promovendo assim uma hiperatividade do eixo HPA, e consequente aumento nos níveis de corticosterona, e conforme os dados apresentados anteriormente, onde o tratamento com OUA foi capaz de reduzir os níveis de corticosterona, buscamos investigar se esses efeitos eram decorrentes de alterações na expressão de receptores GR no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo de ratos expostos ao CUS.

Nos dados apresentados nas figuras 7A, 7C e 7E observamos que os animais submetidos ao protocolo do CUS apresentaram uma redução significativa nos níveis de GR citosólico no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo, 24 h após o último estímulo estressor quando comparado ao grupo controle. Contudo, observamos que o tratamento com OUA não reverteu os efeitos gerados pelo protocolo de CUS nos níveis de GR citosólico, nas estruturas estudadas. Estes dados sugerem que a redução induzida pela OUA nos níveis de corticosterona em animais submetidos ao CUS independe da modulação dos receptores GR.

Figura 7 - Efeito da OUA nos níveis de GR citosólico no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS) por Western Blot.



(A) e (B) representam a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do hipocampo, respectivamente (n=7). (C) e (D) representam a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do córtex pré-frontal, respectivamente (n=5). (E) e (F) representam a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do córtex pré-frontal, respectivamente (n=5). (E) e (F) representam a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do hipotálamo, respectivamente (n=5). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, **p<0,01 (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.4. Avaliação do efeito do tratamento com OUA nos níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β de animais submetidos ao CUS

A depressão tem sido caracterizada como uma doença inflamatória, bem como o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β (GADEK-MICHALSKA et al., 2013). Logo, buscamos avaliar os efeitos da OUA nos níveis de citocinas próinflamatórias de animais submetidos ao CUS.

Na figura 8A, observamos que os animais submetidos ao CUS apresentaram uma redução nos níveis de TNF- α , no córtex pré-frontal quando comparado ao grupo controle (P= 0,005), interessantemente, foi observado um aumento nos níveis de TNF- α induzido pelo CUS no hipotálamo (P= 0,04) (Figuras 8C). No entanto, o tratamento com OUA não interferiu nos níveis de TNF- α nas estruturas analisadas e soro (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D).

Ademais, ao analisarmos os níveis de IL-1 β , verificamos uma redução desta citocina no hipocampo dos animais submetidos ao CUS quando comparado ao grupo controle (P= 0,043) (Figura 9B).Houve um aumento nos níveis de IL-1 β no hipotálamo dos animais submetidos ao CUS (P= 0,035) quando comparados ao grupo controle (Figura 9C). O tratamento com OUA não interferiu nos níveis de IL-1 β nas diferentes estruturas analisadas e soro (Figura 9).



Figura 8 - O estresse crônico imprevisível interfere nos níveis de TNF-α no córtex frontal e hipotálamo.

(A) Os níveis de TNF-α estão reduzidos no córtex pré-frontal de animais submetidos ao CUS em relação ao grupo controle (P=0,005). (B) e (D) Os gráficos demonstram que não houve alteração na concentração de TNF-α no hipocampo e soro dos diferentes grupos estudados. (C) O gráfico representa os níveis de TNF-α no hipotálamo, que se encontraram elevados nos animais submetidos ao CUS em relação aos grupos controles (P=0,04). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).



Figura 9 - O estresse crônico imprevisível interfere na concentração de IL-1β no hipocampo e hipotálamo, não sendo modificado pelo tratamento intermitente com OUA.

(A) e (D) Os níveis de IL-1 β no córtex pré-frontal e soro não foram alterados nos diferentes grupos estudados. (B) O estresse crônico induziu um aumento na concentração de IL-1 β no hipocampo em relação ao grupo controle (P=0,043). (C) O gráfico mostra um aumento na concentração de IL-1 β no hipotálamo dos animais submetidos ao CUS em relação aos animais do grupo CTR. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.5. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na atividade da NOS

Estudos tem demonstrado a participação do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento da ansiedade e prejuízos na memória de roedores submetidos ao estresse crônico (PALUMBO et al., 2007; SEVGI; OZEK; EROGLU, 2006). Diante disto, avaliamos a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo.

Os resultados demonstraram no córtex pré-frontal uma redução na atividade das enzimas NOS total (P= 0,02) e NOS neuronal (P= 0,01) induzido pelo CUS quando comparado ao grupo controle (Figuras 10A e 10C). No entanto, o tratamento com OUA não interferiu na atividade das enzimas analisadas.

No hipocampo, observamos um aumento na atividade da enzima iNOS dos animais submetidos ao CUS comparados ao grupo controle (p<0,05) (Figura 11B). Interessantemente, o tratamento com OUA reverteu o efeito do CUS na atividade da enzima iNOS quando comparados ao grupo CUS (p<0,01) (Figura 11B). Ademais, nas figuras (11A e 11C) foi demonstrado que não houve alterações nas enzimas NOS total e NOS neuronal no hipocampo dos diferentes grupos estudados.

Ao analisarmos o hipotálamo dos diferentes grupos, observamos, na figura 12B, que os animais submetidos ao CUS, bem como os animais na presença do tratamento com OUA e submetidos ao CUS apresentaram um aumento na atividade da iNOS quando comparado ao controle (P= 0,01). Entretanto, nas figuras 12A e 12C, não observamos alterações induzidas pelo CUS nas enzimas NOS total e nNOS. Ademais, o tratamento com OUA não alterou a atividade das enzimas estudadas no hipotálamo.



Figura 10 - O estresse crônico imprevisível interfere na atividade da enzima óxido nítrico sintase neuronal e total no córtex de ratos.

(A e C) Os gráficos representam a redução na atividade das enzimas tNOS (P=0,02) e nNOS (P=0,01) induzida pelo estresse crônico em relação ao grupo controle. (C) O gráfico mostra que não houve alteração na atividade da nNOS entre os grupos estudados. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pósteste Newman-Keuls).



Figura 11 - O tratamento crônico com OUA reduz a atividade da iNOS no hipocampo de animais submetidos ao CUS.

(A) e (B) Os gráficos demonstram que não houve alteração na atividade da tNOS e nNOS no hipocampo dos diferentes grupos estudados. (B) O CUS aumentou a atividade da iNOS em relação aos grupos controles, no entanto o tratamento de OUA no grupo OUA+CUS reverteu esse efeito na atividade da iNOS. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls). Onde as diferenças estatísticas foram representadas *p<0,05 e **p<0,01.



Figura 12 - O estresse crônico imprevisível aumenta a atividade da iNOS no hipotálamo.

(A) e (C) A atividade da tNOS e nNOS não foram alteradas nos diferentes grupos estudado.
(B) O estresse crônico imprevisível aumento a atividade da iNOS quando comparado aos grupos controle (P=0,01). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.6. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão de enzimas envolvidas no estresse oxidativo.

O estresse crônico promove geração de espécies reativas de oxigênio levando a um estresse oxidativo e consequente neurodegeneração, que desempenha um papel fundamental na patologia da depressão.

Diante disto, avaliamos a expressão por qPCR de enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Nossos resultados demonstraram uma redução das enzimas SOD2 (Figura 13B) e GSR (Figura 13C) no hipocampo dos animais submetidos ao CUS quando comparado ao grupo controle. Ademais, na figura 11C foi demonstrado que os animais tratados com OUA e submetidos ao CUS apresentaram uma redução significativa na expressão de GSR quando comparado ao grupo CUS.

No entanto, foi observado nas figuras 13D, 13E e 13F, que não houve alteração na expressão de superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1, SOD2) e glutationa redutase (GSR) no hipotálamo dos animais submetidos ao CUS, bem como o tratamento com OUA quando comparados ao grupo controle



de ratos pelo protocolo de CUS.



Figura 13 - Modulação da expressão de enzimas antioxidantes no hipocampo e hipotálamo









(A) Os resultados sugerem ausência de modulação na expressão de SOD1 no hipocampo dos diferentes grupos estudados. (B) A expressão de SOD2 foi reduzida nos grupos submetidos ao CUS em relação aos grupos controles no hipocampo. (C) O grupo OUA+CUS apresentaram uma redução na expressão de GSR em relação ao grupo CUS. (D), (E) e (F) os resultados apresentam ausência de alteração na expressão de SOD1, SOD2 e GSR no hipotálamo dos diferentes grupos estudados. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls). Os resultados foram considerados significativos quando *p<0,05 e ***p<0,001.

4.7. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão de receptores AMPA das proteínas PSD 95 e Sinaptofisina.

De acordo com a literatura, animais submetidos ao estresse crônico imprevisível apresentam uma modulação negativa na expressão de receptores AMPA e nas proteínas PSD95 e sinaptofisina (LIU et al., 2015; YUEN et al., 2012). Diante disto, fomos investigar o efeito da OUA sobre a expressão dos receptores AMPA e das proteínas PSD95 e Sinaptofisina no modelo do CUS.

No nosso modelo os animais submetidos ao protocolo do CUS apresentaram uma redução nos níveis dos receptores AMPA, 24 h após o último estímulo estressor, no córtex pré-frontal quando comparado ao grupo controle. Além disso, observamos que o tratamento com OUA não interferiu nos níveis basais destes receptores, porém os animais tratados com OUA e submetidos ao CUS apresentaram um resgate significativo nos níveis de receptores AMPA no córtex pré-frontal quando comparados ao grupo CUS (Figura 14C). No entanto, não observamos alterações na expressão do receptor AMPA no hipocampo (Figura 14A).

Na figura 15 avaliamos os níveis de PSD-95, onde não observamos alterações nos níveis desta proteína nas diferentes estruturas estudadas, hipocampo, córtex préfrontal e hipotálamo (Figura 15A, 15B e 15C respectivamente), 24 h após o último estímulo estressor quando comparado ao grupo controle. O tratamento com OUA *per se* não interferiu nos níveis basais desta proteína. Além disso, também não observamos alterações nos níveis de sinaptofisina no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais submetidos ao CUS quando comparados ao grupo controle (Figuras 16A e 16B). **Figura 14** - Efeito da OUA nos níveis de receptores AMPA no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS) por Western Blot.



(A) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β-ACTINA e autorradiografia das bandas do hipocampo.
 (C) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β-ACTINA e autorradiografia das bandas do córtex pré-frontal.
 (B, D) As figuras representam a autorradiografia das bandas para hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média,

***p<0,001 (CUS vs PBS) e *p<0,05 (CUS vs CUS+OUA) (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

Figura 15 - Efeito da OUA nos níveis de PSD95 no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS) por Western Blot.



<u>0=</u>5 n=5 ဂူ <u>G</u>=I CTR cus

0.0

	CTR		CUS		
	PBS	OUA	PBS	OUA	
PSD95		-			
β-ACTINA			-		

(A) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e (B) autorradiografia das bandas do hipocampo. (C) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e (D) autorradiografia das bandas do córtex pré-frontal. (E) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e (F) respectiva autorradiografia das bandas do hipotálamo. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

Figura 16 - Efeito da OUA nos níveis de sinaptofisina no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS) por Western Blot.



(A) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do hipocampo (n=6-5). (C) A figura representa a análise densitométrica das bandas normalizadas pela β -ACTINA e autorradiografia das bandas do córtex pré-frontal (n=5). Os resultados sugerem ausência de modulação. (B, D) As figuras representam a autorradiografia das bandas para hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.8. Avaliação do efeito do tratamento com OUA nos níveis de BDNF

O BDNF é um importante fator neuronal envolvido no desenvolvimento neuronal e função sináptica (TAO et al., 1998). Sabendo que o tratamento crônico com OUA modulou positivamente receptores e proteínas envolvidas na plasticidade sináptica em animais expostos ao protocolo do CUS, buscamos investigar o papel do BDNF neste efeito.

Nossos resultados demonstraram que não houve alteração nos níveis de BDNF no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo dos animais submetidos ao CUS quando comparados ao grupo controle (Figuras 17A, 17B e 17C). Entretanto, o tratamento com OUA aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal quando comparado ao grupo CUS (Figuras 17A e 17B). Ademais o tratamento com OUA *per se* não interferiu nos níveis de BDNF nas estruturas avaliadas (Figuras 17A, 17B e 17C).

Figura 17 - O tratamento crônico com OUA altera os níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal em animais submetidos ao CUS.



(A) Hipocampo e (B) Córtex pré-frontal, ambos os gráficos demonstram que a OUA aumentou os níveis de BDNF nos animais submetidos ao CUS em relação ao grupo CUS. (C) A concentração de BDNF não foi alterada no hipotálamo dos diferentes grupos estudados. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls). Os resultados foram considerados significativos quando *p<0,05.

4.9. Avaliação do efeito do tratamento com OUA sobre a ativação do CREB

De acordo com os dados apresentados anteriormente, a OUA foi capaz de aumentar os níveis de BDNF em animais submetidos ao CUS e sabendo que a ativação do CREB pode desencadear a transcrição do BDNF, buscamos investigar o papel do CREB nos efeitos desencadeados pela OUA no estresse crônico.

Os resultados apresentados mostram que tanto o CUS quanto o tratamento com OUA não interferiram na ativação do CREB quando comparado ao grupo controle no hipocampo e hipotálamo, respectivamente (Figuras 18 e 20). Entretanto quando avaliamos a ativação do CREB no córtex pré-frontal observamos uma redução na ativação deste quando comparado ao grupo controle (figura 19). Além disso, foi possível observar que a OUA reverteu esse efeito na medida em que promoveu um perfil de ativação transcricional para o CREB quando comparado ao grupo CUS (Figura 19). Entretanto, o tratamento com OUA *per se* não alterou a ativação do fator CREB.

Figura 18 - Efeitos da OUA sobre a ativação do CREB no hipocampo de ratos submetidos ao CUS.





(A) análise densitométrica das bandas da autorradiografia normalizadas pelo controle, das amostras de hipocampo. O gel também representa o ensaio de competição onde ocorreu o desaparecimento da banda para o fator de transcrição CREB, por causa do excesso do oligonucleotídio não marcado (10x), demonstrando assim sua especificidade para. **(B)** Figura da autoradiografia de ensaio de EMSA. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).



Figura 19 - Efeitos da OUA sobre a ativação do CREB no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao CUS.

(A) Análise densitométrica das bandas da autorradiografia normalizadas pelo controle das amostras de córtex pré-frontal. O gel também representa o ensaio de competição onde ocorreu o desaparecimento da banda para o fator de transcrição CREB, por causa do excesso do oligonucleotídio não marcado (10x), demonstrando assim sua especificidade para (B) Figura representativa da autoradiografia de ensaio de EMSA. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média ***p<0,001 (CTR vs CUS) e *p<0,05 (CUS vs OUA+CUS) (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).Igual a figura de cima, explicar imagem a esquerda, oq significa as coisas e se possível colocar o nome da estrutura bem visível em cima

Figura 20 - Efeitos da OUA sobre a ativação do CREB no hipotálamo de ratos submetidos ao CUS.



(A) representa a análise densitométrica das bandas da autorradiografia normalizadas pelo controle das amostras de hipotálamo. O gel também representa o ensaio de competição onde ocorreu o desaparecimento da banda para o fator de transcrição CREB, por causa do excesso do oligonucleotídio não marcado (10x), demonstrando assim sua especificidade. (B) Figura representativa da autoradiografia de ensaio de EMSA. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.10. Avaliação do efeito do tratamento com OUA na expressão da Proteína de Resposta ao Crescimento Imediato-1 (Egr-1) no hipocampo e hipotálamo de animais submetidos ao CUS

O estresse crônico pode afetar a expressão e função de proteínas envolvidas no crescimento neuronal, formação de novos neurônios e plasticidade neuronal, logo o efeito do estresse crônico na expressão da proteína de resposta ao crescimento imediato-1 (Egr1-1) foi avaliado. Os resultados demonstraram que o estresse crônico imprevisível reduziu a expressão de Egr-1 no hipocampo de ratos, além disso, o tratamento com ouabaína não interferiu na expressão de Egr-1 no hipocampo dos animais submetidos ao CUS (Figura 21A). Não foi observado alterações na expressão de Egr-1 no hipotálamo de todos os grupos estudados (Figura 21B).

Figura 18 - O CUS reduz a expressão da proteína de resposta ao crescimento imediato-1 (Egr1-1) no hipocampo de ratos.



expressão de Egr-1 foi reduzida nos grupos submetidos ao CUS, bem como no grupo OUA+CUS em relação aos grupos controles no hipocampo (B) O gráfico representa que não houve alteração na expressão de Egr-1 no hipotálamo dos diferentes grupos estudados. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls). Os resultados foram considerados significativos quando p<0,05. **p<0,01.
4.11. Efeito da OUA sobre a memória de longo prazo utilizando o teste de reconhecimento de objeto novo

Na literatura é bem descrito que o estresse crônico promove prejuízos na formação da memória, em virtude dessa informação utilizamos o teste de reconhecimento de objeto novo para avaliar os efeitos da OUA na formação de memória de longo prazo, em animais submetidos ao CUS.

Conforme ilustrado na figura 22, é possível observar que os animais do grupo CUS mostraram um prejuízo na memória de longo prazo, visto que apresentaram uma capacidade reduzida em reconhecer a presença de um novo objeto, quando comparado ao grupo PBS. Entretanto, o tratamento apenas com OUA não interferiu na formação de memória de longo prazo. Já os animais expostos ao CUS que foram pré-tratados com OUA, apresentaram uma reversão nos prejuízos ocasionados pelo CUS na memória de longo prazo.

Figura 22 - Efeito da OUA no índice de discriminação do objeto novo em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS).



Os animais foram submetidos a ambientação por 3 dias durante 10 minutos no local de realização do teste. Após 24 h do último estímulo estressor os animais foram submetidos ao teste onde foram expostos a dois objetos iguais por 10 minutos Transcorridas 24 h os animais foram novamente expostos ao teste por 5 minutos, no entanto um dos objetos foi trocado por um novo objeto. O tempo de exploração dos dois objetos foi quantificado para avaliar a memória de longo prazo. A figura representa o percentual do índice de discriminação (n=6-9). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média, (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls). Onde os resultados foram considerados representativos quando *p<0,05 (CUS vs CTR) ***p<0,001 (CUS vs OUA+CUS).

4.12. Efeito da OUA sobre a preferência por sacarose

Para avaliar se o CUS induziria anedonia e ansiedade nos animais, os mesmos foram submetidos ao teste de preferência por sacarose e de supressão da alimentação pela novidade, respectivamente.

Na figura 23, observamos que os animais dos grupos PBS e OUA apresentaram semelhante preferência pela solução de sacarose (1%). Ademais, quando os animais foram expostos ao protocolo de estresse crônico imprevisível por 14 dias, também não foi observado alteração no teste de PPS, demonstrado que o protocolo do CUS de 14 dias não é suficiente para desenvolver anedonia em ratos Wistar. Em adição, o tratamento com OUA não alterou a preferência basal por sacarose nos animais submetidos ao CUS. **Figura 23** - Efeito da OUA no teste de preferência pelo consumo de sacarose em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS)



A percentagem de preferência por sacarose foi determinada após o protocolo do CUS. O gráfico representa a percentagem de sacarose consumida pelos diferentes grupos após o protocolo do CUS. Não houve diferença entre os grupos estudados. Os dados representam o valor da média ± erro padrão da média (n=3-5), (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

4.13. Efeitos do tratamento crônico com OUA na memória do medo condicionado e na extinção da resposta ao medo condicionado em animais submetidos ao CUS.

Com o intuito de investigar se o estresse crônico imprevisível, bem como o tratamento intermitente com OUA influenciam no processo de extinção da memória do medo condicionado ao contexto, realizamos o experimento comportamental de memória do medo condicionado, onde os animais controles e estressados, tratados ou não com OUA, receberam um choque de 1 mA nas patas.

Para a avaliar se a memória ao medo condicionado apresentava uma relação com a caixa de contexto, realizamos um experimento controle, para tanto um grupo adicional de animais (Controle não pareado: CTR-NP) 24 horas após receberem o choque nas patas foram acondicionados em uma caixa diferente, sendo assim, podemos observar na figura 24A, que estes animais não desenvolveram *freezing* quando comparado aos animais controle que foram colocados na mesma caixa onde receberam o choque. Estes resultados suportam nossos dados, indicando que os animais fizeram *freezing* em resposta ao contexto.

Conforme mostrado na figura 24B, os animais tratados com OUA, bem como os submetidos ao estresse crônico imprevisível não apresentaram diferenças em relação aos grupos controles na aquisição da memória, uma vez que 24 horas após o treino de aquisição (dia 1), a percentagem de *freezing* foram semelhantes.

Interessantemente, em relação ao processo de extinção da memória, notamos que os animais tratados apenas com OUA, bem como os animais submetidos ao CUS, e tratados com OUA e submetidos ao CUS apresentaram redução de *freezing* após sucessivas reexposições na arena condicionada, a partir do terceiro dia (Figura 24C). Diante disto, podemos inferir que o tratamento intermitente com OUA, mostrou um papel importante na extinção da memória, bem como o CUS. Além disso, o tratamento com OUA não interfere na extinção da memória induzida pelo CUS.

Figura 24 - O tratamento com OUA e o Estresse Crônico Imprevisível (CUS) promovem uma rápida extinção da resposta ao medo condicionado e não interfere na formação da memória do medo condicionado.



(A) O gráfico representa o teste não pareado, onde os animais CTR apresentaram menor *freezing* quando acondicionados na arena não pareada. (B) Gráfico em colunas ilustrando que não houve diferença no percentual de *freezing* entre os grupos estudados 24 horas após o estímulo de choque nas patas. (C) Os animais do grupo controle (CTR) apresentaram maior percentual de *freezing* nos dias 3 e 4 comparados aos animais OUA, CUS e CUS+OUA. Os resultados em A foram analisados por *test t* e expressos em média ± erro padrão da média, *p<0,05 (CTR vs CTR-NP). Enquanto que, os dados em B e C foram analisados por ANOVA

de duas vias, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls e expressos em média ± erro padrão da média, **p<0,01 (CTR vs OUA), (CTR vs CUS) e (CTR vs CUS+OUA).

4.13. Efeito da ouabaína na atividade da enzima NKA

Na figura 25B observamos que a exposição prolongada ao CUS (14 dias) causou uma diminuição específica na atividade das isoformas $\alpha_{2,3}$ no córtex pré-frontal quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com OUA foi capaz de reverter a diminuição na atividade destas isoformas quando comparado ao grupo CUS. Curiosamente, o tratamento crônico com OUA *per se* diminuiu a atividade total da NKA, tanto no CTR quanto no grupo CUS, e de ambas isoformas $\alpha_{2,3}$, sem, no entanto, alterar a atividade da α_1 no córtex pré-frontal de ratos (Figuras 25A, 25B e 25C). Além disso, o estresse não alterou a atividade das outras ATP-ases insensíveis à ouabaína (figura 25D).

A diminuição na atividade da NKA induzida pelo CUS foi específica para o córtex pré-frontal, uma vez que, não observamos alterações na atividade desta bomba no hipocampo (Figuras 26A, 26B, 26C e 26D). Além disso, o tratamento com OUA não interferiu na atividade da bomba nesta estrutura, bem como quando os animais foram tratados com OUA e expostos ao CUS (Figuras 26A, 26B, 26C e 26D). Ademais, o estresse não alterou a atividade de outras ATPases no hipocampo (Figuras 26A, 26B, 26C e 26D).



Figura 25 - Efeito da OUA na atividade da NKA no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS).

(A)A figura representa a análise atividade total da NKA (n=5). (B) A figura representa a atividade das isoiformas $\alpha 2,3$ (n=5), na qual observa-se diminuição da atividade com o tratamento de OUA assim como pelo CUS, e recuperação da atividade da enzima no grupo submetido ao CUS e tratado com OUA. (C) A figura representa a análise atividade da isoforma $\alpha 1$ (n=5). (D) A figura representa a atividade da Mg-ATPase (n=5). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls). Onde os resultados foram considerados significativos quando p<0,05.



Figura 26 - Efeito do tratamento crônico com OUA na atividade da NKA no hipocampo de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (CUS).

(A) A figura representa a análise atividade total da NKA (n=5). (B) Gráfico da atividade das isoformas $\alpha 2,3$ (n=5). (C) Análise atividade da isoforma $\alpha 1$ (n=5). (D) A figura representa a atividade da Mg-ATPase (n=5). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

A exposição ao estresse crônico encontra-se associado a um risco aumentado de doenças, como depressão, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças autoimunes (COHEN; JANICKI-DEVERTS; MILLER, 2007). A incidência dessas doenças relacionadas ao estresse está aumentando, particularmente na sociedade contemporânea, onde as pressões econômicas e sociais desempenham um papel importante na vida cotidiana (TAMASHIRO; NGUYEN; SAKAI, 2005). Estudos demonstram que moradores de grandes cidades apresentam um maior risco para desenvolver transtornos de ansiedade (21%) e de humor (39%) (PEEN et al., 2010). Nos Estados Unidos, 71% da população apresenta co-morbidades relacionadas a transtorno depressivo e de ansiedade (GRANT et al., 2005). Um estudo realizado por Andrade et al. (2012) apontou que cerca de 30% da população da região metropolitana de São Paulo apresenta alguma doença mental (ANDRADE et al., 2012).

Diante disso, a comunidade científica tem utilizado de modelos animais para melhor compreender as alterações neuro-imuno-endócrinas ocasionadas pelo estresse tornou-se uma ferramenta muito valiosa. No presente estudo, utilizamos o modelo de estresse crônico imprevisível (CUS), que intercala diferentes estímulos estressores ao longo de 14 dias, desafiando o organismo psicologicamente (por exemplo, o isolamento) e fisicamente (por exemplo, o frio) (BARNUM et al., 2012; MUNHOZ, 2006). Esse mesmo modelo têm sido utilizado por diferentes grupos de pesquisa para avaliar o desenvolvimento da depressão (YOU et al., 2011). Entretanto, nossos dados demonstraram que, embora o CUS induza a alterações bioquímicas na hiperatividade do eixo HPA, bem como na plasticidade sináptica, isto não foi suficiente para produzir alterações comportamentais associadas a preferência por sacarose, como mostrado na figura 23, o que pode se justificar por dados encontrados na literatura onde o CUS induz um fenótipo depressivo após 3 semana de estresse (SCHMIDT; DUMAN, 2007).

A OUA é considerada um hormônio (HAMLYN et al., 1991) que inibe de forma específica e dose-dependente à NKA (BLAUSTEIN, 1993), o que pode acarretar o aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular, em decorrência da reversão do trocador Na⁺,Ca²⁺, e com consequente exacerbação da contração miocárdica (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989). Além disso, a OUA pode atuar como um transdutor de sinais, ativando cascatas de sinalização como Src-Ras-Raf-MAPK (Src:

proto-oncogene tirosina quinase, Ras: tipo de proteína G de baixo peso molecular e MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno) através do receptor de EGF levando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e como consequência a ativação da AP-1 e NF- κB, que estão envolvidos em diversos processos celulares como crescimento, apoptose, motilidade e adesão (AIZMAN; APERIA, 2003; CEREIJIDO et al., 2012; TIAN et al., 2006; XIE; ASKARI, 2002).

Apesar de sua utilização na clínica para tratamento de insuficiência cardíaca (BLAUSTEIN, 1993; GOTO et al., 1992) e do conhecimento de sua síntese pelas adrenais, hipófise e hipotálamo (FERRANDI et al., 1997; LAREDO; HAMILTON; HAMLYN, 1994) seu papel fisiológico ainda não está bem elucidado. Trabalhos anteriores utilizando o modelo de natação para indução de estresse agudo indicaram que os níveis de OUA plasmáticos e na glândula adrenal aumentaram em paralelo à estimulação esperada de corticosterona, em resposta ao estresse agudo, sugerindo assim, que a OUA pode funcionar como um hormônio associado ao estresse, atuando em tempos diferentes da corticosterona (GOTO et al., 1995) no SN periférico e central. Trabalho publicado pelo grupo de Martins et al sugeriu a possível participação deste digitálico no controle da resposta ao estresse, pois quando foi administrado CRH via intracerebroventricular em camundongos, observou-se um rápido transporte deste neuropeptídeo para a circulação sistêmica, porém na presença de OUA este transporte foi inibido (MARTINS; BANKS; KASTIN, 1997). Além disso, diferentes trabalhos tem demonstrado o envolvimento dos digitálicos, bem como da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase na etiologia de transtornos depressivos (COPPEN et al., 1966; EL-MALLAKH; WYATT, 1995; LOONEY; EL-MALLAKH, 1997; NURNBERGER et al., 1982).

Apesar da OUA ser um glicosídeo cardiotônico, estudos tem comprovado que a OUA age de forma diferente dos cardiotônicos, como por exemplo digoxina e digitoxina. A OUA difere dos outros digitálicos, visto que promove a ativação da NKA, localizada no lado extracelular, levando a liberação de Ca⁺⁺ das reservas intracelulares e consequente ativação de vias de transdução de sinal. Ainda, a OUA é capaz de estimular um efeito cardioprotetor via ativação do fator transcricional NF-κB, e sinalização Src/PI3K (FUERSTENWERTH, 2014). Ademais, a atividade sinalizadora induzida pela OUA intervém em mudanças comportamentais, como por exemplo atividade ansiolítica, melhorando o quadro clínico de pacientes com depressão endógena e demência (FUERSTENWERTH, 2014).

Diante disto, o presente trabalho buscou elucidar os efeitos do tratamento crônico com OUA em ratos submetidos ao protocolo do CUS. A exposição ao CUS induziu aumento nos níveis séricos de corticosterona, na expressão de CRF, CRFR1 e CRFR2 no hipotálamo e hipocampo, estimulou uma neuroinflamação de baixo grau, promoveu redução de proteínas envolvidas na plasticidade sináptica, redução na atividade da NKA, bem como induziu uma redução na memória de longo prazo. Nosso trabalho evidenciou que o tratamento crônico intermitente com OUA modulou os efeitos do estresse em todos esses aspectos avaliados.

Durante o CUS, ocorre uma ativação prolongada ou repetida do eixo HPA, proporcionando mudanças adaptativas de longo prazo, no tônus e na capacidade de resposta do mesmo, levando a um aumento na secreção de ACTH e corticosterona, hipertrofia da glândula adrenal e elevada expressão proteica de CRF e AVP no PVN (HERMAN; ADAMS; PREWITT, 1995; ULRICH-LAI et al., 2006). Nossos dados evidenciaram que o protocolo do CUS produziu um aumento nos níveis séricos de corticosterona, sem alterar os níveis de CRF e ACTH, sendo que o tratamento com OUA reduziu os níveis de corticosterona, figura 5. Entretanto, em modelos de estresse agudo, quando os ratos são desafiados com LPS intraperitoneal, foi observado que o tratamento agudo com OUA não reverte o aumento de corticosterona induzido pelo LPS (KINOSHITA et al., 2014), o que sugere que a OUA é capaz de regular a atividade do eixo HPA apenas em resposta a estímulos estressores crônicos.

O estresse crônico reduz a expressão de receptores GR em regiões límbicas (hipocampo e córtex), prejudicando a retroalimentação negativa induzida pelo glicocorticóide e favorecendo o desenvolvimento da hiperatividade do eixo HPA (GOLDWATER et al., 2009; RADLEY et al., 2008). Ademais, altas concentrações de glicocorticoide reduzem a proliferação e diferenciação neuronal no hipocampo dependente da ativação de GR (ANACKER et al., 2013). Fundamentados nesses achados investigamos o efeito da OUA na expressão de receptores GR. No modelo do CUS observamos que houve uma redução nos níveis de receptores GR no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo, no entanto, apesar do tratamento crônico com OUA ter reduzido os níveis séricos de corticosterona, o mesmo não se relaciona com a modulação nos níveis de receptores GR nas estruturas avaliadas.

O CRH estimula a responsividade ao estresse através da ativação do CRHR1, entretanto a participação do CRHR2 com estresse e ansiedade ainda são uma questão de debate (BALE; VALE, 2004). Nossos dados corroboraram a hipótese de que os animais submetidos ao CUS apresentam aumento na expressão de CRH no hipotálamo, sendo que o tratamento com a OUA reduziu a expressão do CRH no hipotálamo e hipocampo. Além disso, o CUS aumentou a expressão de CRHR1 no hipocampo de animais, que foi revertido pelo tratamento com OUA (Figura 6). Tem sido proposto que, a infusão de CRH no hipocampo age nos receptores CRHR1 potencializando a retenção de memória ao medo, bem como aumenta comportamentos defensivos e de ansiedade (HUNG et al., 1992; RADULOVIC et al., 1999). Ademais, observamos que o tratamento com OUA aumentou a expressão de CRHR2 no hipotálamo de animais submetidos ao CUS, sugerindo assim, que a OUA aumenta a resiliência dos animais frente aos efeitos deletérios do CUS via aumento da expressão de CRHR2, uma vez que tem sido demonstrado que camundongos deficientes nos receptores CRHR2 apresentam uma maior sensibilidade ao estresse e desenvolvimento de ansiedade (BALE et al., 2000). Estudos recentes sugerem que o CRHR2 está envolvido na atenuação da resposta ao estresse biológico, bem como nos sintomas da depressão (HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016).

Além disso, estudo realizado em modelo de camundongo deficiente em CRFR1 na região do PVN, mostrou a importância do CRFR1 na regulação do eixo HPA, na presença de estímulos estressores crônicos, onde observou-se que o estresse crônico induziu um menor efeito ansiogênico nesses animais *knockouts* para CRFR1 (RAMOT et al., 2017). Esses dados suportam nossa hipótese que o tratamento intermitente com OUA regula negativamente a hiperatividade do eixo HPA induzida pelo estresse crônico, por meio da regulação negativa na expressão de CRFR1 no hipotálamo e hipocampo.

Diferentes trabalhos têm relatado que a OUA é um importante regulador da resposta inflamatória, na periferia e SNC (KINOSHITA et al., 2014; LEITE et al., 2015). Além disso, o estresse crônico promove, em seres humanos e animais, um estado inflamatório nos sistemas periférico e central (GOSHEN et al., 2008; GRIPPO et al., 2005; MILLER et al., 2008). Bem como, níveis elevados de glicocorticóides têm sido associados com aumento de células inflamatórias como macrófagos e microglia no SNC (DINKEL; MACPHERSON; SAPOLSKY, 2003). Os resultados aqui apresentados confirmam os dados encontrados na literatura, onde o protocolo de CUS aumenta a produção de IL-1 β e TNF- α no hipotálamo, no entanto, o tratamento com OUA intermitente não interferiu na produção de citocinas induzida pelo CUS, nas estruturas estudadas (Figuras 8 e 9).

Além da participação das citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da neuroinflamação induzida pelo estresse crônico, foi relatado o envolvimento do óxido nítrico no desenvolvimento da ansiedade, onde o tratamento com L-NAME, um inibidor da NOS, reverte o aumento nos níveis de ansiedade induzidos pelo estresse crônico (SEVGI; OZEK; EROGLU, 2006). Por outro lado, outros trabalhos demonstraram o papel da nNOS na hiperatividade do eixo HPA, no qual o aumento da atividade da nNOS no hipocampo induz uma diminuição na expressão de receptores GR no hipotálamo, reduzindo assim a retroalimentação negativa induzida pela corticosterona (ZHOU et al., 2011). Diante disto, investigamos os efeitos do CUS e do tratamento com OUA na atividade da NOS em nosso modelo no hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo, conforme ilustrado nas figuras A, B e C. Observamos que o CUS reduziu a atividade da nNOS, apenas, no córtex pré-frontal, e o tratamento com OUA não interferiu nos níveis de nNOS, indicando assim que os efeitos da OUA no estresse não dependem da ativação da nNOS.

Ademais, a participação da iNOS no desenvolvimento da depressão induzida pelo estresse crônico tem sido observada (WANG; AN; ZHANG, 2008). Nossos resultados mostraram que o CUS aumentou a atividade da iNOS no hipocampo, que foi revertido pelo tratamento intermitente com OUA (Figura 11), assim, podemos concluir que o CUS interfere na imunidade por meio da hiperativação do sistema imunológico, levando a uma inflamação de baixo grau que é revertida pelo tratamento com ouabaína (Figura 11). Além disso, o CUS exacerba a ativação induzida por LPS do fator nuclear NF-κB no córtex frontal e no hipocampo via secreção de glicocorticoide (MUNHOZ, 2006).

O estresse crônico pode aumentar os níveis de ROS, bem como reduzir a atividade de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD) e glutationa (GSH) (BILICI et al., 2001; SCHIAVONE et al., 2013). O desequilíbrio entre a produção de radicais livre e a capacidade antioxidante do organismo tem sido apresentado com um fator importante no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, incluindo a depressão em humanos e roedores (KUMAR; KUHAD; CHOPRA, 2011; MAES et al., 2011). Nosso dados demonstraram que os animais submetidos ao CUS apresentaram uma redução na expressão de enzimas antioxidantes SOD2 e GSH no hipocampo de ratos, no entanto o tratamento com OUA não interferiu na expressão dessas enzimas antioxidantes (Figura 13), apesar de outros trabalhos terem mostrado que o tratamento com OUA reduziu o estresse

oxidativo no hipocampo de ratos em modelo de neuroinflamação induzido por LPS (GARCIA et al., 2018).

A plasticidade sináptica é um fenômeno importante envolvido nas funções de cognição, aprendizado e formação da memória (LANTE et al., 2006; NG et al., 2009). O estresse crônico induz mudanças na estrutura do cérebro e função neuronal, promovendo efeitos deletérios na cognição e comportamento depressivo (BERTON; NESTLER, 2006; WATANABE; GOULD; MCEWEN, 1992). Os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA são canais de sódio que atuam como o principal mediador da transmissão sináptica central. A expressão de receptores AMPA pode ser regulada pela atividade neuronal, sendo crítica para a plasticidade sináptica, tais como potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD). O estresse crônico é capaz de modular negativamente a expressão de receptores AMPA no hipocampo e córtex frontal (KALLARACKAL et al., 2013; SCHMIDT et al., 2010). Nossos dados corroboram com os dados da literatura, pois sugerem que o protocolo de CUS por 14 dias reduziu a expressão de receptores AMPA no córtex pré-frontal, no entanto o tratamento intermitente com OUA não interferiu nos níveis de receptores AMPA no córtex pré-frontal (Figura 14).

As doenças neurodegenerativas, assim como o envelhecimento e o estresse reduzem a atividade da NKA, e a diminuição da atividade desta bomba parece induzir a uma rápida internalização e degradação dos receptores AMPA (BAHR et al., 1992; NICOLETTI et al., 1995; OSSOWSKA et al., 2001). Diante disto, possivelmente, a diminuição da atividade da bomba explicaria a redução nos níveis de receptores AMPA no córtex pré-frontal (Figura 14), porém, apesar do tratamento intermitente com OUA aumentar a atividade da NKA no córtex pré-frontal, não foi capaz de interferir na expressão dos receptores AMPA.

Níveis elevados de PSD95 estão diretamente relacionados a um aumento no número de receptores AMPA nas sinapses (SCHNELL et al., 2002). O estresse crônico reduz os níveis de sinaptofisina no hipocampo (CUNHA et al., 2006), no entanto, como foi observado nos nossos dados, o CUS, bem como o tratamento com OUA não interferiu nos níveis de PSD95 e sinaptofisina nas estruturas avaliadas (Figuras 15 e 16), no entanto no nosso modelo não observamos alterações desta proteína.

Entre os fatores neurotróficos, o BDNF, em neurônios imaturos participa de mecanismos de crescimento, diferenciação, maturação, sobrevivência, bem como desempenha um papel importante na plasticidade sináptica (NUMAKAWA et al.,

2009). Além disso, este fator neurotrófico é altamente expresso no encéfalo adulto participando no processamento e armazenamento da informação (HELDT et al., 2007; MONTEGGIA et al., 2004; PANG; LU, 2004). O estresse crônico ou elevados níveis de glicocorticóide regulam negativamente a via do BDNF (ALLEN; DAWBARN, 2006), visto que, exposições crônicas a corticosterona ou dexametasona são capazes de suprimir a liberação de BDNF a partir de neurônios corticais glutamatérgicos, indicando assim, um possível mecanismo para os impactos negativos do estresse crônico sobre as funções cognitivas (NUMAKAWA et al., 2009). Nossos resultados demonstraram uma redução nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao CUS, revertido pelo tratamento crônico com OUA (Figura 17). Além disso, a OUA também aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e hipotálamo de animais submetidos ao protocolo do CUS (Figura 17). Em 2014, Kinoshita e colaboradores demonstraram que o tratamento agudo com OUA preveniu a redução nos níveis de BDNF induzida por LPS no hipocampo de ratos (KINOSHITA et al., 2014), reforçando nossos achados.

O CREB (cAMP response element binding protein), e outros fatores de transcrição, encontram-se envolvidos na plasticidade sináptica, formação de memória e aprendizado do cérebro adulto (KANDEL, 2001). A fosforilação do CREB pode ativar a transcrição de BDNF. Trabalhos anteriores observaram que o tratamento crônico com glicocorticóide, bem como o estresse crônico moderado pode interferir na sinalização do CREB (FOCKING; HOLKER; TRAPP, 2003; GRONLI et al., 2006). Nosso modelo evidenciou uma redução na ativação do CREB em todas as estruturas analisadas, porém apenas no córtex frontal o resultado foi significativo (Figura 18), corroborando com os efeitos da OUA nos níveis de BNDF nesta estrutura. De fato, o tratamento com OUA reverteu os efeitos negativos induzidos pelo CUS na ativação do CREB. Esses dados estão de acordo com resultados publicados recentemente por nosso grupo, onde foi observado que o tratamento intrahipocampal com OUA 10 nM promoveu a fosforilação do CREB levando ao aumento nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos(ORELLANA et al., 2018). Diante disso, estes resultados sugerem que o tratamento crônico com OUA é capaz de modular positivamente os efeitos deletérios ocasionados pelo estresse crônico na plasticidade sináptica.

Diferentes estudos tem evidenciado alterações na atividade da NKA na etiologia dos transtornos depressivos (COPPEN et al., 1966; EL-MALLAKH; WYATT, 1995; LOONEY; EL-MALLAKH, 1997; NURNBERGER et al., 1982; SHAW, 1966). Além

disso, foi corroborado uma redução na atividade da NKA no hipocampo de ratos submetidos ao estresse crônico (GAMARO et al., 2003; VASCONCELLOS et al., 2003). Goldstein e colaboradores 2006 observaram que pacientes com transtorno bipolar apresentavam níveis elevados de compostos semelhantes a digitálicos quando comparados a indivíduos normais. Além disso, a injeção intracerebroventricular de anticorpos anti-ouabaína, bem como a OUA induz um efeito antidepressivo (GOLDSTEIN et al., 2006). Ademais, a injeção aguda intracerebroventricular de anti-ouabaína, promove alterações nos níveis de catecolaminas e seus metabólitos em diferentes regiões do cérebro associadas ao desenvolvimento da depressão (GOLDSTEIN et al., 2012). Diante disto, torna-se importante para compreender melhor os efeitos da OUA no estresse crônico, investigamos a atividade da NKA.

A exposição ao CUS durante 14 dias promoveu uma redução na atividade das isoformas α2,3 da NKA no córtex pré-frontal, que foi revertida pelo tratamento com OUA (Figura 25). No entanto, não observamos alterações na atividade da NKA no hipocampo dos animais submetidos ao CUS. Interessantemente, o tratamento só com OUA reduziu a atividade da NKA total, bem como das isoformas α2,3 apenas no córtex, não interferindo no hipocampo.

Sabendo que o tratamento crônico com OUA foi capaz de modular os níveis de corticosterona, expressão de CHR, CHRR1, CRHR2, neuroinflamação, atividade da NKA, bem como favoreceu a ativação do fator CREB levando ao aumento do BDNF importante na plasticidade sináptica, em animais submetidos ao protocolo do CUS, buscamos avaliar os efeitos comportamentais decorrentes dessas modulações. O teste de reconhecimento do objeto novo (NOR) tem sido largamente utilizado para investigação de alteração na memória, podendo ser utilizado como um teste, que avalia memória de trabalho, atenção, ansiedade, e preferência por novidade em roedores (GOULART et al., 2010; SILVERS et al., 2007).

As características contextuais e espaciais, bem como a consolidação da memória no teste de reconhecimento do objeto novo, requerem a participação de diferentes regiões do cérebro (OLIVEIRA et al., 2010). Tem sido observada, uma integração entre o córtex perirrinal e o hipocampo, onde o hipocampo recebe informações envolvidas no reconhecimento de objeto, tais como, visual, olfativo e estímulos somatossensoriais do córtex perirrinal (CLARKE et al., 2010). Além disso, o córtex perirrinal está envolvido no reconhecimento de objetos após curtos intervalos, e o hipocampo pelo reconhecimento a longo prazo (REGER; HOVDA; GIZA, 2009). O

córtex pré-frontal medial, também tem sido relacionado em lembrar informações sobre um determinado lugar ou tempo no teste de reconhecimento de objeto novo (BARKER et al., 2007). Nosso trabalho demonstrou que os animais expostos por 14 dias ao protocolo do CUS apresentaram um prejuízo na formação de memória de longo prazo e o tratamento com OUA reverteu o efeito ocasionado pelo CUS, esse efeito talvez deva-se ao fato de a OUA modular positivamente receptores NMDA levando a ativação de NF-kB em neurônios(KAWAMOTO et al., 2012). Além disso, uma intima relação entre os genes de ativação imediata (IEGs) e atividade neuronal, em processos de aprendizagem e formação de memória tem sido demonstrado na literatura (DUCLOT; KABBAJ, 2017), entre eles o fator de transcrição 1 (EGR1) foi relacionado como um importante mediador e regulador da plasticidade sináptica e atividade neuronal, tanto em condições patológicas, quanto fisiológicas (DUCLOT; KABBAJ, 2017). Estudos tem demonstrado que o estresse crônico é capaz de reduzir a expressão de Egr1 em neurônios corticais (MATSUMOTO et al., 2012), e nossos resultados demonstraram que os animais submetidos ao CUS apresentaram uma diminuição da expressão de Egr1, no hipocampo, entretanto, o tratamento com OUA não interferiu na expressão de Egr1 induzido pelo estresse, demonstrado assim, que a consolidação da memória dos animais tratados com OUA e submetidos ao CUS é independente da expressão de Egr1. Interessantemente, Orellana e colaboradores 2018, mostraram que o tratamento intrahipocampal com OUA 10 nM promoveu ativação de fatores neurotróficos, como BDNF levando a um aumento na ramificação dendrítica na região do giro dentado e CA1, culminando com um aprimoramento na memória espacial que foi demonstrada no teste comportamental do labirinto aquático de Morris. Esses resultados endossam nossos resultados, visto que observamos que o tratamento intermitente e periférico com OUA promoveu um resgate na memória de animais submetidos ao CUS possivelmente via modulação de CREB-BDNF (ORELLANA et al., 2018).

Em relação a memória de medo, os modelos experimentais clássicos de condicionamento ao medo, baseado na aquisição e a extinção da memória de medo, são modelos importantes para a compreensão da fisiopatologia do estresse e transtornos relacionados a ansiedade. O condicionamento ao medo e o estresse compartilham circuitos neuronais comuns, como ativação do eixo HPA, liberação de glicocorticoide e CRH. Acredita-se que a incapacidade de inibir a resposta ao medo forneça uma manutenção dos transtornos de ansiedade (DELGADO; OLSSON;

PHELPS, 2006; LISSEK et al., 2005). Nossos resultados mostraram que todos os grupos desenvolveram uma consolidação da resposta ao medo. No entanto, observamos que os animais tratados com OUA, o grupo submetido ao CUS, bem como os tratados com OUA e submetidos ao CUS, apresentaram uma rápida extinção da memória ao medo, esse resultado é intrigante, visto que demonstra uma adaptação dos animais submetidos ao CUS. Interessantemente, em um modelo de camundongo transgênico onde ocorre um aumento na expressão de CRH na amígdala e no núcleo paraventricular do hipotalâmico, os camundongos mostraram uma deficiência na extinção do medo condicionado e níveis mais elevados de cortisol no plasma, além disso, os déficits foram tratados com sucesso pela infusão sistêmica e local de um antagonista de CRH (GAFFORD et al., 2012).

Esses achados sugerem que o tratamento intermitente com OUA promove uma rápida extinção da memória por interferir na expressão do CRH-CRHR1-CRHR2, visto que a OUA reduziu a expressão de CRH e CRHR1, além de aumentar a expressão de CRHR2.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados em conjunto podem concluir que o tratamento intermitente com OUA é eficiente em reverter a hiperatividade do eixo HPA induzido pelo CUS, por meio da redução de glicocorticoide, redução na expressão de CRH-CRHR1, aumento do CRHR2, bem como diminuir a neuroinflamação de baixo grau induzido pelo CUS, e aumentar os níveis de BDNF. Essas alterações bioquímicas contribuíram para uma reversão nos prejuízos na memória de longo prazo induzida pelo CUS. Além disso, concluímos que o CUS, bem como o tratamento apenas com OUA promovem uma melhora na memória emocional, que foi constatado no teste comportamental de condicionamento da memória ao medo, estes resultados sugerem que o protocolo do CUS de 14 dias promove uma adaptação neuronal levando a redesignação da memória ao medo, aqui configurado pelo choque, e o tratamento com a OUA abrevia esse processo.



Figura 27 - Figura ilustrativa das conclusões do estudo.

O protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS) promoveu uma hiperatividade do eixo HPA, com redução na expressão de GR, aumento na expressão de CRH, aumento nos níveis de corticosterona, aumento na atividade da iNOS e da NKA, estes efeitos bioquímicos foram refletidos em prejuízos na memória no teste de reconhecimento do objeto novo. Porém o CUS promoveu uma melhora na memória emocional dos animais. O tratamento intermitente com Ouabaína reverte os efeitos do estresse crônico imprevisível (CUS) via redução na expressão de CRH-CRHR1, aumento da atividade de NKA, redução na atividade da iNOS, aumento da via CREB-BDNF e dos níveis dos receptores CRH2, promovendo uma melhora na memória de longo prazo e emocional dos animais, possivelmente pela modulação das vias propostas assim como pela diminuição dos níveis de glicocorticoide.

REFERÊNCIAS

ABRAMOWITZ, J. et al. Ouabain- and Marinobufagenin-Induced Proliferation of Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells and a Rat Vascular Smooth Muscle Cell Line, A7r5. Circulation, 2003.

AIZMAN, O.; APERIA, A. Na,K-ATPase as a signal transducer. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 986, p. 489–496, abr. 2003.

ALLEN, S. J.; DAWBARN, D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. Clinical science (London, England : 1979), v. 110, n. 2, p. 175–191, fev. 2006.

ANACKER, C. et al. Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 38, n. 5, p. 872–883, abr. 2013.

ANDRADE, L. H. et al. Mental disorders in megacities: findings from the Sao Paulo megacity mental health survey, Brazil. PloS one, v. 7, n. 2, p. e31879, 2012.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive processing, v. 13, n. 2, p. 93–110, maio 2012.

BAHR, B. A. et al. Mouse telencephalon exhibits an age-related decrease in glutamate (AMPA) receptors but no change in nerve terminal markers. Brain research, v. 589, n. 2, p. 320–326, set. 1992.

BALE, T. L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. Nature genetics, v. 24, n. 4, p. 410–414, abr. 2000.

BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF AND CRF R ECEPTORS : Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2004.

BARKER, G. R. I. et al. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 27, n. 11, p. 2948–2957, mar. 2007.

BARNUM, C. J. et al. Psychological stress in adolescent and adult mice increases neuroinflammation and attenuates the response to LPS challenge. Journal of neuroinflammation, v. 9, p. 9, jan. 2012.

BARWE, S. P. et al. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. Molecular biology of the cell, v. 16, n. 3, p. 1082–1094, mar. 2005.

BELDA, X. et al. Exposure to severe stressors causes long-lasting dysregulation of

resting and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Annals of the New York Academy of Sciences. Anais...2008

BERSIER, M. G.; RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G. Intracerebroventricular administration of ouabain to rats changes the expression of NMDA receptor subunits in cerebral cortex and hippocampus. Neurochemical research, v. 34, n. 9, p. 1650–1657, set. 2009.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. Nature Reviews Neuroscience, 2006.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses Endocrine Reviews, 1996.

BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: Alterations by antidepressant treatments. Journal of Affective Disorders, 2001.

BITTENCOURT, J. C. et al. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. The Journal of comparative neurology, v. 415, n. 3, p. 285–312, dez. 1999.

BLANK, T. et al. Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2003.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. The American journal of physiology, 1993.

BOORSE, G. C.; DENVER, R. J. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. General and comparative endocrinology, v. 146, n. 1, p. 9–18, mar. 2006.

BOYLE, M. P. et al. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. Neuron, 1994.

CEREIJIDO, M. et al. The Na⁺-K⁺-ATPase as self-adhesion molecule and hormone receptor. American journal of physiology. Cell physiology, v. 302, n. 3, p. C473-81, fev. 2012.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. ENDOCRINOLOGY OF THE STRESS RESPONSE 1. Annu. Rev. Physiol, 2005.

CHESNOKOVA, V.; MELMED, S. Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. Endocrinology, v. 143, n. 5, p. 1571–1574, maio 2002.

CHIAVEGATTO, S. et al. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001.

CHO, D.-H. H. et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. Science, 2009.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 6, p. 2652–2657, fev. 2010.

COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; MILLER, G. E. Psychological stress and disease. JAMA, v. 298, n. 14, p. 1685–1687, out. 2007.

COPPEN, A. et al. Mineral metabolism in mania. British medical journal, v. 1, n. 5479, p. 71–75, jan. 1966.

CUNHA, G. M. A. et al. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. Neuroscience, v. 141, n. 4, p. 1775–1781, set. 2006.

DE KLOET, E. R. et al. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocrine Reviews, 1998.

DE KLOET, E. R. et al. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA. Brain Research, 2009.

DE SA LIMA, L. et al. Ouabain activates NFkappaB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. Neuropharmacology, v. 73, p. 327–336, out. 2013.

DELGADO, M. R.; OLSSON, A.; PHELPS, E. A. Extending animal models of fear conditioning to humans. Biological psychology, v. 73, n. 1, p. 39–48, jul. 2006.

DINKEL, K.; MACPHERSON, A.; SAPOLSKY, R. M. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. Journal of Neurochemistry, 2003.

DUCLOT, F.; KABBAJ, M. The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2017.

EL-MALLAKH, R. S.; WYATT, R. J. The Na,K-ATPase hypothesis for bipolar illness. Biological psychiatry, v. 37, n. 4, p. 235–244, fev. 1995.

ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺,K⁺-ATPase: molar and specific activity, protein determination. Methods in enzymology, v. 156, p. 105–115, 1988.

FERRANDI, M. et al. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: Comparison of two independent assays. Hypertension, 1997.

FESCHENKO, M. S.; SWEADNER, K. J. Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. The Journal of biological chemistry, v. 269, n. 48, p. 30436–30444, dez. 1994.

FOCKING, M.; HOLKER, I.; TRAPP, T. Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. Biochemical and biophysical

research communications, v. 304, n. 4, p. 720–723, maio 2003.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Chronic social stress: Effects on limbic brain structures. Physiology and Behavior. Anais...2003

FUERSTENWERTH, H. On the differences between ouabain and digitalis glycosides. American journal of therapeutics, v. 21, n. 1, p. 35–42, 2014.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. Pharmacological reports : PR, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013.

GAFFORD, G. M. et al. Cell-type specific deletion of GABA(A)alpha1 in corticotropinreleasing factor-containing neurons enhances anxiety and disrupts fear extinction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 40, p. 16330–16335, out. 2012.

GAMARO, G. D. et al. Reduction of hippocampal Na+, K+-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. Neurochemical research, v. 28, n. 9, p. 1339–1344, set. 2003.

GARCIA, I. J. P. et al. Ouabain attenuates oxidative stress and modulates lipid composition in hippocampus of rats in lipopolysaccharide-induced hypocampal neuroinflammation in rats. Journal of cellular biochemistry, set. 2018.

GILLESPIE, C. F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. Psychosomatic Medicine, 2005.

GOLDSTEIN, I. et al. Involvement of Na(+), K(+)-ATPase and endogenous digitalislike compounds in depressive disorders. Biological psychiatry, v. 60, n. 5, p. 491–499, set. 2006.

GOLDSTEIN, I. et al. Association Between Sodium- and Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase α Isoforms and Bipolar Disorders. Biological Psychiatry, 2009.

GOLDSTEIN, I. et al. Neutralization of endogenous digitalis-like compounds alters catecholamines metabolism in the brain and elicits anti-depressive behavior. European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, v. 22, n. 1, p. 72–79, jan. 2012.

GOLDWATER, D. S. et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. Neuroscience, v. 164, n. 2, p. 798–808, dez. 2009.

GOSHEN, I. et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. Molecular psychiatry, v. 13, n. 7, p. 717–728, jul. 2008.

GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. Frontiers in neuroendocrinology, v. 30, n. 1, p. 30–45, jan. 2009.

GOTO, A. et al. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. Pharmacological reviews, v. 44, n. 3, p. 377–399, set. 1992.

GOTO, A. et al. Stress-induced elevation of ouabainlike compound in rat plasma and adrenal. Hypertension (Dallas, Tex.: 1979), v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1173–1176, dez. 1995.

GOULART, B. K. et al. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. Neuroscience, v. 167, n. 4, p. 969–973, jun. 2010.

GRANT, B. F. et al. Prevalence, correlates, co-morbidity, and comparative disability of DSM-IV generalized anxiety disorder in the USA: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Psychological medicine, v. 35, n. 12, p. 1747–1759, dez. 2005.

GRIPPO, A. J. et al. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stressinduced anhedonia. Physiology & behavior, v. 84, n. 5, p. 697–706, abr. 2005.

GRONLI, J. et al. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. Pharmacology, biochemistry, and behavior, v. 85, n. 4, p. 842–849, dez. 2006.

HAMLYN, J. M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. Biochemistry, 1991.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. Journal of immunological methods, v. 119, n. 2, p. 203–210, maio 1989.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. Molecular psychiatry, v. 12, n. 7, p. 656–670, jul. 2007.

HENCKENS, M. J. A. G.; DEUSSING, J. M.; CHEN, A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. Nature reviews. Neuroscience, v. 17, n. 10, p. 636–651, out. 2016.

HERMAN, J. P.; ADAMS, D.; PREWITT, C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. Neuroendocrinology, v. 61, n. 2, p. 180–190, fev. 1995.

HUANG, B. S.; LEENEN, F. H. Brain "ouabain" and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. Hypertension (Dallas, Tex.: 1979), v. 28, n. 6, p. 1005–1012, dez. 1996.

HUNG, H. C. et al. CRF increases protein phosphorylation and enhances retention performance in rats. Neuroreport, v. 3, n. 2, p. 181–184, fev. 1992.

ITOI, K. et al. Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in conscious rats. Endocrinology, 1994.

JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. Psychopharmacology, 2006.

KAGEYAMA, K. et al. Cytokines induce NF-κB, Nurr1 and corticotropin-releasing factor gene transcription in Hypothalamic 4B cells. NeuroImmunoModulation, 2010.

KALLARACKAL, A. J. et al. Chronic stress induces a selective decrease in AMPA receptor-mediated synaptic excitation at hippocampal temporoammonic-CA1 synapses. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 33, n. 40, p. 15669–15674, out. 2013.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science (New York, N.Y.), v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, nov. 2001.

KAWAMOTO, E. M. et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-kappaB in the rat hippocampus. Journal of neuroscience research, v. 90, n. 1, p. 213–228, jan. 2012.

KINOSHITA, P. F. et al. Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. Journal of neuroinflammation, v. 11, p. 218, dez. 2014.

KOMETIANI, P. et al. Multiple signal transduction pathways link Na+/K+-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. The Journal of biological chemistry, v. 273, n. 24, p. 15249–15256, jun. 1998.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: Behavioral and biochemical evidences. Psychopharmacology, 2011.

LANTE, F. et al. Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. Hippocampus, v. 16, n. 4, p. 345–360, 2006.

LAREDO, J.; HAMILTON, B. P.; HAMLYN, J. M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. Endocrinology, v. 135, n. 2, p. 794–797, ago. 1994.

LEITE, J. A. et al. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. Mediators of inflammation, v. 2015, p. 265798, 2015.

LIGHTMAN, S. L. et al. The significance of glucocorticoid pulsatilityEuropean Journal of Pharmacology, 2008.

LISSEK, S. et al. Classical fear conditioning in the anxiety disorders: a meta-analysis. Behaviour research and therapy, v. 43, n. 11, p. 1391–1424, nov. 2005.

LIU, L. et al. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, v. 287, n. 5, p. H2173-82, nov. 2004.

LIU, X.-L. et al. Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. Scientific reports, v. 5, p. 16024, nov. 2015.

LOONEY, S. W.; EL-MALLAKH, R. S. Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. Depression and anxiety, v. 5, n. 2, p. 53–65, 1997.

LUCCA, G. et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. Neurochemistry International, 2009.

MACPHERSON, A.; DINKEL, K.; SAPOLSKY, R. Glucocorticoids worsen excitotoxininduced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. Experimental Neurology, 2005.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illnessProgress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011.

MAJZOUB, J. A. Corticotropin-releasing hormone physiology. European Journal of Endocrinology, 2006.

MARQUES, A. H.; SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Glucocorticoid dysregulations and their clinical correlates: From receptors to therapeutics. Annals of the New York Academy of Sciences. Anais...2009

MARTINS, J. M.; BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Acute modulation of active carriermediated brain-to-blood transport of corticotropin-releasing hormone. The American journal of physiology, v. 272, n. 2 Pt 1, p. E312-9, fev. 1997.

MATSUMOTO, K. et al. Social isolation stress down-regulates cortical early growth response 1 (Egr-1) expression in mice. Neuroscience research, v. 73, n. 3, p. 257–262, jul. 2012.

MCKEE, M.; SCAVONE, C.; NATHANSON, J. A. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, n. 25, p. 12056–12060, dez. 1994.

MILLER, G. E. et al. A functional genomic fingerprint of chronic stress in humans: blunted glucocorticoid and increased NF-kappaB signaling. Biological psychiatry, v. 64, n. 4, p. 266–272, ago. 2008.

MOHN, C. E. et al. Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. Stress, 2011.

MONTEGGIA, L. M. et al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, n. 29, p. 10827–10832, jul. 2004.

MORENO-LÓPEZ, B. et al. Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis1. Brain Research, 2000.

MUNHOZ, C. D. Chronic Unpredictable Stress Exacerbates Lipopolysaccharide-Induced Activation of Nuclear Factor- B in the Frontal Cortex and Hippocampus via Glucocorticoid Secretion. Journal of Neuroscience, 2006.

MUNHOZ, C. D. et al. Glucocorticoids Exacerbate Lipopolysaccharide-Induced Signaling in the Frontal Cortex and Hippocampus in a Dose-Dependent Manner. Journal of Neuroscience, 2010.

NADEAU, S.; RIVEST, S. Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2003.

NG, W. X. D. et al. Neurobiological evidence for thalamic, hippocampal and related

glutamatergic abnormalities in bipolar disorder: a review and synthesis. Neuroscience and biobehavioral reviews, v. 33, n. 3, p. 336–354, mar. 2009.

NICOLETTI, V. G. et al. AMPA-selective glutamate receptor subunits in the rat hippocampus during aging. Journal of neuroscience research, v. 40, n. 2, p. 220–224, fev. 1995.

NUMAKAWA, T. et al. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNFtriggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 2, p. 647–652, jan. 2009.

NURNBERGER, J. J. et al. Red cell ouabain-sensitive Na+-K+-adenosine triphosphatase: a state marker in affective disorder inversely related to plasma cortisol. Biological psychiatry, v. 17, n. 9, p. 981–992, set. 1982.

O'DONOVAN, M. C. et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. Nature Genetics, 2008.

OLIVEIRA, A. M. M. et al. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.), v. 17, n. 3, p. 155–160, mar. 2010.

ORELLANA, A. M. et al. Ouabain increases neuronal branching in hippocampus and improves spatial memory. Neuropharmacology, v. 140, p. 260–274, set. 2018.

OSSOWSKA, K. et al. Decline in motor functions in aging is related to the loss of NMDA receptors. Brain research, v. 907, n. 1–2, p. 71–83, jul. 2001.

PAAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. Annals of medicine, v. 27, n. 3, p. 369–377, jun. 1995.

PALUMBO, M. L. et al. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. Journal of neurochemistry, v. 102, n. 1, p. 261–274, jul. 2007.

PANG, P. T.; LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. Ageing research reviews, v. 3, n. 4, p. 407–430, nov. 2004.

PAPADIMITRIOU, A.; PRIFTIS, K. N. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axisNeuroImmunoModulation, 2009.

PEEN, J. et al. The current status of urban-rural differences in psychiatric disorders. Acta psychiatrica Scandinavica, v. 121, n. 2, p. 84–93, fev. 2010.

PENG, M. et al. Partial inhibition of Na+/K+-ATPase by ouabain induces the Ca2+dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. The Journal of biological chemistry, v. 271, n. 17, p. 10372–10378, abr. 1996.

RADLEY, J. J. et al. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. The Journal of comparative neurology, v. 507, n. 1, p. 1141–1150, mar. 2008.

RADULOVIC, J. et al. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 19, n. 12, p. 5016–5025, jun. 1999.

RAMOT, A. et al. Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. Nature neuroscience, v. 20, n. 3, p. 385–388, mar. 2017.

REGER, M. L.; HOVDA, D. A.; GIZA, C. C. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. Developmental psychobiology, v. 51, n. 8, p. 672–678, dez. 2009.

ROOZENDAAL, B. et al. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousalinduced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, n. 17, p. 6741– 6746, abr. 2006.

SCHESCHOWITSCH, K.; LEITE, J. A.; ASSREUY, J. New insights in glucocorticoid receptor signaling-more than just a ligand-binding receptorFrontiers in Endocrinology, 2017.

SCHIAVONE, S. et al. Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology. Antioxidants & Redox Signaling, 2013.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. Behavioural pharmacology, v. 18, n. 5–6, p. 391–418, set. 2007.

SCHMIDT, M. V et al. Individual stress vulnerability is predicted by short-term memory and AMPA receptor subunit ratio in the hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 30, n. 50, p. 16949–16958, dez. 2010.

SCHNELL, E. et al. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 99, n. 21, p. 13902–13907, out. 2002.

SCHONER, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association, v. 108, n. 7, p. 449–454, 2000.

SEVGI, S.; OZEK, M.; EROGLU, L. L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behavior in rats exposed to restraint stress. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology, v. 28, n. 2, p. 95–99, mar. 2006.

SHAW, D. M. Mineral metabolism, mania, and melancholia. British medical journal, v. 2, n. 5508, p. 262–267, jul. 1966.

SHINKAI, T. et al. Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia. Molecular Psychiatry, 2002.

SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: From HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. SILVERS, J. M. et al. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. Journal of neuroscience methods, v. 166, n. 1, p. 99–103, out. 2007.

SUGAMA, S. et al. Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. Journal of Neuroimmunology, 2009.

SUGAMA, S. et al. Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress. Neuroscience, 2013.

TAMASHIRO, K. L. K.; NGUYEN, M. M. N.; SAKAI, R. R. Social stress: from rodents to primates. Frontiers in neuroendocrinology, v. 26, n. 1, p. 27–40, abr. 2005.

TAO, X. et al. Ca2+ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. Neuron, v. 20, n. 4, p. 709–726, abr. 1998.

TER HEEGDE, F.; DE RIJK, R. H.; VINKERS, C. H. The brain mineralocorticoid receptor and stress resiliencePsychoneuroendocrinology, 2015.

TIAN, J. et al. Binding of Src to Na+/K+-ATPase forms a functional signaling complex. Molecular biology of the cell, v. 17, n. 1, p. 317–326, jan. 2006.

TIAN, J.; GONG, X.; XIE, Z. Signal-transducing function of Na+-K+-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca2+]i in rat cardiac myocytes. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, v. 281, n. 5, p. H1899-907, nov. 2001.

TSANKOVA, N. M. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. Nature Neuroscience, 2006.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. Journal of Psychosomatic Research. Anais...2002

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action. Physiological Reviews, 1999.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, v. 291, n. 5, p. E965-73, nov. 2006.

VALE, W. et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. Science, 1981.

VASCONCELLOS, A. P. S. et al. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. Physiology & behavior, v. 79, n. 2, p. 143–149, jul. 2003.

WANG, D.; AN, S. C.; ZHANG, X. Prevention of chronic stress-induced depressionlike behavior by inducible nitric oxide inhibitor. Neuroscience letters, v. 433, n. 1, p. 59–64, mar. 2008.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. Hippocampal neurogenesis: Opposing effects of stress and antidepressant treatment Hippocampus, 2006.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. Brain Research, 1992.

WOHLEB, E. S. et al. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. Nature reviews. Neuroscience, v. 17, n. 8, p. 497–511, ago. 2016.

WONG, M. L. et al. Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary. Molecular psychiatry, v. 1, n. 4, p. 307–312, set. 1996.

XIE, Z.; ASKARI, A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. European journal of biochemistry, v. 269, n. 10, p. 2434–2439, maio 2002.

YOU, Z. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. Behavioural brain research, v. 225, n. 1, p. 135–141, nov. 2011.

YOUNG, E. A.; ABELSON, J.; LIGHTMAN, S. L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. Front Neuroendocrinol, 2004.

YUEN, E. Y. et al. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. Neuron, v. 73, n. 5, p. 962–977, mar. 2012.

ZHANG, J. et al. Neuronal Nitric Oxide Synthase Alteration Accounts for the Role of 5-HT1A Receptor in Modulating Anxiety-Related Behaviors. Journal of Neuroscience, 2010.

ZHANG, S. et al. Distinct role of the N-terminal tail of the Na,K-ATPase catalytic subunit as a signal transducer. The Journal of biological chemistry, v. 281, n. 31, p. 21954–21962, ago. 2006.

ZHOU, L.; ZHU, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. Nitric Oxide, 2009.

ZHOU, Q.-G. et al. Hippocampal Neuronal Nitric Oxide Synthase Mediates the Stress-Related Depressive Behaviors of Glucocorticoids by Downregulating Glucocorticoid Receptor. Journal of Neuroscience, 2011.

ZIEGLER, D. R. Neurocircuitry of Stress Integration: Anatomical Pathways Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis of the Rat. Integrative and Comparative Biology, 2002.

Anexo I – Manuscrito proveniente do trabalho realizado durante o estágio BEPE no Departamento de Biomedicina da Universidade de Aarhus, Dinamarca, sob a orientação da profa. Dra. Karin Lykke-Hartmann.

LPS-induced neuroinflammation requires full in vivo activity of the α_2 Na/K+-ATPase

Leite, JA¹, Isaksen, TJ²; Heuck A², Scavone, C¹, Lykke-Hartmann, K^{2,3,4.*}.

¹Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark

³Department of Clinical Medicine, DK-8000 Aarhus C, Aarhus University, Denmark

⁴Department of Clinical Genetics, DK-8200 Aarhus N, Aarhus University Hospital, Denmark

*Corresponding author:

Lykke-Hartmann, K, Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark

ABSTRACT

The astrocyte-enriched $\alpha 2Na^{+}/K^{+}$ -ATPase is an integral plasma membrane protein responsible for maintaining Na⁺ and K⁺ gradients across cellular membranes supporting vital cellular functions. Missense mutations in the \Box_2 isoform cause a subtype of migraine wit aura. Additionally, loss-of-function of the $\alpha_2.Na^{+}/K^{+}$ -ATPase is associated to reduction of inflammatory response and neurodegeneration, however, the mechanisms for this is unclear. Here we show that mice heterozygous for the α_2 isoform ($\alpha_2^{+/G301R}$) exert a reduced systemic production of proinflammatory cytokines induced by LPS. In addition, LPS injection reduced the synthesis of *TNF-* α , *IL-1* β and *IL-*6 in hypothalamus and hippocampus, accompanied with a distinct hypothermic reaction. Moreover, $\alpha_2^{+/G301R}$ mice increases antioxidant enzymes expression in hippocampus. Our results show that $\alpha_2.Na^+/K^+$ -ATPase haploinsufficiency negatively modulate LPS-induced activation of the innate immune system, and that the Na⁺/K⁺-ATPase is a critical component of the immune system. These data advance our understanding of how the $\alpha_2.Na^+/K^+$ -ATPase isoform regulate inflammation and promote cytokines during neuroinflammation.

Introduction

Familial Hemiplegic Migraine Type-2 (FHM2) is a rare subtype of migraine with motor aura, and in severe cases have been accompanied with symptoms such as epileptic seizures, progressive cerebellar ataxia, coma and fever (DUCROS et al., 1997; THOMSEN et al., 2002). Rarer manifestations such as psychiatric disorders (depression, borderline personality, and obsessive-compulsive disorder), obesity, dystonic posturing and anxiety also manifest(BARRETT et al., 2008; BOTTGER; DOGANLI; LYKKE-HARTMANN, 2012; FERRARI et al., 2015). FMH2 is associated haploinsufficiency in the ATP1A2 encoding the α_2 - Na⁺/K⁺-ATPase isoform present in glia cells (DE FUSCO et al., 2003).

The transmembrane Na⁺/K⁺-ATPase is an ion-pump located at the plasma membrane of all mammalian cells. It transports three Na⁺ ions out of the cell and two K⁺ ions into the cell utilizing energy from ATP hydrolysis (SKOU, 1957). General Na⁺/K⁺-ATPase activity is crucial for multiple cellular functions such as maintaining resting membrane potential, regulating cellular volume, regulating pH and driving the secondary active transport (BLANCO; MERCER, 1998; DOBRETSOV; STIMERS, 2005; GLOOR, 1997). Hovewer, regulated and specialized pump activity is important for normal brain function, differential expressive relationship between α_1 , α_2 and α_3 isoforms in the CNS reflects the complex neurological disorders caused by mutations in both *ATP1A2* and *ATP1A3* (BOTTGER; DOGANLI; LYKKE-HARTMANN, 2012; HEINZEN et al., 2014; ISAKSEN; LYKKE-HARTMANN, 2016).

In the adult brain, the α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase is expressed in astrocytes, being important for removing glutamate and K⁺ from the synaptic cleft, during the neuronal activity (D'AMBROSIO; GORDON; WINN, 2002; JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003; RANSOM; RANSOM; SONTHEIMER, 2000). Importantly, the α_2/β_2 complex appears to be the main Na⁺/K⁺-ATPase constellation involved in the astrocytic K⁺ clearance (LARSEN et al., 2014). In support of this, it was shown that mice harboring the G301R disease-mutation that cause haploinsufficiency presented relevant behavioural characteristics such as depressed mood, obsessive compulsive disorder and anhedonia, of relevance to FHM2 (BOTTGER et al., 2016), which was associated with impaired glutamate uptake in hippocampal mixed astrocyte-neuron cultures from $\alpha_2^{G301R/G301R}$ E17 embryonic mice (BOTTGER et al., 2016).

Astrocytes are important glial cells involved in the preservation of brain homeostasis, such as, formation, maintenance of synapses and control neurotransmitter levels (CLARKE et al., 2010). In addition, damage stimuli cause astrocytes to become reactive, which is important for neuronal protection (SOFRONIEW, 2009). Neuroinflammation is associated with neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (RANSOHOFF, 2016). Lipopolysaccharide (LPS) is a bacterial Gram-negative membrane element that induces inflammation via toll-like receptor 4 (TLR4) (GLAROS et al., 2013). Different studies in rodents showed that LPS administration induces NF-KB activation and pro-inflammatory genes in different brain areas, associated with impaired cognitive performance (KAWAMOTO et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2014).

The Na⁺/K⁺ pump exerts multiple effects in all cells in the body, and therefore, Na⁺/K⁺-ATPase deficiency has been implicated in ischemia, brain injury, depression and mood disorders, mania, stress, AD, PD, learning and memory, and neuronal hyperexcitability and epilepsy. Thus, the Na⁺/K⁺-ATPase appears essential in neurodegenerative disorders associated with neuroinflammation. In line with this, a previous study showed that knockdown of α_2 Na⁺/K⁺-ATPase in mutant SOD1 astrocytes protected motor neurons from degeneration and increased the lifespan of mutant SOD1 mice (GALLARDO et al., 2014). Interestingly, it was shown that Ifenprodil, an NMDA receptor antagonist, restores GDNF-evoked Ca²⁺ transients attenuated by LPS which involved induced Na+/K+-ATPase expression (LUNDBORG et al., 2011). However, it is unclear how the Na⁺/K⁺-ATPase pump contributees to regulation of neuroinflammation.

Here we describe the specific function of the α_2 Na+/K+-ATPase as a regulator of neuroinflammation in the CNS. Haploinsufficiency of the α_2 isoform inhibits neuroinflammation in hypothalamus and hippocampus of LPS-treated mice. This was determined by reduction the production of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6. Interestingly, besides inhibiting the systemic production of TNF- α , IL-6 and IFN- γ

that is normally induced by LPS, we found that $\alpha_2^{+/G301R}$ mice exhibited a less hypothermic response induced by LPS administration.

Results

α₂Na⁺/K⁺-ATPase haploinsufficiency protects against liposaccharide (LPS)induced inflammation *in vivo*

To investigate the importance of α_2 Na+/K+-ATPase as a model for neuroinflammation, $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ WT littermates were injected with peritoneally with LPS, known to induce neuroinflammation and expression of pro-inflammatory cytokines (NGUYEN; JULIEN; RIVEST, 2002; QIN et al., 2007). Surprisingly and in contrast to WI littermates, $\alpha_2^{+/G301R}$ display much less sickness after LPS (movie 1 and 2) (Fig. 1a), and while WT mice only exhibited a severe drop in body temperature (maybe measure actual body temperature here (+/-)), $\alpha_2^{+/G301R}$ displayed less hypothermia (maybe measure actual body temperature here (+/-)) (Fig. 1b).

Previously, cytokines TNF, IL-6 and IL-10 were significantly upregulated in the lesioned spinal cord of $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice compared to naïve conditions, however, we observed no statistical differences between the two genotypes (ELLMAN et al., 2017). IL-1 β appeared to display a tendency to be upregulated (ELLMAN et al., 2017). To evaluate if levels of cytokines were altered in mice treated with LPS, systemic injection of LPS was administrated peritoneally. Significantly increased serum TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ levels were noted in LPS-treated $\alpha_2^{+/+}$ mice compared to saline-treated $\alpha_2^{+/+}$ mice (Fig. 1c, d, e and f). In contrast, LPS-treated $\alpha_2^{+/G301R}$ mice had significantly reduced serum levels of TNF- α (Fig. 1c), IL-6 (Fig. 1e) and IFN- γ (Fig. 1f) compared to saline-treated $\alpha_2^{+/+}$ mice. The levels of IL-1 β in LPS-treated $\alpha_2^{+/G301R}$ mice were equal to LPS-treated $\alpha_2^{+/+}$ mice (Fig. 1d).

α₂Na⁺/K⁺-ATPase is not required for macrophage-induced cytokine expression

To test the effects of the \Box_2 isoform-containing Na⁺/K⁺-ATPase on the release of TNF- α , bone marrow-derived macrophages (BMDM) were isolated from both WT and $\alpha_2^{+/G301R}$ mice. Cells were treated with the TLR4 antagonist LPS. In both WT and
$\alpha_2^{+/G301R}$ BMDMs, TNF- α were secreted in response to LPS at times tested (1, 2, 4 and 6 hours post-LPS administration) (Fig. 2a, b, c, and d). We speculated that maybe the \Box_2 isoform is not present in macrophages due to the response of TNF- α after LPS treatments, in contrast to reduced TNF- α in the serum post LPS treatment. To test this, Western blotting with BMDM cell extracts obtained in different days (0, 4, 5 and 6) during the development of BMDMs. This revealed that there was no differences in α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase isoform expression in BMDM cells from $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ (Fig. 2e). These dates suggest that the α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase isoform is not important in macrophages' response to LPS.

LPS-induced neuroinflammation is suppressed in hippocampus and hypothalamus from heterozygous $\alpha_2^{+/G801R}$ mice

As a next step, we examined hippocampus and hypothalamus due to their roles in cognition, which is known to be altered upon neuroinflammation and body temperature control, respectively. Total protein samples were submitted to Western blot analysis to assess the level of the α_2 isoform. No differences were detected in the α_1 isoform in both structures studied (Fig. 3a and 3c). In addition, our results show that α_2 isoform levels were significantly reduced in hippocampus in $\alpha_2^{+/G301R}$ mice compared with $\alpha_2^{+/+}$ (Fig. 3d). However, no significant changes were observed in the levels of α_2 isoform between $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice in the hypothalamus (Fig. 3b). Moreover, it was observed that LPS injection did not influence levels of α_1 (Fig. 3a, c) and α_2 (Fig. 3b, d) proteins in hippocampus and hypothalamus of both $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ animals.

Interestingly, LPS treatment significantly upregulated the transcription of the *TNF-a*, *IL-1β* and *IL-6* in hypothalamus (Fig. 4a, b, c) and hippocampus (Fig. 4d, e, f) of $\alpha_2^{+/+}$ mice compared to saline control group. In contrast, $\alpha_2^{+/G301R}$ mice displayed reduced transcription of the same proinflammatory cytokine genes in both structures analyzed compared to saline-treated littermates (Fig. 4a-f).

No difference in *Tlr4* mRNA expression in hippocampus and hypothalamus between $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice

It is known that LPS acts as an agonist for TLR4 in its role to induce neuroinflammation and expression of proinflammatory cytokines. To investigate the expression levels of the transcript encoding the TLR4, quantitative (q) PCR was performed on RNA isolated from hippocampus and hypothalamus.

The results showed that $\alpha_2^{+/G301R}$ mice did not have changes in *Tlr4* gene transcription in both hippocampus and hypothalamus (Fig. 5a, b). In addition, *Tlr4* gene transcription was not altered 4 hours after of the systemic LPS injection between genotypes, $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice in both structures studied (Fig 5a, b).

Increased p65 translocation in to the nucleus was noted in the hippocampus from $\alpha_2^{+/G301R}$ mice.

NF- κ B is an important transcriptional regulator of neuroinflammation, and activation by LPS and/or pro-inflammatory cytokines, such as TNF \Box , activates IKK, which in turn phosphorylates I \Box B leaing to complex dissociation and release of p50/ReIA heterodimers. The ReIA subunit of the NF- κ B can activate NF- κ B-responsive genes in the nucleus.

To evaluate the nuclear translocation of NF- κ B, we examined nuclear protein levels by Western blot using the RelA (p65) specific polyclonal antibody. No changes were observed in the p65 translocation in the hypothalamus of all groups (fig. 7a), however, the fraction of cytosolic p65 decreased significantly in the hippocampus of WT mice after LPS treatment (fig. 6b), indicating a p65 translocation to the nucleus. In contrast, LPS -induced activation of NF- κ B in the hippocampus of $\alpha_2^{+/G301R}$ mice was significantly attenuated as cytosolic p65 was similar in both groups (fig. 6b).

Evaluation of Nrf2 expression and pathway in hippocampus and hypothalamus

The Nrf2 signaling pathway plays pivotal roles in inflammation. Previous studies showed that the transcription factor Nrf2 regulates the expression of phase II

detoxifying enzymes, including NADPH, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, glutathione peroxidase, ferritin hem oxygenase-1 (HO-1) amongst other gens that combat against injuries and inflammation (Reviewed in Ahmed et al., 2017). Upon activation, NRF2 dissociates from its complex with Keap1, and NRF2 subsequently translocate to the nucleus and regulate anti-inflammatory gene expressions. Interestingly, p65 has been shown to activate NRF2 by sequestering Keap1 and thus, leads to the transactivation of NRF2-dependent genes (JAIN et al., 2010; KOMATSU et al., 2010; LAU et al., 2010).

To investigate whether the Nrf2 pathway would be evolved in the reduction of neuroinflammation induced by LPS in $\alpha_2^{+/G301R}$ mice, qPCR was performed to evaluate *Nrf2* expression in hippocampus and hypothalamus. Interestingly, $\alpha_2^{+/G301R}$ mice expressed higher levels of *Nrf2* constitutively in hippocampus when compared to $\alpha_2^{+/+}$ mice (Fig. 6d). In addition, LPS induced up-regulation of the expression of *Nrf2* in $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice in both structures studied (Fig. 6a, d). Additionally, the expression of the NRF2-responsive genes *Nqo1* and *Ho-1* (RANGASAMY et al., 2004) was investigated. In both structures studied, we observed increased expression of *Ho-1* by LPS (Fig. 6c, f). We note however, that the increased HO-1 expression was lower in the hypothalamus and hippocampus of the $\alpha_2^{+/G301R}$ than $\alpha_2^{+/+}$ mice treated with LPS (Fig. 6c, f). Interestingly, we observed increased of *Nqo1* in hippocampus of $\alpha_2^{+/G301R}$ 4 hours after treatment with LPS (Fig. 6e), but no difference was observed in *Nqo1* expression in the hypothalamus between $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice (Fig. 6b).

LPS-induced memory impairment and anxiety-like behaviors was not significantly altered in $\alpha_2^{+/G301R}$ mice compared to WT littermates

There have been a number of studies examining cognitive and affective parameters following recovery from LPS treatments (Reviewed in Anderson et al, 2015).

First, we examined the locomotor activity in $\alpha_2^{+/G301R}$ than $\alpha_2^{+/+}$ mice treated with saline or LPS. The locomotor activity was evaluated by the open field test at 4 hours after LPS administration to determine whether LPS treatment influence the locomotor activity.

In the open field test, LPS induced a reduction in locomotion and anxiety-like behaviors, however, the was no difference between the $\alpha_2^{+/G301R}$ than $\alpha_2^{+/+}$ mice (Fig.

8a, b). There was no difference in the total distance (P = 0,5806) and the time spent in the middle zone of the arena (P = 0,7457) among the four groups.

To investigate whether $\alpha_2 Na^+/K^+$ -ATPase haploinsufficiency could influence LPSinduced memory impairment, passive avoidance test to assess fear memory was performed. Passive avoidance learning measures the latency to enter a "dark" context in which an aversive stimulus (foot shock) has been previously experienced using a light-dark box paradigm. All groups showed similar baseline latency to enter the dark chamber in the exposure stage (Fig. 8c). WT and $\alpha_2^{+/G301R}$ mice treated with saline showed a significant increase on latency in the probe stage (Fig. supplementary).

Collectively, our results suggest that reduction of $\alpha_2 Na^+/K^+$ -ATPase does not interfere with LPS-induced locomotor activity, anxiety behaviors and cognitive impairment.

Discussion

Using a knock-in mouse model with the loss-of-function disease-mutation G301R in the *Atp1a2*-gene encoding the astrocyte-specific $\alpha 2$ isoform of the Na⁺/K⁺-ATPase, we showed that LPS altered differently the systemic production of TNF- α , IL-6 and IFN- γ and hypothermic response in $\alpha 2^{+/G301R}$ and $\alpha 2^{+/+}$ littermates mice. In addition, pro-inflammatory cytokines synthesis was lowered in hypothalamus and hippocampus of $\alpha 2^{+/G301R}$ mice compared with $\alpha 2^{+/+}$ littermates mice 4 h after LPS treatment, without interfering with *Tlr4* expression. Finally, we observed significant impairment of fear memory performance and anxiety-like behaviors by $\alpha 2Na^+/K^+$ -ATPase isoform haploinsufficiency.

Hypothermia is a thermoregulatory response to systemic inflammation that can be induces in rodents in response to systemic LPS challenge (CARVALHO et al., 2017; MURRAY; SKELLY; CUNNINGHAM, 2011), although the molecular mechanisms of LPS-induced hypothermia are still poorly understood, the participation of cytokines has been observed in the development of hypothermia (WANG; ANDO; DUNN, 1997). Our results demonstrate that the $\alpha_2^{+/G301R}$ mice present a reduction in the expression of the proinflammatory cytokines, *IL-1* β , *IL-6* and *TNF-* α in the hypothalamus, which could explain the less hypothermic response induced by LPS in these animals.

Furthermore, the peripheral LPS administration increased the expression of proinflammatory cytokines *IL-1β*, *TNF-α* and *IL-6* in the hippocampus of WT mice. Interestingly, $\alpha_2^{+/G301R}$ mice present a significantly reduction of *IL-1β* and *TNF-α* in the hippocampus. In support of these findings, ouabain acting as Na⁺/K⁺-ATPase ligand can protect motor neurons from mutant SOD1 astrocyte–induced degeneration and reducing the neuroinflammation induced by LPS (GALLARDO et al., 2014; KINOSHITA et al., 2017). Also, loss of function disease mutation G301R in the Na⁺/K⁺-ATPase α2 isoform decreases lesion volume and improves functional outcome after acute spinal cord injury in mice (ELLMAN et al., 2017), in addition, silencing of α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase reduce the LPS-induced inflammation in glial cells (KINOSHITA et al., 2017).

LPS induces an innate immune response and production of various proinflammatory cytokines via TLR4 activation. Additionally, CD36, class B scavenger receptors, is involved in the bacterium recognition and inflammatory signaling induced by LPS, as

well as CD36-TLR4 promotes sterile inflammation (BARANOVA et al., 2012; STEWART et al., 2010). It has been observed that macrophages deficient in α_1 Na⁺/K⁺-ATPase do not respond to activation of CD36 in an atherosclerotic model (CHEN et al., 2015). In view of this, we hypothesized that the reduction in α_2 Na⁺/K⁺-ATPase activity could influence *Tlr4* expression, however, no differences were observed in *Tlr4* expression in the hypothalamus and hippocampus of the WT and $\alpha_2^{+/G301R}$ animals. Since an alteration of *Tlr4* gene expression might be limited to a subset of cells in the CNS, it is possible that probing for an activation in *Tlr4* gene expression might be masked using lysates of hippocampus and hypothalamus.

Recently, a study showed that neuronal activity regulates astrocytic signaling of nuclear Nrf2, by secretion of glutamate and other soluble factors (HABAS et al., 2013). Thus, we hypothesized that $\alpha_2^{+/G301R}$ mice exhibited an increase in Nrf2 activity protect these animals constitutively, which would from LPS-induced neuroinflammation, since Nrf2 is capable of regulating NF-kB activation and consequent expression of pro-inflammatory cytokines. Confirming this hypothesis, we found an enhancement in the expression of Nrf2, as well as its activation product, the antioxidant factor NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (Ngo-1) in the hippocampus of the $\alpha_2^{+/G301R}$ mice without inflammatory stimulation, thus suggesting the involvement of Nrf2 activation in the less effective response of $\alpha_2^{+/G301R}$ mice neuroinflammation induced by LPS, since NQO-1 exhibits anti-inflammatory activity by inhibiting LPS induction of TNF, IL-1β, and IL-6 (RUSHWORTH; MACEWAN; O'CONNELL, 2008; THIMMULAPPA et al., 2006).

LPS peripheral administration promotes NF- κ B activation in different regions of the CNS leading to stimulation of pro-inflammatory cytokines (GLEZER et al., 2003). Our results confirmed that LPS induced activation of NF-kB since it increased the translocation of cytosolic p-65 to the nucleus increasing pro-inflammatory genes within four hours in $\alpha_2^{+/+}$ littermates mice hippocampus. Interestingly, $\alpha_2^{+/G301R}$ mice presented a reduction in the translocation of p-65 and expression of proinflammatory cytokines in the hippocampus, thus demonstrating a lower activation of the inflammatory response induced by NF- κ B. Thus, the present data suggest that the loss-of-function disease-mutation G301R in the *Atp1a2*-gene induced a reduction of the activation of the innate immune system in the CNS. These data corroborate previous studies demonstrating that ouabain, an inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase, is able to reduce peripheral and central

inflammation via inhibition of NF-κB activation (KINOSHITA et al., 2014; LEITE et al., 2015).

It has been shown that knockdown of α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase in mutant SOD1 astrocytes protected motor neurons from degeneration (GALLARDO et al., 2014). In addition, neuroinflammation is associated with synaptic dysfunction and neuronal degeneration in neurodegenerative diseases (OWNBY, 2010). The IL-1β has been associated with the cognitive impairment during an inflammatory process, as well as IL-1ß intrainduces impairs hippocampal administration memorv consolidation and reconsolidation in rats (BARRIENTOS et al., 2002, 2009). Although our results showed a reduction in IL-1 β expression 4 hours after LPS administration in the $\alpha_2^{+/G301R}$ animals, we observe that $\alpha_2^{+/G301R}$ animals did not remember the aversive stimulus (foot-shock). Studies have observed that. The regulate the release of the proinflammatory cytokine interleukin IL-1 β occurs through the inflammasomes, which are intracellular multiprotein complexes. Studies have shown that downregulation of the Na⁺/K⁺-ATPase modulates NLRP3 inflammasome and increased IL-1ß in the kidney (LACROIX-LAMANDE et al., 2012), in addition, ouabain activates NLRP3 inflammasome, as well as IL-1β release from macrophages and cardiac inflammation (KOBAYASHI et al., 2017). Furthermore, our results showed that the $\alpha_2^{+/G301R}$ animals did not show a reduction in the release of IL-1b at the periphery

All together, these data suggest for the first time, *in vivo*, that the loss-of-function disease-mutation in the α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase observed in $\alpha_2^{+/G301R}$ mice induces a reduction in the innate immune response of the CNS. Thus, the present data indicate an important role of the α_2 -Na⁺/K⁺-ATPase in the neuroinflammation responses that may be an important target for the treatment of neurodegenerative diseases.

Material and Methods

Mice and treatment

All experiments were performed on 8-12 weeks old $\alpha_2^{+/G801R}$ mice and WT. Animals were housed in ventilated cages with 1-3 cage-mates at a 12-hour light/dark cycle, under controlled temperature and humidity, and with free access to food and water. Animals were treated with 500 µg/kg LPS (O111:B4) (Sigma- Aldrich) or sterile saline. Four hours after LPS administration, mice were anesthetized by isoflurane inhalation and euthanized by decapitation and the brain was immediately removed and immersed in cold PBS. The hippocampus and hypothalamus were rapidly dissected, quickly immersed in liquid nitrogen, and stored at -80° C for later use. Mice were cared for in accordance with the protocols and guidelines approved by The Danish Animal Inspectorate under the Ministry of Food and Agriculture, Denmark (J. No. 2013–15–2934–00815 to KLH). The mice from us is kept on a background from C57/BL6JRj (Janvier) background. All animals were housed on a reversed light/dark cycle to prevent daytime experiments from interfering with their normal sleep cycle.

Genotyping

Heterozygous $\alpha_2^{+/G801R}$ mice (Bøttger et al, 2016) were genotyped by High Resolution Melt analysis (Roche LightcyclerR 96 Real-Time PCR System) using primers F-5' ggatgagggacagaacgaag and R-5'- catggagatcgagcatttca (Sigma-Aldrich).

Cell culture procedures

For bone marrow–derived macrophage (BMDMs), bone marrow was isolated from the femurs and tibias of 9-weeks-old mice WT and $\alpha_2^{+/G801R}$ mice cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin/streptomycin and 20% of L929 conditioned media at 37°C in 5% CO2 (PALLAI et al., 2016). On day 2 was add 5 ml of supplemented RPMI 1640 medium

and 40% L929 conditioned media. On day 4, non-adherent cells were removed from the flask, the media was replaced, and the remaining adherent cells were maintained in culture for a further 6 days, with media being with 20% L929 conditioned media. On day 7, cells were transferred to 24- well plates (4×10^5 cells per well) and cultured for 4 hours before use. The cells were treated in the presence or absence of LPS (100 µg/ml) for 1, 2, 4 and 6h. Supernatant samples were collected for analysis of TNF- α by ELISA.

Body temperature

Rectal body temperature was measured using a rectal probe (TFN 530 SMP Thermometer, Ebro) at the time of first injection and 4 hours after the injection of LPS or saline.

Measurement of Cytokines Levels

Briefly, after 4 hours of LPS or saline injection the blood was collected and centrifuged at 2000 g for 10 min to obtain serum. The concentrations of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ were measured by mouse specific sandwich ELISA, according to the manufacturer's instructions (eBioScience and R&D Systems).

Protein Extraction and Immunoblot Analysis

Hippocampus and hypothalamus were isolated according to the kit protocol of CelLytic NuCLEAR Extraction kit from Sigma (St. Louis, MO). In brief, tissues were homogenized in Lysis buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.9) with 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1 M DTT solution and protease inhibitor cocktail and centrifuged at 10,000 *g* for 20 min. The supernatant was transferred to a fresh tube and was the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in extraction buffer containing 1.5 μ l of 0.1 M DTT and 1.5 μ l protease inhibitor cocktail. The solution was allowed to stand on ice for 30 min by shaking at brief intervals followed by centrifugation at 20,000 *g* for 5 min. The supernatant was transferred to a clean chilled tube and contained the nuclear protein fraction. The proteins from hippocampus and hypothalamus cytosolic fraction

(20 µg) were size separated in 10% SDS-PAGE. The proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane (Pharmacia-Amersham, Amersham, UK) and incubated with the specific primary antibody: anti- α 1 (1:500) (a6f-c, Developmental Studies Hybridoma Bank, US), anti- α 2 (1:5000) (07674, EMD Millipore, US), anti-p65 (1:1000) (Cell Signaling) and actin (1:1000) (A2066, Sigma-Aldrich, St. Iouis, US) overnight at 4 °C. Secondary antibodies: horse-radish peroxidase-conjugated pig anti-rabbit and pig anti-mouse (1:2000) (Dako, Glostrup, Denmmark). Proteins recognized by antibodies were revealed by Amersham ECL Western Blotting Detection Kit, following the instructions of the manufacturer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). To standardize and quantify the immunoblots, we used the photo documentation system LAS 3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan) and ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD; http://rsb.info.nih.gov/ij), respectively. Several exposure times were analyzed to ensure the linearity of the band intensities. β -Actin were used as an internal control of the experiments. Results were expressed in relation to the intensity of β -Actin.

Real Time PCR

Total RNA was isolated with RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen) from hippocampus and hypothalamus according to the instructions of the manufacturer. Amplified cDNA was generated using the PrimeScriptTM RT reagent Kit (Takara BIO INC) from 500 ng of total RNA. The TNF- α , IL-1, IL-6, TLR4, HO-1 and NAD(P)H genes expressions were measured by quantitative PCR (qPCR) using TaqMan gene expression assay (Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR analysis was performed in triplicate, each reaction included 20 ng of cDNA, 5 μ l Lightcycler® 480 Probed Master Mix 2 × conc. (Roche, Basel, Switzerland), 0.5 μ l TaqMan® Gene Expression Assay 20Å~ and nuclease free water up to a final volume of 10 μ L. The PCR reactions were run in the Roche Lightcycler®96-well system with the following protocol: 2 sec for Uracil-DNA glycosylase enzyme activation at 50°C, 10 min DNA Polymerase activation at 95°C, and 45 cycles of 15 s denaturation step of 95°C, over 5 min. Triplicate expression values of each gene was set relative to the reference gene via the Delta-Delta-Ct methods

(Schmittgen and Livak, 2008). As a negative control, cDNA from no template RT-PCR reactions was used.

Behavioral Analysis

Open field test

Mice were placed in the center of an open field apparatus (50 × 50 cm) open field (Stoelting Europe; Dublin, Ireland) and monitored for 15 minutes using the ANY-maze software V4.99 (Stoelting, USA). The system automatically recorded the total distance travelled (m), and time (s) spent in center zone. Each mouse was tested once 4 hours after PBS or LPS injection, and the open field setup was cleaned with 70% ethanol and wiped with paper towels between each trial.

Passive avoidance test

The test was initiated on the acquisition day, 24 hours after the PBS or LPS injection. The mouse was placed in a brightly lit compartment with an electronically controlled door leading into a dark compartment. The latency (s) was recorded for the mouse to enter the dark compartment. Once in the dark compartment, the door closed and the mouse received an electric shock (0.42 mA for 1 s). After twenty-four hours, mouse was reintroduced to the same brightly lit compartment and the latency to enter the dark compartment was recorded as an indicator of memory of the shock.

Statistical Analysis

Results from Western Blot were analyzed as optical density by the program ImageJ (National Institute of Health, USA). Results from qPCR were analyzed by Delta-Delta-Ct analysis according to (Schmittgen and Livak, 2008) and calculated by REST 2009 Software (Qiagen, Duesseldorf, Ger). All the data were analyzed by two-way ANOVA followed by post-test Tukey. Differences were considered significant for p <0.05 and all results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M) of indicated

number of experiments. All analyses were performed using a Prism 6 software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

References

BARANOVA, I. N. et al. Class B Scavenger Receptor Types I and II and CD36 Mediate Bacterial Recognition and Proinflammatory Signaling Induced by Escherichia coli, Lipopolysaccharide, and Cytosolic Chaperonin 60. The Journal of Immunology, 2012.

BARRETT, C. F. et al. Familial hemiplegic migraine. Advances in genetics, v. 63, p. 57–83, 2008.

BARRIENTOS, R. M. et al. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. Behavioural Brain Research, 2002.

BARRIENTOS, R. M. et al. Time course of hippocampal IL-1 β and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. Brain, Behavior, and Immunity, 2009.

BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. The American journal of physiology, v. 275, n. 5 Pt 2, p. F633-50, nov. 1998.

BOTTGER, P. et al. Glutamate-system defects behind psychiatric manifestations in a familial hemiplegic migraine type 2 disease-mutation mouse model. Scientific reports, v. 6, p. 22047, fev. 2016.

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. Neuroscience and biobehavioral reviews, v. 36, n. 2, p. 855–871, fev. 2012.

CARVALHO, F. B. et al. Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. Molecular Neurobiology, 2017.

CHEN, Y. et al. Oxidized LDL-bound CD36 recruits an Na(+)/K(+)-ATPase-Lyn complex in macrophages that promotes atherosclerosis. Science signaling, v. 8, n. 393, p. ra91, set. 2015.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 6, p. 2652–2657, fev. 2010.

D'AMBROSIO, R.; GORDON, D. S.; WINN, H. R. Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. Journal of neurophysiology, v. 87, n. 1, p. 87–102, jan. 2002.

DE FUSCO, M. et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na+/K+ pump alpha2

subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. Nature genetics, v. 33, n. 2, p. 192–196, fev. 2003.

DOBRETSOV, M.; STIMERS, J. R. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, v. 10, p. 2373–2396, set. 2005.

DUCROS, A. et al. Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21q23 and evidence of further heterogeneity. Annals of Neurology, 1997.

ELLMAN, D. G. et al. The loss-of-function disease-mutation G301R in the Na(+)/K(+)-ATPase alpha2 isoform decreases lesion volume and improves functional outcome after acute spinal cord injury in mice. BMC neuroscience, v. 18, n. 1, p. 66, set. 2017.

FERRARI, M. D. et al. Migraine pathophysiology: Lessons from mouse models and human geneticsThe Lancet Neurology, 2015.

GALLARDO, G. et al. An α 2-Na/K ATPase/ α -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. Nature Neuroscience, 2014.

GLAROS, T. G. et al. Causes and consequences of low grade endotoxemia and inflammatory diseases. Frontiers in bioscience (Scholar edition), v. 5, p. 754–765, jan. 2013.

GLEZER, I. et al. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-κB induced by LPS. Neuropharmacology, 2003.

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

HABAS, A. et al. Neuronal activity regulates astrocytic Nrf2 signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013.

HEINZEN, E. L. et al. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. The Lancet. Neurology, v. 13, n. 5, p. 503–514, maio 2014.

ISAKSEN, T. J.; LYKKE-HARTMANN, K. Insights into the Pathology of the alpha2-Na(+)/K(+)-ATPase in Neurological Disorders; Lessons from Animal Models. Frontiers in physiology, v. 7, p. 161, 2016.

JAIN, A. et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. The Journal of biological chemistry, v. 285, n. 29, p. 22576–22591, jul. 2010.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. Annual review of physiology, v. 65, p. 817–849, 2003.

KAWAMOTO, E. M. et al. Curcumin requires tumor necrosis factor α signaling to alleviate cognitive impairment elicited by lipopolysaccharide. NeuroSignals, 2013.

KINOSHITA, P. F. et al. Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain

against LPS as an inflammation model in hippocampus. Journal of neuroinflammation, v. 11, p. 218, dez. 2014.

KINOSHITA, P. F. et al. Alpha 2 Na(+),K(+)-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 4894, jul. 2017.

KOBAYASHI, M. et al. The cardiac glycoside ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction. PLoS ONE, 2017.

KOMATSU, M. et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. Nature Cell Biology, 2010.

LACROIX-LAMANDE, S. et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950), v. 188, n. 6, p. 2805–2814, mar. 2012.

LARSEN, B. R. et al. Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K(+) clearance and volume responses. Glia, v. 62, n. 4, p. 608–622, abr. 2014.

LAU, A. et al. A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and p62. Molecular and Cellular Biology, 2010.

LEITE, J. A. et al. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. Mediators of inflammation, v. 2015, p. 265798, 2015.

LUNDBORG, C. et al. Ifenprodil restores GDNF-evoked Ca(2+) signalling and Na(+)/K(+) -ATPase expression in inflammation-pretreated astrocytes. Journal of neurochemistry, v. 119, n. 4, p. 686–696, nov. 2011.

MURRAY, C. L.; SKELLY, D. T.; CUNNINGHAM, C. Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1 β and IL-6. Journal of Neuroinflammation, 2011.

NGUYEN, M. D.; JULIEN, J. P.; RIVEST, S. Innate immunity: The missing link in neuroprotection and neurodegeneration? Nature Reviews Neuroscience, 2002.

OWNBY, R. L. Neuroinflammation and cognitive aging. Current psychiatry reports, v. 12, n. 1, p. 39–45, fev. 2010.

PALLAI, A. et al. Transmembrane TNF- α Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF- β : Therapeutic Implications. The Journal of Immunology, 2016.

QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. GLIA, 2007.

RANGASAMY, T. et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Journal of Clinical Investigation, 2004.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to

neurodegenerationScience, 2016.

RANSOM, C. B.; RANSOM, B. R.; SONTHEIMER, H. Activity-dependent extracellular K+ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na+ pumps. The Journal of physiology, v. 522 Pt 3, p. 427–442, fev. 2000.

RUSHWORTH, S. A.; MACEWAN, D. J.; O'CONNELL, M. A. Lipopolysaccharide-Induced Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 and Heme Oxygenase-1 Protects against Excessive Inflammatory Responses in Human Monocytes. The Journal of Immunology, 2008.

SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochimica et biophysica acta, v. 23, n. 2, p. 394–401, fev. 1957.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formationTrends in Neurosciences, 2009.

STEWART, C. R. et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nature Immunology, 2010.

THIMMULAPPA, R. K. et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. Journal of Clinical Investigation, 2006.

THOMSEN, L. L. et al. A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria. Brain, 2002.

VASCONCELOS, A. R. et al. Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharideinduced neuroinflammation and memory impairment. Journal of Neuroinflammation, 2014.

WANG, J.; ANDO, T.; DUNN, A. J. Effect of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice. Neuroimmunomodulation, v. 4, n. 5–6, p. 230–236, 1997.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Rune Hartmann, Department of Molecular Biology and Genetics Aarhus University for valuable suggestions regarding innate immunity, and Drs. Christian Kanstrup Holm and Martin Thomsen, Department of Biomedicine, Aarhus University for their advice on BMDM.

The research was founded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016/07427-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. J.A.L. is supported by PhD fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016/21343-1 and 2014/10171-0) and C.S. is research fellows of CNPq. TJI was 2/3 co-founded from PUMPkin (DNRF85 to KLH) and 1/3 co-funded by the Graduate School of Health, Aarhus University. KLH was supported by grants from The Lundbeck Foundation (J. Nr. 234/06), Th. Maigaards Eft. Fru Lily Benthine Lunds Fond and Fonden til Lægevidenskabens Fremme.

Author contributions

J.A.L, C.S and K.L-H conceived and designed the experiments. J. A.L, T.J.I. and A.H. performed the experiments. J.A.L, T.J.I, A.H., C.S and K.L-H analyzed data. J.A.L, C.S and K.L-H composed the manuscript.

Figure legends

Fig. 1 $α_2^{+/G301R}$ mice display less sickness behavior, hypothermia and pro-inflammatory cytokines levels. $α_2^{+/G301R}$ mice show lower serum pro-inflammatory cytokines levels induced by LPS. (**a**) Example of sickness behavior 4 hours after LPS administration, $α_2^{+/+}$ mice displayed sickness behavior, less locomotion, bristly and hypothermia (left picture, arrow). $α_2^{+/G301R}$ mice have less sickness behavior after LPS (left picture). (**b**) The deviation of body temperature, at 4 hours, from baseline (t = 0) in $α_2^{+/+}$ and $α_2^{+/G301R}$ animals treated with PBS or LPS. **c d e f** $α_2^{+/G301R}$ mice showed less hypothermia compared to the $α_2^{+/+}$ mice. $α_2^{+/G301R}$ and WT littermates ($α_2^{+/+}$) were injected i.p. with saline or LPS (500 µg/kg) and the levels of TNF-α (**c**) (*n*=12-14 for both $α_2^{+/+}$ and $α_2^{+/G301R}$), IL-1β (**d**) (*n*=6-7 for both $α_2^{+/+}$ and $α_2^{+/G301R}$) were measured in serum 4h after LPS treatments. Data are presented as mean ± SEM. #p<0.05, *p<0.05, ***p<0.001 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test revealed a significant).

Fig. 2 BMDMs were derived from cells bone marrow cells from femurs and tibias from $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ mice that were cultured in L929 cell supernatant for 6 days. After 6 days, BMDMs were treated with LPS (100 ug/mL). **a b c d** Levels of TNF-α was measured in the supernatant after 1 hour (**a**), 2h (**b**), 4h (**c**) and 6 hours (**d**) after LPS treatment. **e**, **f** Representative Western blotting (**e**) and densitometric analysis (arbitrary units, A.U.) (**f**) showed that macrophages lose the expression of α_2 Na/K-ATPase during differentiation. Blots shown in (**e**) are cropped. Data are presented as mean ± SEM from two individual experiments. $\alpha_2^{+/+}$ PBS vs $\alpha_2^{+/+}$ LPS ***p<0.001, $\alpha_2^{+/+}$ PBS vs $\alpha_2^{+//G301R}$ LPS ***p<0.001 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test revealed a significant increase of TNF-α levels in BMDM derivative from $\alpha_2^{+/G301R}$ and $\alpha_2^{+/+}$ mice after LPS treatment in all times analyzed).

Fig. 3 α_2 and $\alpha_1 Na^+/K^+$ -ATPase isoform protein levels assessed through Western blotting in the hypothalamus (blue bars) and hippocampus (red bars). **a**, **b** Representative Western blotting digital images and densitometric analysis (arbitrary units, A.U.) of hypothalamus lysates from $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ mice 4 hours after saline

or LPS injection showed no differences in $\alpha_1 Na^+/K^+$ -ATPase (**a**) (*n*=6 mice/group) and $\alpha_2 Na^+/K^+$ -ATPase (**b**) (*n*=8-10 mice/group). **c**, **d** Western Blotting from hippocampus lysates from $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ mice 4 hours after saline or LPS injection showed no differences in $\alpha_1 Na^+/K^+$ -ATPase (**d**) (*n*=7-9 mice/group), but showed a reduction in $\alpha_2 Na^+/K^+$ -ATPase (**c**) (*n*=10-11 mice/group). Results are expressed relative to the control (PBS) as mean ± SEM, from three individual experiments. *p<0.05 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

Fig. 4 The reduction of α_2 Na⁺/K⁺-ATPase decrease lipopolysaccharide (LPS)-induced hypothalamus (blue bars) and hippocampus (red bars) cytokine transcription. **a b c d e f** TaqMan quantitative PCR analysis of *TNF-a* (**a**, **d**); *IL-1β* (**b**, **e**); *IL-6* (**c**, **f**) relative β -Actin. $\alpha_2^{+/G301R}$ mice showed a decrease expression of all cytokines induced by LPS in the hypothalamus and TNF- α and IL-1 β in the hippocampus compared to $\alpha_2^{+/+}$ mice. All data are mean ± SEM. ##p<0.01, **p<0.01, ***p<0.001 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test, *n*=3-4 mice/group).

Fig. 5 The $\alpha_2^{+/G301R}$ mice had no differences in *Tlr4* expressions in the hypothalamus (blue bars) and hippocampus (red bars) compared to $\alpha_2^{+/+}$ mice under naïve conditions. **a**, **b** TaqMan quantitative PCR analysis from hypothalamus (**a**) and hippocampus (**b**) of *Tlr4* relative to β -*Actin* showed no difference between $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ animals. Data are presented as mean ± SEM (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test *n*=3-4).

Fig. 6 The α 2G301R disease mutation increases antioxidant enzymes expression. **a b c d e f** TaqMan quantitative PCR mRNA expression analysis of *Nrf2* (**a**, **d**); *Ho-1* (**b**, **e**); *Nqo-1* (**c**, **f**) was evaluated in hypothalamus (blue bars) and hippocampus (red bars) respectively. All data are mean ± SEM of 3 individual experiments. ##p<0.01, *p,0.05, *p<0.01 and ***p<0.001 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test, *n*=3-4 mice/group).

Fig. 7 LPS increase the NF-κB translocation in the hippocampus. **a b** Western blot densitometric analysis (arbitrary units, A.U.) and representative Western blotting to p-65 (NF-κB) and β-Actin from hypothalamus (**a**) (blue bars) (*n*=3 mice/group) and hippocampus (**b**) (red bars) (*n*=4-6 mice/group) of the animals $\alpha_2^{+/+}$ and $\alpha_2^{+/G301R}$ 4 hours after LPS treatment for hypothalamus and for hippocampus. All data are mean ± SEM. *p,0.05 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

Fig. 8 Activity of the α_2 Na⁺/K⁺-ATPase does not altered memory impairment and anxiety induced by LPS. **a b** Results of analysis of behavior in the open field test 4 hours after LPS injection showing the total distance traveled (**a**) and time spent in the center of the open field (**b**) (n = 10-12). **c** The passive avoidance test results (n=10-12). The training and test were made 24 and 72 hours after LPS injection, respectively. All data are mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

a









_ PBS ■ LPS (500 μg/kg)











127







40 KD

0

α2+/+

β-Actin

α2^{+/G301R}











Figure 3

d











Figure 4

f

LPS (500 µg/kg)

D PBS



b



Figure 5











е

Figure 7







Anexo II - Certificado de participação em curso de biossegurança e Boas de Laboratório do ICB.

		dutos Químicos", e São Paulo.	<i>d</i> ,	A. tencourt	ão Paulo - SP•CEP 05508-900
		anuseio e Descarte de Prov iédicas da Universidade de		Prof. Dr. Jackson Cioni Bitt	ando Salles Oliveira" • Butantã – Sã
	ira os devidos fins, que : Alves Leite	Curso "Armazenamento, Ma o Instituto de Ciências Biom	maio 2016 lida por 5 anos)	Molu III Layne Freitas missão de Residuos Químicos	: Biomédicas USP tes, 2415 • Cidade Universitària "Arm
Confisso de Residues	Declaro, pa	concluiu o (realizado no	São Paulo, 28 n (Declaração vál	Presidente da Oo	Instituto de Ciências Av. Prof. Lineu Prest

Anexo III - Certificado de participação em curso de armazenamento, manuseio e descarte de produtos químicos.

Anexo IV - Certificado de participação em curso de proteção radiológica.



Anexo V - Certificado de participação em curso de treinamento no uso de animais de experimentação.



E B I S D E						- SP•CEP 05508-900
Uso de animais para experimentação	DECLARAÇÃO	Declaramos para os devidos fins que	Jacqueline Alves Leite	participou do Curso "Uso de Animais em Experimentação" com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.	São Paulo, 4 junho 2018 Comissão de Biotérios ICB USP	Instituto de Ciências Biomédicas USP Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo -

Anexo VI - Certificado de participação em curso de treinamento no uso de animais de experimentação.



Anexo VII - Certificado de participação em curso de atualização em Biotérios.

Anexo VIII - Certificado de participação em curso de animais de laboratório.



Jacqueline Leite Rua Itapicuru 05006000 São Paulo

CERTIFICATE

You have satisfactorily completed the PhD course held at Health, Aarhus University on the January 9-13, 2017

Laboratory Animal Science

Helene Nørrelund Head of Graduate School of Health

Course leader: Frederik Dagnæs-Hansen

Reg. No.: B100/31

ECTS: 3.80

Contents: To give the participants understanding of the basic principles laboratory animal science. — The course is obligatory for persons, who wish to obtain their own permission for performing research using laboratory animals. The basic course in Laboratory Animal Science, gives an admission to experiments with animals. This means that you get the admission to assist at experiments with laboratory animals. This corresponds to FELASA B license.

> Graduate School of Health Aarhus University Katrinebjergvej 89F, bld. 5132 DK-8200 AarhusN

Phone: 87150000 E-mail: graduateschoolhealth@au.dk Web: http://talent.au.dk/phd/health