PAULA FERNANDA KINOSHITA

**SINALIZAÇÃO INFLAMATÓRIA E A MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO
DE GENES INDUZIDA PELA AÇÃO DA OUABAÍNA
NAS ISOFORMAS $\alpha 1$, $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ - ATPASE EM CÉLULAS DA GLIA**

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

São Paulo
2013

PAULA FERNANDA KINOSHITA

**SINALIZAÇÃO INFLAMATÓRIA E A MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
GENES INDUZIDA PELA AÇÃO DA OUABAÍNA
NAS ISOFORMAS $\alpha 1$, $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ - ATPASE EM CÉLULAS DA GLIA**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Co-orientadora: Dra. Elisa Mitiko Kawamoto

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Kinoshita, Paula Fernanda.

Sinalização inflamatória e a modulação da expressão de genes induzida pela ação da ouabaína nas isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ – Na⁺, K⁺-ATPase em células da glia / Paula Fernanda Kinoshita. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Sinalização inflamatória e ação da ouabaína no sistema nervoso central.

Versão do título para o inglês: The influence of Na,K-ATPase isoforms in ouabain signaling cascade against LPS induced NF- κ B activation in glial cells.

1. Na,K-ATPase 2. Ouabaína 3. LPS 4. Células da glia 5. NF- κ B
I. Scavone, Prof. Dr. Cristoforo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0131/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Paula Fernanda Kinoshita.

Título da Sinalização inflamatória e a modulação da expressão de genes induzida pela ação da ouabaína nas isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ – Na^+ , K^+ - ATPase em células da glia.

Orientador(a): Prof. Dr. Cristoforo Scavone.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 037 nas fls. 101 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Cristoforo Scavone**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Sinalização inflamatória e a modulação da expressão de Genes induzida pela ação da ouabaína nas isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ -Na⁺, K⁺-ATPase em células da Glia*" do qual participam o(s) alunos **Paula Fernanda Kinoshita, Lidia Yshii, Ana Maria Orellana e a pesquisadora Elisa Mitiko Kawamoto**, 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 **30.03.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 31 de março de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

PAULA FERNANDA KINOSHITA

DE NACIONALIDADE BRASILEIRA,
PORTADORA DA CÉDULA DE IDENTIDADE
RG Nº 43.611.351-X SP,
NASCIDA EM 4 DE JULHO DE 1988
E NATURAL DO ESTADO DE SÃO PAULO,
CONCLUIU O

**CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA NA
MODALIDADE DE DIFUSÃO:
CURSO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA**

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

SÃO PAULO, 21 DE OUTUBRO DE 2011.

PRESIDENTE DA COMISSÃO
DE CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

EDNA TERUKO KIMURA

DIRETOR
RUI CURÍ

*Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos
mais difíceis, que me apoiaram e acreditaram em mim,
e me ajudaram a tornar meus sonhos realidade.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, por ter me mostrado como é maravilhoso e divertido trabalhar com ciência, por sempre me incentivar, me ajudar nos momentos mais complicados, pela paciência, pelas correções, pelos ensinamentos de vida e científicos, pela amizade e pela confiança.

À minha co-orientadora Dra. Elisa Mitiko Kawamoto por me receber tão bem no laboratório durante a Iniciação científica, por me ensinar muito, por sempre me acompanhar e ajudar mesmo de longe, por me ajudar a ter foco no projeto e pelas ótimas discussões científicas.

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia Molecular, por todos os momentos especiais que passamos juntos nessa trajetória.

À Dra, Lidia Mitiko Yshii pela paciência e disposição para me ensinar, pelo incentivo, acolhimento nas dificuldades, pelo companheirismo e carinho, pela amizade e pelos momentos felizes. À Andrea Rodrigues Vasconcelos, por me compreender, me ajudar sempre quando preciso, pelos dias alegres no laboratório e pela amizade. À Ana Maria Marques Orellana, pelas ótimas ideias, pela animação e pela amizade. Ao Caio Henrique Mazucanti por compartilhar suas ideias, pela ajuda e pela amizade. À Diana Zukas Andreotti por sempre me ajudar, pelo apoio técnico, pelos bons momentos e pela amizade. À Larissa de Sá Lima pela ajuda técnica e burocrática, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade.

Aos alunos e a Profa. Carolina Demarchi Munhoz do laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação pela companhia e aprendizado.

À Sandra Regina da Silva por me ajudar a trabalhar com os animais e cuidar sempre tão bem deles.

À Selma Rigonatti, Camila Gonçalves Trindade e Mônica Nunes da Silva por todo o apoio burocrático.

À Regina Bennati por me acompanhar e me incentivar nessa jornada.

Aos meus pais, Meire de Cássia I. Kinoshita e Paulo R.Y. Kinoshita pelo apoio, incentivo e entendimento nas horas mais difíceis.

À todos que de alguma forma contribuíram e participaram desta jornada.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À Deus por sempre me proteger e me proporcionar esse momento

*“Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração.
O essencial é invisível para os olhos”*

Antoine de Saint-Exupéry, “O Pequeno Príncipe

RESUMO

Kinoshita PF. Sinalização inflamatória e a modulação da expressão de genes induzida pela ação da ouabaína nas isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ - ATPase em células da glia. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Na,K-ATPase é uma proteína de membrana que tem como função manter o equilíbrio osmótico nas células pela hidrólise de ATP. Ouabaína (OUA) é conhecida como um hormônio endógeno produzida no hipotálamo e na glândula adrenal. Esse glicosídeo cardiotônico se liga a Na,K-ATPase e é capaz de ativar cascatas de sinalização em concentrações não relacionadas com o efeito inibitório da enzima. As subunidades α da Na,K-ATPase possuem 4 isoformas que são distribuídas de forma diferenciada nos tecidos. Estudos sugerem que cada isoforma pode ter um papel fisiológico em resposta à ligação com a OUA. No sistema nervoso central, neurônios expressam $\alpha 1$ e $\alpha 3$, enquanto as células da glia $\alpha 1$ e $\alpha 2$. As células da glia são importantes na resposta contra lesões no cérebro e também controlam a inflamação que é crucial nas doenças neurodegenerativas. Dados na literatura mostram que a OUA tem efeito protetor em alguns tipos de dano. O objetivo do estudo é avaliar a função da isoforma $\alpha 2$ na cultura de células da glia de camundongos em resposta à OUA e ao LPS. Primeiramente, nós investigamos a ação da OUA em diversas concentrações e LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) na viabilidade celular (LDH) e proliferação celular (MTT). O LPS foi utilizado como modelo de inflamação e uma das perguntas era se o tratamento prévio com OUA, seria capaz de reverter a ativação do fator de transcrição NF- κ B que está envolvido com inflamação ativado por LPS. Os tratamentos foram realizados com o meio DMEM sem soro com diferentes concentrações de OUA (1 μM , 10 μM , 100 μM), tempos de incubação (15 minutos, 1 and 6 horas). A translocação nuclear do RelA (subunidade do NF- κ B ou p65) foi avaliada por ensaio de imunofluorescência. Nós selecionamos as concentrações que diminuíram a translocação de RelA na presença de LPS e avaliamos a atividade do NF- κ B pelo ensaio de EMSA. O pré-tratamento com OUA (10 μM) por 1 hora diminuiu a ativação do NF- κ B induzida pelo LPS (1 hora). Após essa etapa, nós silenciámos a isoforma $\alpha 2$ das células da glia com RNAi ou com uma sequência aleatória (scramble). Enquanto o grupo scramble mostrou uma ativação da ERK no tratamento com LPS em comparação com os grupos controle, OUA e OUA+LPS, no grupo RNAi não ocorreram diferenças. O mesmo padrão foi observado na expressão do RelA citoplasmático, onde houve uma diminuição da expressão da proteína em relação aos outros grupos, porém, essa diferença não ocorreu no grupo RNAi. Logo, os nossos dados mostram que o pré-tratamento com OUA reverte o efeito na ativação do NF- κ B causado pelo LPS. Provavelmente, a isoforma $\alpha 2$ está relacionada com alguma via de sinalização que interage com a via do LPS.

Palavras-chave: Na,K-ATPase. Ouabaína. LPS. Células da glia. NF- κ B.

ABSTRACT

Kinoshita PF. The influence of Na,K-ATPase isoforms in ouabain signaling cascade against LPS induced NF- κ B activation in glial cells. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Na,K-ATPase is a conserved membrane protein which maintains the osmotic balance in the cell by the hydrolysis of ATP. Ouabain (OUA) is known as an endogenous hormone produced in hypothalamus and adrenal gland. This cardiac glycoside binds to Na,K-ATPase and it can activate signaling pathways in concentrations that is not linked to the common effect of the enzyme inhibition. The α subunits of Na,K-ATPase have 4 isoforms which are distributed in a different pattern in the tissues. Studies suggest that each isoform may have a different physiological role in response to OUA binding. In the central nervous system, neurons express the $\alpha 1$ and $\alpha 3$, while the glial cells $\alpha 1$ and $\alpha 2$. Glial cells have an important role in the response against injury in the brain and they also control inflammation which is crucial to trigger neurodegenerative diseases. In fact, some data have reported that OUA can protect against some types of injury. The aim of this study is to evaluate the role of $\alpha 2$ isoform in glial cells in response to OUA and LPS stimulus. Firstly, we investigated the action of OUA in a range of concentrations in LPS (1ug/ml) effects in cell viability (LDH) and cell proliferation (MTT). LPS was used as a model of inflammation and one of our questions was if the treatment with OUA before LPS was capable of reduce the activation of the transcription factor NF- κ B which is involved in inflammation activated by LPS. NF- κ B in glial cells has a pro-inflammatory effect. Treatments were performed in culture medium (DMEN) without serum with different OUA concentrations (1uM, 10uM, 100uM), time of incubation (15 minutes, 1 and 6 hours) and LPS in different time points (1, 2 and 6 hours). RelA (NF- κ B subunit) nuclear translocation was evaluated by immunofluorescence assay. Then, we selected the concentrations that decreased the RelA nuclear translocation in presence of LPS and we evaluated the activity of NF- κ B by the electrophoretic mobility shift assay. The pre-treatment with OUA (10uM) for 1 hour decreased the NF- κ B activation induced by LPS (1ug/ml, 1h). We also silenced the $\alpha 2$ isoform in mice primary culture glial cells with iRNA or with an aleatory sequence (scramble). While the scramble group showed ERK activation in LPS treatment in comparison with the control, OUA and OUA+LPS, the RNAi group showed no difference. The same pattern was observed with cytosolic p65, the treatment of LPS decrease the amount of p65 in cytoplasm in comparison with control and OUA, but we couldn't find any difference between the groups treated with iRNA. Taken together our data showed that OUA pretreatment reversed the NF- κ B activation induced by LPS in primary cultures of glial cells from mice. Probably, the $\alpha 2$ isoform is related with some signaling pathway that interacts with the LPS pathway.

Keywords: Na,K-ATPase. Ouabain. LPS. Glial cells. NF- κ B.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt- proteína quinase de serina/ treonina

AMPc – Adenosina Monofosfato Cíclico

ANOVA – análise de variância

AP-1- Ativador de proteína 1

ATP – Trifosfato de adenosina

BDNF- Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro

BSA - albumina de soro bovino

Ca²⁺ - Cálcio

CICR - *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*

Cl⁻ - íon cloreto

CREB – Elemento de Resposta Ligado ao AMPc

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2- Ciclooxygenase tipo 2

DMEN- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetil sulfóxido

Dicer- Membro da Família RNase III das endonucleases específicas de dsRNA

dsRNA - RNA longo de dupla-fita

DTT – Ditioneitol, inibidor de protease

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético, agente quelante

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

EGFR – Receptor do fator de Crescimento Epidermal

EMSA – Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética

ERK – quinase regulada por sinais extracelulares

g – RCF: Força Centrífuga Relativa

Grb2 - proteína 2 ligada ao receptor fator de crescimento

HBSS – Solução salina Balanceada de Hanks - *Hank's Balanced Salt Solution*

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico

H⁺- Hidrogênio

IKK – complexo de quinases do IκB

IL-1- interleucina-1

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL6 – Interleucina 6

IP3 - Inositol-trifosfato

IP3R - Receptor de trifosfato de inositol

IRAK - Quinase do receptor associado a IL-1

I κ B – Proteína Inibitória κ B

JNK- Quinase Jun N- terminal

K⁺ - Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

LDH - Lactato desidrogenase

LBP – proteína de ligação do LPS

LPS- lipopolissacarídeo

MEK - Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

miRNA - Micro RNA

MTT - Sal de tetrazolium

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaF – fluoreto de sódio

Na⁺,K⁺-ATPase - Sódio Potássio Adenosina Trisfosfatase

NF- κ B - Fator de transcrição Nuclear kappa B

nM – nanomolar

NMDA - receptores glutamatérgicos tipo N-metil-D-Aspartato

NOSi - Oxido Nítrico Sintase induzida

NP-40: Nonil Fenoxi Polietoxietanol

OUA - Ouabaína

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PKC – Proteína Quinase C

PMSF – Inibidor de Protease

PO₄³⁻ - Fosfato

Ras - Proteína G de baixo peso molecular

REM- Movimentos de olhos rápidos- *rapid eye movement*

RHD - Domínio de homologia Rel

RISC - Complexo indutor de silenciamento do RNA

RNA- Ácido Ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

RNA_m – RNA mensageiro

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SAP- Proteína quinase ativada pelo estresse

sCD14 - CD14 solúvel

SDS- Dodecilsulfato de Sódio

SFB - Soro fetal bovino

Shc- Proteínas contendo domínio SH-2

siRNA – RNA de interferência curto - *short interfering RNA*

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido dismutase

Sos - Fator de troca do nucleotídeo guanina

Src – Proteína Tirosina-quinase proto-oncogênica

TAD - Domínio de transativação

TBE – Tampão Tris- Borato - EDTA

TBS – Tampão Tris-Salina

TLR - Receptor do tipo Toll

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TRAF6 - receptor de TNF associado ao fator 6

Tris – HCl - tris(hidroximetil)aminometano com ácido clorídrico

TTBS - Tampão Tris-salina com *Tween-20*

U.A. – Unidade arbitrária

°C - graus celsius

μ - micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A enzima Na^+, K^+ -ATPase	16
1.2 Isoformas da Na^+, K^+ - ATPase	17
1.3 Ouabaína (OUA)	18
1.4 NF- κ B	22
1.5 Sinalização da glia na presença de LPS	25
1.6 RNA de interferência (RNAi)	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Cultura de células da glia de córtex	31
4.2 Ensaio de imunofluorescência	32
4.3 Tratamento das células da glia	32
4.4 Transfecção do RNAi das células da glia	33
4.5 Viabilidade celular	33
4.5.1 Ensaio de viabilidade celular: redução de formazan colorido (MTT)	33
4.5.2 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)	34
4.6 Extração de proteínas nucleares	34
4.7 Determinação da concentração de proteínas	35
4.8 Ensaio de Western Blotting para a expressão das proteínas α 2- Na^+, K^+ -ATPase , p-ERK, t-ERK, RelA e β -actina	35
4.9 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA) para o NF- κ B	37
4.9.1 Marcação da sonda	37
4.9.2 Reação de Ligação e corrida do gel	37
4.10 Análise dos resultados	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Caracterização da cultura primária de células da glia de córtex de camundongo	39
5.2 Ensaio de viabilidade celular: MTT e LDH	44
5.3 Padronização de tempo e dose de tratamento	48
5.4 Padronização da dose e tempo para OUA com o ensaio de EMSA	61
5.5 Silenciamento da isoforma α 2 – Na^+, K^+ - ATPase	65
5.6 Alteração da via de sinalização da proteína ERK	66
5.7 Alteração dos níveis citoplasmáticos da RelA (p65)	68

6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO.....	75
ANEXO A – Sequências do RNAi para a isoforma $\alpha 2$ - Na⁺, K⁺- ATPase.....	84

1 INTRODUÇÃO

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

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína de membrana essencial para a sobrevivência, não simplesmente por ser expressa em todas as células do corpo humano, mas também devido a sua função de manter o equilíbrio osmótico da célula e o potencial de membrana através da hidrólise de uma molécula de ATP o que mantém as concentrações do meio intracelular de K^+ elevadas e as de Na^+ baixas, o que é essencial para a transmissão nervosa e a manutenção da célula (1, 2).

Além disso, o gradiente de Na^+ fornece energia que mantém os transportes ligados a este íon. Estes sistemas de transportes secundários atuam no transporte de íons ($\text{H}^+, \text{Ca}^{+2}, \text{Cl}^-, \text{PO}_4^{-3}$), substratos (glicose e aminoácidos) e de neurotransmissores através da membrana plasmática (3-6). No rim, a enzima Na^+, K^+ -ATPase desempenha uma função importante na reabsorção de Na^+ e de água. Assim, a enzima é essencial na manutenção do equilíbrio eletrolítico e dos líquidos do organismo (4, 7).

Porém, foi descoberto que além dessas funções, ela também poderia atuar como um transdutor de sinais por Xie e Askari (8), ativando cascatas de sinalização como Src-Ras-ERK(Src: proto-oncogene tirosina quinase, Ras: tipo de proteína G de baixo peso molecular e ERK: MAP quinase) e em diversos processos celulares como crescimento, apoptose, motilidade e adesão (9).

A Na^+, K^+ -ATPase possui três subunidades : α, β e γ (10).

A subunidade α (massa molecular de aproximadamente 110kDa) é um peptídeo com 8-10 domínios transmembrânicos e também chamada de subunidade catalítica, pois é responsável pela troca de íons Na^+ e K^+ e é onde se encontra o sítio de ligação com glicosídeos cardiotônicos como a OUA (11). O sítio de ligação é altamente conservado em diversos organismos como sapos (12) e humanos (13), revelando um importante papel fisiológico desse sítio.

A subunidade β é uma glicoproteína com um único segmento transmembrânico e importante na garantia da funcionalidade da Na^+, K^+ -ATPase, através da manutenção da conformação ativa da subunidade α 1 (14) e também na sua integração na membrana plasmática. Dependendo do grau de glicosilação da

proteína em diferentes tecidos, a sua massa molecular pode variar de 40 a 60kDa (15).

A subunidade γ ou FXYP é um polipeptídeo hidrofóbico pequeno de 8-14 kDa que está relacionada com a afinidade de íons Na^+ pela Na^+, K^+ -ATPase (no caso dos rins para controle da reabsorção de íons Na^+ no túbulo renal de acordo com as necessidades do organismo) ou até mesmo na diminuição da afinidade de íons K^+ extracelular o que é essencial na excitabilidade neuronal (16). Essa subunidade também atua na atividade da Na^+, K^+ -ATPase, tanto no seu aumento como na diminuição.

A subunidade mais relevante do ponto de vista da atividade funcional e relacionado a presença do sítio catalítico é a α , pois é o sítio de ligação com os glicosídeos cardiotônicos que leva a ativação de cascatas de sinalização como Src-Ras-ERK e ativação da Akt (proteína quinase de serina/ treonina) que são vias importantes no crescimento celular, além disso, mutações nessa subunidade podem causar diversas doenças como hipertensão, enxaqueca (17) e parkinsonismo genético (18).

1.2 Isoformas da Na^+, K^+ - ATPase

A enzima Na^+, K^+ -ATPase, à exemplo de outras proteínas celulares, pode ser encontrada em várias isoformas. O desenvolvimento de múltiplas isoformas possibilita versatilidade funcional para células, o que gera condições para que estas enzimas realizem as suas várias funções no organismo. Em alguns casos, as isoformas surgem da duplicação de genes ou estão relacionadas à forma de processamento após uma transcrição alternativa da mensagem de um mesmo gene. Assim, no caso da enzima Na^+, K^+ -ATPase, existem diferentes genes que codificam formas moleculares distintas dos dois polipeptídeos principais (α e β) (19-23).

A subunidade α possui 4 tipos de isoformas: α_1 , α_2 , α_3 e α_4 . A isoforma α_1 está presente em praticamente todas as células enquanto a α_4 está presente apenas em espermatozóides e co-existe com a isoforma α_1 (o mesmo ocorre com as outras isoformas) (24). As três isoformas mais caracterizadas ($\alpha_1, 2, 3$) apresentam mais de 90% de homologia na sua sequência, sendo as diferenças mais importantes encontradas na porção N-terminal (25).

As isoformas também são diferentes quanto à sensibilidade à OUA. Em ratos e camundongos, a subunidade que é mais sensível à OUA é a $\alpha 4$ enquanto a $\alpha 1$ é a menos sensível, ou seja, a concentração de OUA necessária para inibir a isoforma $\alpha 1$ da Na^+, K^+ -ATPase é muito maior do que a necessária para a $\alpha 4$ (26).

No caso das células do sistema nervoso central (SNC), os neurônios possuem as isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 3$, enquanto as células da glia possuem as isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (27).

A deficiência das isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ no SNC de camundongos pode resultar em déficit de memória e aprendizado revelando a importância da Na^+, K^+ -ATPase no funcionamento das vias associadas a memória espacial. Assim como a deficiência da isoforma $\alpha 1$ aumenta a resposta locomotora à metanfetamina e aumenta a concentração basal de corticosterona (28).

A diferença apresentada entre a expressão, atividade e regulação das isoformas sugere que há uma relevância fisiológica associada a sua distribuição celular no SNC e periférico. Como exemplo, evidências apontam que os astrócitos aumentam a expressão de $\alpha 2$ em resposta a presença de amônia que é considerado um estímulo nocivo ao SNC (29). Logo, cada subunidade possui diferentes funções e resposta diferenciada no organismo à um mesmo estímulo.

1.3 Ouabaína (OUA)

A OUA (Figura 1) é um glicosídeo cardiotônico que pode ser extraído da planta *Strophantus gratus* sendo descrita como um novo hormônio. Evidências demonstram presença de imunoreatividade para OUA em quase todos os tecidos, incluindo o plasma, mas os níveis mais elevados foram encontrados na adrenal, pituitária e hipotálamo (30, 31), embora pouco se saiba a respeito da função fisiológica da OUA no organismo.

Figura1- Estrutura química da OUA

Fonte: Adaptado de Bagrov et al., 2009 (39).

Na terapêutica os glicosídeos cardiotônicos são utilizados em casos de insuficiência cardíaca congestiva, pois em altas doses são capazes de inibir a Na^+/K^+ -ATPase e assim há um aumento de íons Na^+ intracelular o que leva a perda do gradiente de concentração, garantindo a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, maior aporte de íons cálcio intracelular e como consequência um aumento da contractilidade cardíaca (32).

Como a OUA é sintetizada no próprio organismo, ela provavelmente possui alguma função fisiológica importante (33, 34), pois quando a OUA se liga a Na^+/K^+ -ATPase em astrócitos hipocâmpais, ela provoca oscilações de cálcio que podem ativar o IP3R (receptor de trifosfato inositol) e fatores de transcrição como o NF- κ B (fator nuclear associado a cadeia leve kappa do linfócito B) que é importante no desenvolvimento celular.

Além disso, durante a fase de desenvolvimento fetal, os níveis de OUA se encontram elevados (33). Foi descoberto recentemente que a Na^+/K^+ -ATPase é responsável pelo controle do movimento dos olhos durante o sono REM, quando a Na^+/K^+ -ATPase está inibida, não há o movimento rápido dos olhos (35).

Nos últimos anos, entretanto, vários trabalhos têm procurado investigar os mecanismos moleculares através dos quais a enzima é capaz de atuar como um receptor que modula a função de diferentes proteínas intracelulares (36, 37).

Estudos realizados em cardiomiócitos demonstraram que a Na⁺,K⁺-ATPase possui múltiplos parceiros de sinalização e que a OUA ativa várias vias de sinalização para enviar mensagens para várias organelas intracelulares via regulação da interação entre a enzima e outras proteínas de membrana ou presentes no citoplasma das células (38, 39).

As vias de sinalização que são rapidamente ativadas pela interação da OUA com a enzima Na⁺,K⁺-ATPase, e que são independentes das alterações nas concentrações intracelulares de Na⁺, K⁺, incluem a ativação da Src, com consequente transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), recrutando o Shc (proteínas contendo domínio SH-2), Grb2 (proteína 2 ligada ao receptor fator de crescimento), Sos (um fator de troca do nucleotídeo guanina) com consequente ativação da Ras (38).

A ativação da Ras leva a um aumento da geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) através de uma via desconhecida que parece envolver a ativação da cascata da ERK. Através desta via ocorre ativação de vários fatores de transcrição, tais como, AP-1 (ativador de proteína 1), CREB (elemento responsivo ao AMPc) e NF-κB, os quais estão associados a expressão de inúmeros fatores neurotróficos e citocinas, além de proteínas, tais como a subunidade α3 da enzima Na⁺,K⁺-ATPase e fator natriurético atrial (36, 38).

Estudos recentes no nosso laboratório mostram que a administração intrahipocampal de baixas doses de OUA ativam o NF-κB e que parte desse efeito está associado com uma possível interação entre a Na⁺,K⁺-ATPase e o receptor de NMDA (N-metil D-aspartato), uma vez que o MK-801(antagonista da atividade funcional do canal associado ao NMDA) foi capaz de reverter este efeito. Além da ativação do NF-κB, há também um aumento dos níveis de RNAm de *Bdnf* (fator neurotrófico derivado do encéfalo), *NOSi* (óxido nítrico sintase induzida), *Tnf* (fator de necrose tumoral) e *Bcl-2*, sugerindo que este hormônio pode modular genes envolvidos na sinalização inflamatória e das neurotrofinas no SNC (40).

Outro estudo do nosso laboratório confirmou estas evidências *in vitro* e avançou no estudo dos mecanismos intracelulares na medida em que mostrou que em cultura neuronais cerebelares de ratos, a OUA (10uM) ativa o NF-κB (os dímeros p50/p65 e p65/p65) que aumenta os níveis de RNAm de *Tnf*, *IL-1β* (interleucina 1 β) e *Bdnf*. Com o uso de inibidores, foi possível verificar que essa ativação ocorre devido a cascata NMDA-Src-Ras-ERK (41).

Figura 2 - Esquema da cascata de sinalização ativada pela OUA no SNC e sua possível interação com o receptor de NMDA.

Fonte: Kawamoto et al., 2012 (40).

Um estudo em células epiteliais do túbulo proximal do rim demonstrou que este glicosídeo cardiotônico, em doses que causam somente inibição parcial da Na⁺,K⁺-ATPase, atua como um indutor biológico de oscilações regulares de baixa frequência do cálcio intracelular que permitem ativação do fator de transcrição NF-κB (9).

O interessante é que este efeito requer uma interação entre o transporte de cálcio localizado na membrana plasmática com os estoques de cálcio intracelulares. O elemento chave deste processo é a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e o influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. O cálcio é um importante segundo mensageiro intracelular, pois pode estimular a liberação de cálcio do retículo endoplasmático em um processo denominado CICR (*Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*) (36, 42).

Assim, acredita-se que, na verdade, a enzima Na⁺,K⁺-ATPase apresenta dois *pools* distintos. Um destes *pools* está associado às propriedades de transporte de íons Na⁺ e K⁺, enquanto que o outro altera a interação proteína-proteína, levando à ativação de vias independentes dos íons Na⁺ e K⁺ (38).

1.4 NF- κ B

Descoberto em 1986, o NF- κ B é um fator de transcrição que uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeo (LPS), possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (43). Este fator é um dímero, geralmente constituído pelas subunidades p65 (também chamada RelA) e p50 (44, 45). Além destas subunidades, outras foram descritas, tais como a c-Rel, RelB, e p52, e muito provavelmente, diferentes tipos de combinações ativam ou bloqueiam a expressão de genes distintos, como os homodímeros inibitórios p50/p50 e p52/p52 (46).

O fator de transcrição NF- κ B é evolutivamente conservado, tendo sua ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma vasta gama de efeitos devido aos variados estímulos que o ativam e fenômenos que regula.

Entre estes estímulos estão neurotransmissores (por exemplo glutamato), neurotrofinas, proteínas como a β -amilóide, citocinas (IL-1 β e TNF), glicocorticóides, peptídeo natriurético atrial, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como da NOSi e da ciclooxygenase tipo 2 (COX-2) (47).

Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I κ B. Este complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. A fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação do citoplasma para o núcleo (44, 48).

Vários estímulos levam a fosforilação do I κ B, fundamental para sua degradação. A proteína I κ B fosforilada recebe ação da ubiquitina ligase, e em seguida é degradada nos proteossomas liberando o NF- κ B. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinase específicas que fosforilam os seus sítios serina nas posições 32 e 36 com a consequente degradação pelo proteossoma 26S (49, 50).

Esta fosforilação é feita principalmente pelo complexo I κ B quinase (IKK), que contém duas subunidades com propriedades de quinase, IKK α e IKK β (51). O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o

núcleo, com consequente ligação deste nos genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, o que leva a um aumento (ou uma repressão) na expressão do gene alvo (46).

Todas as subunidades do NF- κ B possuem um domínio em comum chamado RHD (domínio de homologia Rel) o qual é responsável pela ligação com o DNA e dimerização. Porém, apenas RelA, RelB e c-Rel possui o domínio de transativação (TADs) que ativa é capaz de ativar a transcrição. Enquanto que as subunidades p50 e p52 interagem com BCL-3 (faz parte da família do I κ B) que é nuclear e atua como um co-ativador transcricional (Figura 3) (52).

Figura 3 - Representação das subunidades do NF- κ B :RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 e p52/p100. Mostrando a presença do domínio RHD em todas as subunidades e a apenas as subunidades RelA, RelB, c-Rel tem o domínio C-terminal (TADs) que ativa é capaz de ativar a transcrição.

Fonte: Adaptado de Perkins, 2007 (52).

O interesse crescente no estudo deste fator de transcrição decorre da enorme quantidade de genes e processos celulares que o NF- κ B regula, tais como: desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular. Entre os genes regulados podemos citar: os envolvidos na síntese de enzimas, como a NOS e COX-2 induzíveis, e da enzima de defesa antioxidante superóxido dismutase (SOD); interleucinas, TNF, moléculas de superfície celular, α 3-Na,K-ATPase, complexos de histocompatibilidade de classe I e II; proteínas de fase-aguda, tais como, amiloide série A, além da proteína I κ B α .

Adiciona-se a este amplo espectro de ação o fato de que vários genes virais são regulados pelo NF- κ B, como por exemplo, os do vírus de imunodeficiência humana, relevante para o estudo de disfunções associadas à Síndrome da imunodeficiência adquirida (47, 53).

No SNC, o NF- κ B pode ser encontrado em duas formas: uma constitutiva, presente em muitos neurônios e outra induzível (também presente em neurônios e em células da glia). A forma constitutiva, que desempenha uma regulação constante é também responsável pela ativação de certos genes em culturas neuronais primárias (54, 55).

Concentrações de glutamato da ordem de nanomolar (as quais não são tóxicas) são suficientes para ativar o NF- κ B, propondo uma função na transmissão sináptica glutamatérgica. Ambos os receptores do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e AMPA/Cainato são capazes de ativar o NF- κ B.

Foi descoberto também que o NF- κ B regula a formação da memória espacial, a transmissão sináptica e a plasticidade. A inibição do NF- κ B leva a diminuição na fosforilação do fator de transcrição CREB que tem como função a transdução de sinais sinápticos em neurônios (56).

No sistema nervoso há evidências que suportam a dupla função do NF- κ B nas doenças neurodegenerativas, a ativação do NF- κ B nos neurônios promove a sobrevivência, enquanto a ativação na glia e nas células imunes medeiam processos inflamatórios patológicos (57). Em células PC12, o NF- κ B promove a morte celular no tratamento com cocaína através do aumento da fragmentação do DNA e ativação da caspase-3 (58). Porém, na cultura cerebelar de ratos, doses subletais do peptídeo β -amilóide ativa o NF- κ B o que mostra uma resposta adaptativa ao estresse causado pelo β -amilóide o que aponta para uma ação neuroprotetora do NF- κ B relacionada com o receptor de NMDA, Src, Ras, ERK e PI3K/Akt (59). O efeito neuroprotetor do NMDA em cultura de células de cerebelo que ativa o BDNF ocorre devido a ativação do NF- κ B (60).

1.5 Sinalização da glia na presença de LPS

O LPS é um lipopolissacarídeo de membrana de bactéria gram negativa que é liberado de forma livre ou em agregados com proteínas de superfície quando a bactéria se multiplica ou morre.

O mecanismo básico do LPS é que os agregados de LPS são dissociados pela LBP (*LPS-protein binding*) para formar o complexo LPS/LBP. Este complexo é transferido para o mCD14 (CD14 de membrana) presente em monócitos, levando a ativação celular ou transferido para a sCD14 (CD14 solúvel) presente no sangue e em fluidos.

Toll-like receptor 4 (TLR4) é o receptor que reconhece o LPS e é considerado a molécula de reconhecimento do sistema imune inato. A sinalização pelo TLR4 ocorre pelo recrutamento sequencial de uma molécula adaptativa MyD88 e a quinase do receptor associado a IL-1 (IRAK). A sinalização de LPS ocorre de maneira bem similar a sinalização de IL-1. O MyD88 citoplasmático se liga ao complexo Toll/interações Toll. Essa ligação é seguida do recrutamento do IRAK para o complexo (Figura 4).

O IRAK dissocia-se do receptor e interage com o receptor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6) o que resulta na ativação celular através do NF- κ B e a quinase Jun N- terminal/proteína quinase ativada pelo estresse (JNK/SAP) os quais são sistemas responsáveis pela ativação de diversos genes inflamatórios (Figura 4). Logo, o LPS é uma molécula capaz de causar inflamação e também apoptose.

As células da glia antes eram conhecidas apenas como células de sustentação, porém, as suas funções são muito mais importantes, estando associadas com a manutenção da integridade funcional dos neurônios através da proteção, reparação, regeneração de neurônios, e produção da mielina (61).

As células da glia podem ser divididas em 3 tipos: astrócitos, microglia e oligodendrócitos.

As células mais importantes do ponto de vista inflamatório são a microglia e os astrócitos. A microglia é responsável pela resposta imune inata e adaptativa no SNC. Os astrócitos são responsáveis pela captura de neurotransmissores, modulação da entrada de monócitos e linfócitos pela barreira hematoencefálica e pelo fornecimento de nutrientes aos neurônios como lactato e fatores de crescimento (62).

Os astrócitos possuem o fator de histocompatibilidade I e II o que demonstra a sua capacidade de apresentação de antígenos e de produzir diversas citocinas como IL-1 β e TNF e com isso a sua participação na neuroinflamação (63).

Em culturas de astrócitos de ratos foi descoberto que baixas doses de amônia, que é um estímulo nocivo ao cérebro e um indicativo de falência renal, aumenta a produção de compostos semelhantes à OUA (*ouabain-like*), com consequente inibição da atividade Na⁺,K⁺-ATPase (29, 64).

Os compostos *ouabain-like* se ligam a Na⁺,K⁺-ATPase, ativando a Src que estimula o receptor de tirosina quinase do receptor EGF, como consequência a ativação de Ras, Raf via MEK e a fosforilação de ERK(1/2) e também há um aumento na expressão da isoforma $\alpha 2$ -Na⁺,K⁺-ATPase, o que demonstra que provavelmente a isoforma $\alpha 2$ -Na⁺,K⁺-ATPase tem uma função protetora frente a um estímulo nocivo.

Figura 4 - Esquema mostrando a ação do LPS a partir do TRL4.

O LPS interage com a LBP formando um complexo com a proteína CD14 que interage com o TRL4 que

leva ao recrutamento MyD88 e IRAK. O IRAK se dissocia e interage com a TRAF6 que resulta na ativação do NF- κ B e a Jun/Fos que leva a ativação de diversos genes inflamatórios (65).

1.6 RNA de interferência (RNAi)

A descoberta recente do RNAi, um mecanismo de regulação de genes conservados em plantas e em células mamárias revolucionou as oportunidades de estudar modelos biológicos e também de encontrar novas formas de tratar doenças. O RNAi tem várias vantagens como alta especificidade (com apenas uma mutação é possível alterar o silenciamento), versatilidade e eficiência (que pode chegar até à 90%) (66).

Existem 3 tipos de RNAs: *short interfering RNA* (siRNA), micro RNA(miRNA) e piRNA, sendo os 3 tipos presentes em animais. Os siRNA e miRNA são compostos de 21-25 nucleotídeos, originados de RNA longo de dupla-fita(dsRNA) e também chamados de RNA não-codificadores. No caso do miRNA, no núcleo é formado o Pri-miRNA que é processada pela Drosha e transformada em Pre-miRNA (short hairpin) que é transportado para o citoplasma pela exportina 5 (67).

Figura 5 - Esquema do mecanismo de atuação do siRNA

A célula reconhece esse dsRNA ou o Pre-miRNA e uma RNAase dependente de ATP nomeada Dicer (membro da família RNAse III das

endonucleases específicas de dsRNA) quebra o dsRNA longo em vários siRNAs que serão transferidos para um complexo indutor de silenciamento do RNA (RISC).

No complexo, o siRNA interage com a proteína argonaute que também faz parte da RISC e junto com o siRNA são essenciais para o silenciamento. A fita anti-senso do siRNA guia o complexo RISC até um mRNA com a sequência complementar e a argonaute cliva a sequência da mRNA o que leva a sua degradação e impede a tradução (68, 69).

2 JUSTIFICATIVA

Mutações na subunidade α da proteína $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPase}$ no SNC tem como resultado doenças como parkinsonismo genético, enxaqueca e hipertensão. Diante disso, assume relevância determinar a função das isoformas da subunidade α na sinalização inflamatória desencadeada pelo LPS no SNC, uma vez que a neuroinflamação está presente em doenças neurodegenerativas como na doença de Parkinson e Alzheimer.

A células da glia são as células mais adequadas para o estudo pois elas tem uma função essencial na neuroinflamação, devido a liberação de citocinas e por participar da resposta imune inata e adaptativa. Além disso, existem relatos que os astrócitos aumentam a expressão de $\alpha 2$ em resposta a presença de amônia, um estímulo nocivo para o cérebro.

A OUA é considerada um hormônio endógeno que é capaz de inibir a atividade enzimática da $\text{Na}^+,\text{K}^+\text{-ATPase}$ e também de ativar cascatas de sinalização como a Src-Ras-ERK que podem gerar um efeito protetor nas células da glia. Logo, a OUA pode ter uma função importante na neuroproteção, que pode ser mediada pelas células da glia.

3 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo avaliar a função das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ - Na^+, K^+ -ATPase na sinalização celular desencadeada pela presença de baixas doses de OUA em cultura de células da glia de camundongos frente a um estímulo inflamatório como o LPS que é uma endotoxina bacteriana (Fig. 6).

Figura 6 - Esquema relacionando as cascatas ativadas pela OUA e LPS.

A OUA ao interagir com a Na^+, K^+ -ATPase ativa cascatas de sinalização como a cascata Src-Ras-Raf-ERK e ativa a PI3K que ativa a Akt. Provavelmente essas cascatas interferem na translocação do NF- κ B para o núcleo ou na alteração das subunidades do NF- κ B que são translocadas para o núcleo, alterando a transcrição de genes pró-inflamatórios, gerando uma proteção celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células da glia de córtex

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados camundongos neonatos machos da linhagem C57BL/6, entre 1 e 4 dias de idade, provenientes do Biotério Central do ICB-USP. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-22° C) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

A cultura mista (astrócitos + microglia) de glia foi preparada a partir do córtex do cérebro de camundongo neonato de 1 a 4 dias. Os camundongos foram decapitados, os cérebros rapidamente retirados e os tecidos corticais foram isolados dos vasos sanguíneos e meninges, lavados em HBSS (Hank's balanced salt solution), dissociado na presença de tripsina (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e ressuspendido em DMEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 100 unidades/mL de penicilina e 100 µl/mL estreptomicina (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a 37 °C em 5% CO₂.

As células foram plaqueadas num frasco de 75 cm² após 3 a 4 dias, as culturas foram lavadas com DMEM para remover os debris celulares e depois foram mantidas até atingirem a confluência, com troca de meio a cada 3 dias. Os experimentos foram realizados nas culturas após 14 dias do plaqueamento. Dois dias antes do tratamento as células foram plaqueadas em placa de 100 mm (1 x 10⁶ células/poço).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e seguiram todas as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo foi registrado sob nº 037 nas folhas 101 do livro 02 para uso de animais em experimentação.

4.2 Ensaio de imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado de acordo com Kawamoto et al (59). Brevemente, após o tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS gelado e depois foram fixadas com metanol 100% gelado. Para a permeabilização das células, estas foram lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos (min) e incubadas com PBS + Triton X-100 0,01% por 5 min. O soro de bloqueio (5% de soro normal de burro em PBS + Triton X-100 0,01%) foi aplicado durante 1 hora à temperatura ambiente (TA).

Posteriormente, foi adicionado o anticorpo primário ($\alpha 1$ e $\alpha 2$ Na^+ , K^+ -ATPase na diluição de 1:25, MAP2 1:400, Ibal 1:500 e GFAP 1:1000) em soro de bloqueio e incubado *overnight* à 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com soro de bloqueio e foi incubado o anticorpo secundário (AlexaFluor 488 e 594) em PBS + Triton X-100 0,01% por 2 horas protegido da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com DAPI (Sigma) (marcador nuclear) na diluição 1:100000 em PBS + Triton X-100 0,01% durante 15 min. As células foram novamente lavadas com PBS por 10 min (2 vezes) e as lâminas foram montadas com fluormount-G*(Sigma) e depois de secas foram seladas com esmalte e observadas no microscópio (Nikon H550L).

4.3 Tratamento das células da glia

O meio com SFB foi trocado pelo meio sem soro e tratadas com diferentes doses de OUA (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM e 300 μM) durante 15 minutos, 1, 6 e 24 horas e de LPS (1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 1, 2, 6 e 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e estocadas no freezer -80 °C para uso posterior. Para cada poço da placa 48 foi utilizado 600 μL (volume capaz de cobrir todas as células) de solução de OUA, meio sem soro ou LPS. Na placa de 6 poços foi utilizado o volume de 2 mL para o tratamento.

4.4 Transfecção do RNAi das células da glia

As células da glia foram plaqueadas ($0,7 \times 10^6$ células) em placa de 60 mm e incubadas por 1 dia a 37 °C em 5% CO₂. Após a incubação, o meio DMEM com SFB foi descartado e substituído por meio Opti-MEM (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, as células foram transfectadas com 5 uL de 3 sequências de RNAi da isoforma $\alpha 2$ - Na⁺, K⁺- ATPase (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e foi utilizado o mesmo volume de Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Como controle negativo da transfecção foi utilizado o controle negativo (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) que é uma sequência aleatória (“scramble”) que gera nenhum efeito na célula o que a torna um ótimo grupo controle para os experimentos com siRNA.

Após 6 horas de incubação a 37 °C em 5% CO₂, o meio foi substituído por DMEM + 10% SBF e incubado a 37 °C em 5% CO₂ por 3 dias.

4.5 Viabilidade celular

Tanto o ensaio de MTT como de LDH foram realizadas em placas de 48 poços e para a análise no espectrofotômetro, o meio para o LDH ou MTT foram transferidos para uma placa de 96 poços. As amostras foram observadas em duplicata.

4.5.1 Ensaio de viabilidade celular: redução de formazan colorido (MTT)

O ensaio de MTT foi realizado como descrito previamente (70). Este método é baseado na habilidade de células viáveis de converter o sal tetrazolium (MTT) em formazan colorido. A viabilidade de células submetidas aos diferentes tipos de tratamento foi determinada pela adição de MTT (12 mM) na cultura celular. Após 2 horas e 30 min de incubação a 37 °C, os cristais escuros formados foram dissolvidos adicionando dimetil sulfoxido (DMSO) e a absorbância foi medida por um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm.

O cálculo para MTT tem sua normalização através da subtração do valor do branco (poço com DMSO que é o veículo) para todas as amostras e depois todas as amostras são divididas pelo grupo controle (corrigido com o valor do branco) e a relação é transformada em porcentagem.

$$\% \text{ viabilidade celular} = (At - Ab) / (Ac - Ab) \times 100$$

Sendo At = absorbância do grupo tratado

Ab = absorbância do branco (DMSO)

Ac = absorbância do grupo controle

4.5.2 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da Lactato desidrogenase foi medida pelo kit de detecção de Cytotox96 (Promega, Agora, WI, EUA). Este kit permite a realização de um ensaio colorimétrico para a quantificação de morte celular e lise de células, baseado na medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol de células danificadas para o sobrenadante. Este ensaio consiste na conversão do sal cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazólio em formazan.

A reação é catalisada pelo LDH liberado do citosol pelas células e diaforase, um substrato presente no kit. Foram adicionados 50 µL do substrato do kit a 50 µL do sobrenadante das células. A solução resultante foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida foi realizada a leitura em 490 nm. Cada grupo de tratamento foi realizado em duplicata em cada ensaio.

O cálculo é feito através da média de cada tratamento ou controle dividido pelo controle positivo (reagente do kit) em porcentagem. Como controle positivo (100% de liberação do LDH), as células foram tratadas com 15 µL de solução de lise para cada 100µL de meio de cultura durante 5 minutos.

4.6 Extração de proteínas nucleares

O método que foi utilizado foi descrito por Rong e Baudry (71). As células foram coletadas em PBS gelado e centrifugadas a 2000 xg por 5 minutos a 4 °C e o *pellet* foi ressuspensionado em 40 µL de tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM

EDTA; pirofosfato de sódio 20mM; B-GP 5mM; NAF 30mM e ortovanadato de sódio 5mM) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida 1,0 µL de NP-40 0,5% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 13.000 xg por 10 segundos a 4 °C e o sobrenadante foi mantido para ser utilizado no ensaio de Western Blotting.

O *pellet* foi ressuspendido em 20 µL de tampão de extração (HEPES 20 mM; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; PMSF 0,5 mM pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM; NAF 30 mM e ortovanadato de sódio 5 mM) e incubado 20 minutos em gelo sob agitação, centrifugando o extrato à 13.000 xg por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada, estocando as amostras a – 80 °C.

4.7 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem foi realizada de acordo com Bradford (72) através do reagente de Bradford (Bio-Rad), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão utilizando BSA em diversas concentrações forneceu a concentração de proteínas presentes nas amostras.

4.8 Ensaio de Western Blotting para a expressão das proteínas α2- Na⁺,K-ATPase , p-ERK, t-ERK, RelA e β-actina

Para esse ensaio, foram utilizados os sobrenadantes recolhidos durante a preparação do extrato nuclear. O ensaio de Western blotting que foi usado é baseado no descrito por Laemmli (73). As proteínas foram ajustadas na concentração apropriada para cada uma das proteínas que foram analisadas com o tampão de amostra (0,125M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromophenol blue; pH 6,8) e foram fervidas por 5 minutos a 95 °C. O conteúdo total do meio de reação (20 a 30 µl) foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% {acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS}(2, 74). No mesmo

gel foi adicionado um padrão de peso molecular (Thermo Scientific). Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base; 0,192 M de glicina e 0,1% de SDS.

O gel foi corrido a 90V por 2 horas e em seguida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose por aproximadamente 1 hora e 30 min a 400 mA. Para a transferência foi usado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada.

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada) para verificar a eficiência da transferência, lavadas com água até tirar todo o excesso da solução corante e deixadas 1 hora a TA numa solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água), 5% de leite desnatado e 0,05% de tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo.

Após essa etapa, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário ($\alpha 2$ -Na⁺, K⁺ - ATPase, p-ERK, t-ERK, p65 1:1000 (Millipore, Cell Signalling, Cell Signalling e Santa Cruz) em TTBS (100mM de Tris Base, 0,9% de NaCl 0,1% de Tween 20 e água) *overnight*. As membranas foram então novamente lavadas 5 vezes com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário (1: 2000) por 2 horas e as membranas foram lavadas novamente. A revelação foi feita através do kit de quimioluminescência Immobilon (Millipore).

Após a revelação com ECL, a membrana foi lavada e incubada por 10 minutos com uma solução (*stripping buffer*) contendo 62,5mM Tris-HCl pH 6,7 e 2% SDS pH 2,2. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com TTBS, incubada por pelo menos 1 hora com TTBS e 0,5% de BSA e incubada com anticorpo contra β -actina (1:1000) por para verificar se não houve variação na quantidade de proteína aplicada no gel como controle do experimento por 2hrs. As membranas foram então novamente lavadas 5 vezes com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário (1:4000) por 2 horas. Novamente, a revelação foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham®.

4.9 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA) para o NF- κ B

4.9.1 Marcação da sonda

Os oligonucleotídeos do NF- κ B contendo a sequência 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C – 3' foram marcados com a adição de γ - 32 P ATP numa solução contendo Tampão T₄ quinase (em mM: Tris-HCl 700, pH 7,6; MgCl₂ 100 e DTT 50), T₄ quinase e água ultra-pura; nas seguintes concentrações: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T₄ quinase, 1 μ L de γ - 32 P ATP (3 Ci/mmol), 1 μ L de tampão T₄ Kinase Buffer (10 X) em 10 μ L de volume de reação). Após incubação à 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ - 32 P 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 sobrenadante foi recolhido e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/ μ L.

4.9.2 Reação de Ligação e corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20 %), extrato nuclear (10 μ g de proteína) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final. O tubo foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μ L) e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μ L de azul de bromofenol ao controle (-).

O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5 % (acrilamida/bisacrilamida [37,5:1]). Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida que consiste em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). A corrida durou 2 horas a 150-160 V. Ao final desta, o gel foi seco e ficou fixado em um papel filtro especial. Para revelar os resultados, um filme de raios-X foi exposto mediante ao papel filtro contendo a corrida, em cassete a -80 °C. Além do ensaio de EMSA, foi realizado também o ensaio de competição,

adicionando-se quantidades de oligonucleotídeos não-marcados 10 vezes em excesso e um oligonucleotídeo não-específico (TFIID) (Promega, Madison, WI, USA) não-marcado 20 vezes em excesso para o NF- κ B.

Para o ensaio de *supershift* do gel de retardo foram adicionados os anticorpos específicos às subunidades que compõe o complexo NF- κ B durante a incubação do extrato nuclear com o oligonucleotídeo contendo a sequência específica para o NF- κ B. Foram utilizados anticorpos (1 μ L) contra as subunidades p50, p65 e cRel (Millipore, Temecula, CA, EUA).

4.10 Análise dos resultados

Os dados decorrentes do ensaio de Western Blotting e EMSA foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando sistema de detecção ImageJ (NIH), considerando o resultado reprodutível a partir de três replicações nítidas com lotes diferentes de experimentos. Os dados de Western Blotting, EMSA e imunofluorescência receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls, onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da cultura primária de células da glia de córtex de camundongo

A caracterização da cultura é necessária para avaliar se não existe presença de outras células nessa cultura, como neurônios, e para determinar a proporção de astrócitos e microglia nessa cultura e a presença das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da Na^+ , K^+ -ATPase (n=5).

Para observar se havia a presença de neurônios foi necessário avaliar a presença de MAP 2 (marcador de neurônio) . Os dados mostraram que não foi possível observar a presença de neurônios o que já era esperado, pois após os 14 dias num meio sem B27 (suplemento para neurônios), os neurônios não seriam capazes de sobreviver (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-MAP2 e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-MAP2 demonstrando a ausência de neurônios na cultura de glia; (C) Imagens sobrepostas de A e B, evidenciando a ausência de neurônios na cultura de glia. Escala : 50 μM .

Para caracterizar a cultura de células, foi realizada a marcação das principais células da glia com anti-Iba1 (marcador de micróglia) e anti-GFAP (marcador de astrócitos). No total foram avaliadas 5 culturas diferentes para observar qual a proporção entre essas duas marcações e se há outras células que não correspondem a nenhuma das marcações, que podem ser fibroblastos (que podem ser provenientes da meninge que não foi totalmente retirada) ou oligodendrócitos (um outro tipo de célula da glia).

Na cultura, foram encontrados 91,6% de células de glia sendo 51,9% astrócitos e 48,1% micróglia (porcentagem em relação a quantidade total de células da glia) e 8,4% corresponde à outros tipos celulares (sem marcação para Iba1 ou GFAP) (figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografias da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-Iba1 e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-Iba1, mostrando a presença de micróglia; (C) A imunorreatividade ao anti-GFAP, mostrando a presença de astrócitos; (D) Imagens sobrepostas de A, B e C, evidenciando a presença de grande quantidade de astrócitos e micróglia na cultura de glia. Escala : 50 μ M.

Como foi realizado o silenciamento da isoforma $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ - ATPase, foi necessário saber se na cultura de glia, tanto a micróglia quanto o astrócito expressam as duas isoformas: $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ - ATPase e $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ - ATPase, pois dados na literatura geralmente dizem que há $\alpha 1$ e $\alpha 2$ nas células da glia (Juhaszova & Blaustein,1997), mas poderia ser que apenas um dos tipos celulares estudados possuíssem as duas isoformas o que poderia ter como consequência

alterações significativas no silenciamento e no tratamento. Na vigência dessa diferença, seria essencial separar os tipos celulares, mas como os dois tipos celulares apresentaram as duas isoformas, não foi necessário uma separação dos diferentes tipos celulares na cultura, representados nas figuras 9,10, 11 e 12.

Figura 9 - Fotomicrografias da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti- $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -ATPase e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-GFAP; (C) A imunorreatividade ao anti- $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -ATPase, demonstrando a presença da isoforma $\alpha 1$ em astrócitos, (D) Imagens sobrepostas de A, B e C, evidenciando a presença da isoforma $\alpha 1$ em astrócitos. Escala : 50 μM .

Figura 10 - Fotomicrografias da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti- $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ -ATPase e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-GFAP; (C) A imunorreatividade ao anti- $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ -ATPase, demonstrando a presença da isoforma $\alpha 2$ em astrócitos; (D) Imagens sobrepostas de A, B e C, evidenciando a presença da isoforma $\alpha 2$ em astrócitos. Escala : 50 μM .

Figura 11 - Fotomicrografias da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-Iba1, anti- $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -ATPase e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-Iba1; (C) A imunorreatividade ao anti- $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -ATPase, demonstrando a presença da isoforma $\alpha 1$ em microglia. D. Imagens sobrepostas de A, B e C, evidenciando a presença da isoforma $\alpha 1$ em microglia. Escala : 50 μM .

Figura 12 - Fotomicrografias da cultura primária de glia submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-Iba1, anti- $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ -ATPase e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-Iba1; (C) A imunorreatividade ao anti- $\alpha 2$ - Na^+ , K^+ -ATPase, demonstrando a presença da isoforma $\alpha 2$ em microglia; (D) Imagens sobrepostas de A, B e C, evidenciando a presença da isoforma $\alpha 2$ em microglia. Escala : 50 μM .

5.2 Ensaios de viabilidade celular: MTT e LDH

Os ensaios de viabilidade foram realizados para escolher quais doses de OUA e LPS poderiam ser utilizadas sem que ocorressem alterações significativas na viabilidade celular.

A dosagem de LDH, que catalisa a oxidação reversível do lactato para piruvato, liberada devido a lise celular, é um dos métodos utilizados para avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade. Nos ensaios de LDH, nenhuma das concentrações de OUA estudadas (1 nM-300 μM) alteraram a viabilidade celular de

forma significativa em relação ao controle em 24 e 48 horas que são apresentados nas figuras 13 e 14. Logo, qualquer concentração estudada poderia ser utilizada para avaliar os efeitos da OUA nas células com ou sem o silenciamento da isoforma $\alpha 2$ - Na^+,K^+ -ATPase.

Figura 13 - Liberação de LDH no meio de incubação das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo tratadas com diferentes concentrações de OUA (1 nM-300 μM) em 24 horas.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls não mostrou diferenças significativas entre os grupos tratados em relação ao controle. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais.

Figura 14 - Liberação de LDH no meio de incubação das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo tratadas com diferentes concentrações de OUA (1 nM-300 μ M) em 48 horas.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls não mostrou diferenças significativas entre os grupos tratados em relação ao controle. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais.

Também é importante realizar mais de um ensaio de viabilidade para confirmar os dados encontrados no LDH, por essa razão o ensaio de MTT foi escolhido por avaliar principalmente o metabolismo celular, pois a redutase mitocondrial transforma o MTT em formazan, que quando dissolvido em DMSO libera uma coloração roxa ($\lambda = 570$).

Os resultados obtidos e apresentados nas Figuras 15 e 16 permitem observar que algumas concentrações de OUA (1 nM, 3 nM e 300 nM) aumentam o metabolismo celular em relação ao controle, mostrando que provavelmente a OUA é capaz de alterar o metabolismo celular. Assim, no intervalo de 24 horas existem diferenças entre algumas concentrações com relação ao controle, mas nenhuma delas apresenta uma porcentagem menor que a encontrada no grupo controle, o que garante que todas as amostras podem ser utilizadas para os experimentos. No grupo de 48 horas não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle.

Figura 15 - Resultados (normalizados pelo controle em porcentagem) para o ensaio de MTT das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo tratadas com diferentes concentrações de OUA (1 nM-300 μ M) no intervalo de 24 horas.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls mostrou diferenças significativas com relação ao grupo 1 nM ($p < 0,05$, vs controle e 300 μ M), com relação ao grupo 3 nM ($p < 0,05$, vs controle e 300 μ M) e com relação ao grupo 300 nM ($P < 0,05$, vs controle e 300 μ M). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais.

Figura 16 - Resultados (normalizados pelo controle em porcentagem) para o ensaio de MTT das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo tratadas com diferentes concentrações de OUA (1 nM-300 μ M) no intervalo de 48 horas.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls não mostrou diferenças significativas entre os grupos tratados, reforçando os dados obtidos no ensaio de liberação de LDH em que

também não ocorreram diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais.

A padronização do LPS foi realizada com 5 concentrações diferentes: 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/mL e 10 μ g/mL. Sendo que somente no ensaio de LDH a concentração de 1 μ g/mL é diferente de forma significativa do grupo controle, 1 ng/mL, 10 ng/mL e 10 μ g/mL. Porém, no ensaio de MTT não mostrou essa mesma diferença representados na figura 16. O que demonstra que talvez não haja diferença significativa entre os grupos, ou o mecanismo de morte celular não está relacionado a disfunção mitocondrial. Como a concentração de 1 μ g/mL é muito utilizada na literatura (75), ela foi escolhida para os experimentos posteriores. O interessante é que o LPS, assim como a OUA (em algumas doses), é provavelmente capaz de aumentar o metabolismo celular.

Figura 17 - Resultados para o ensaio de liberação de LDH e de MTT (normalizados pelo controle em porcentagem) das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo tratadas com diferentes concentrações de LPS (1ng-10 ug) no intervalo de 24 horas.

Para o ensaio de liberação de LDH, o teste ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas com relação o grupo tratado com 1 μ g/mL de LPS ($p < 0,05$ vs sem tratamento, 1ng/mL, 10ng/mL e 1 μ g/mL). Para o ensaio de MTT, o teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais.

5.3 Padronização de tempo e dose de tratamento

Um dos objetivos do projeto foi escolher a dose de OUA que seria utilizada nos experimentos. Logo, foram escolhidas três concentrações testadas no ensaio de liberação de LDH e MTT: 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M. Da mesma forma, foi necessário padronizar o tempo de tratamento, pois o tempo de tratamento é capaz

de alterar as respostas celulares frente à um estímulo como a OUA. Para isso, foram escolhidos 3 tempos: 15 minutos, 1 hora e 6 horas. A padronização para o tempo também foi realizada para o LPS em 3 tempos diferentes: 1 hora, 2 horas e 6 horas, pois a ativação do NF- κ B (um dos parâmetros que indica a atuação do LPS nas células) pode ser de forma cíclica (76).

Como o LPS é um composto que leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B, a observação da translocação de RelA para o núcleo seria um bom indicador da sinalização desencadeada pelo estímulo inflamatório. Dessa forma, procuramos estabelecer a concentração e o tempo de tratamento para a OUA de forma que a concentração escolhida seria aquela que conseguiria diminuir a translocação do RelA para o núcleo causada pelo LPS.

Nos grupos tratados com meio sem soro ou OUA em diversas concentrações e tempos e posteriormente tratados com LPS durante 1 hora, ocorreram várias diferenças significativas entre os grupos, porém, somente as relações pertinentes para a escolha da dose foram demonstradas. Nossos dados confirmaram que o grupo tratado com LPS induziu uma ativação da translocação nuclear do RelA quando comparado com o grupo controle.

Além disso, podemos notar um bloqueio desse efeito do LPS nos grupos pré-tratados com OUA 10 μ M durante 1 hora, OUA 1 μ M e 100 μ M durante 6 horas. Logo, as doses e tempos estatisticamente diferentes encontrados podem ser usados para o tratamento.

Figura 18 - Tratamento das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo com meio sem soro ou OUA nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M durante 6 horas, 1 hora ou 15 minutos e que posteriormente foram tratadas com LPS durante 1 hora e foi avaliado a translocação da subunidade RelA do NF- κ B através do ensaio de imunofluorescência.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls mostrou algumas diferenças significativas para um $\alpha=0,05$ entre os grupos tratados. Sendo a * vs controle, OUA 10 μ M 1hr, OUA 1 μ M 6hrs, OUA 100 μ M 6hrs, OUA 100 μ M 15 min e OUA 10 μ M 15 min, b * vs controle, OUA 10 μ M 1hr, OUA 1 μ M 6hrs e OUA 100 μ M 6hrs, c * vs controle, OUA 10 μ M 1hr, OUA 1 μ M 6hrs e OUA 100 μ M 6hrs, d * vs controle, OUA 10 μ M 1hr, OUA 1 μ M 6hrs e OUA 100 μ M 6hrs e e,f,g * vs controle (* representa $p<0,05$). Mostrando a diferença entre o grupo LPS em relação ao controle e os grupos OUA 10 μ M durante 1 hora, OUA 1 μ M e 100 μ M durante 6 horas que podem alterar a translocação do RelA causada pelo LPS. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais.

Figura 19 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas apenas com o meio sem soro (controle para o grupo LPS 1hr) submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear.; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF-KB; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando a baixa translocação nuclear do RelA; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala: 50 μ M.

Figura 20 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas apenas com LPS por 1 hora submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF-KB; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma maior translocação nuclear do RelA; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

Figura 21 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas com OUA 1 μ M por 6 horas e LPS por 1 hora submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF-KB; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma menor translocação nuclear do RelA em relação ao grupo LPS 1 hr; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

Figura 22 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas com OUA 100 μ M por 6 horas e LPS por 1 hora submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF-KB; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma menor translocação nuclear do RelA em relação ao grupo LPS 1 hr; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

Figura 23 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas com OUA 10 μ M por 1 hora e LPS por 1 hora submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF-KB; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma menor translocação nuclear do RelA em relação ao grupo LPS 1 hr; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

O mesmo procedimento também foi utilizado para um tratamento com LPS 2 horas, porém, foi encontrada apenas diferenças significativas entre o grupo controle com LPS e OUA 1 μ M por 1 hr o que demonstra que nenhuma dose de OUA foi capaz de reverter o aumento da translocação de p65 causada pelo LPS, mesmo que no gráfico exista uma grande tendência de reversão com o tratamento com OUA. Porém, o grupo tratado com LPS 2 horas não foi utilizado para os tratamentos com as células silenciadas.

Figura 24 - Tratamento das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo com meio sem soro ou OUA nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M durante 6 horas, 1 hora ou 15 minutos e que posteriormente foram tratadas com LPS durante 2 horas e foi avaliado a translocação da subunidade RelA do NF-KB através do ensaio de imunofluorescência.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls mostrou apenas duas diferenças significativas entre os grupos. Sendo * vs controle ($p < 0,05$). Mostrando que nenhum grupo tratado com OUA diminuiu a translocação de RelA causada pelo LPS. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais.

Nos grupos tratados com LPS por 6 horas ocorreram diferenças significativas entre o grupo LPS com relação aos grupos OUA 10 μ M 6 horas, OUA 1 μ M 15 minutos e controle. Isso demonstra a possibilidade de usar o grupo OUA 10 μ M 6 horas e OUA 1 μ M 15 minutos como escolha para o tratamento.

Figura 25 - Tratamento das células de cultura primária de glia de córtex de camundongo com meio sem soro ou OUA nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M durante 6 horas, 1 hora ou 15 minutos e que posteriormente foram tratadas com LPS durante 6 horas e foi avaliado a translocação da subunidade p65 do NF- κ B através do ensaio de imunofluorescência.

O teste ANOVA de uma via seguido do teste Newman-Keuls mostrou algumas diferenças significativas entre os grupos tratados. Sendo a * vs OUA 10 μ M 1hr, LPS, OUA 100 μ M 1hr, OUA 1 μ M 6hrs e OUA 10 μ M 15 min, b * vs controle, OUA 10 μ M 1hr, LPS, OUA 100 μ M 1hr, OUA 1 μ M 6hrs e OUA 10 μ M 15 min, c * vs controle, d * vs controle (* representa $p < 0,05$). Mostrando a diferença entre o grupo LPS em relação ao controle e os grupos OUA 10 μ M durante 6 horas e OUA 1 μ M durante 15 minutos que podem alterar a translocação do RelA causada pelo LPS. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais.

Figura 26 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas apenas com o meio sem soro (controle para o grupo LPS 6hrs) submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF- κ B; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma baixa translocação nuclear do RelA; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

Figura 27 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas apenas com LPS por 6 horas submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF- κ B; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma maior translocação nuclear do RelA; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

Figura 28 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas com OUA 10 μ M por 6 horas e LPS por 6 horas submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF-Kb; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma menor translocação nuclear do RelA em relação ao grupo LPS 6 horas; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Barra de escala : 50 μ M.

Figura 29 - Fotomicrografias da cultura primária de glia tratadas com OUA 1 μ M por 15 minutos e LPS por 6 horas submetido à imunofluorescência com anticorpo anti-GFAP, anti-RelA e marcador nuclear DAPI.

(A) A imunorreatividade ao DAPI, marcador nuclear; (B) A imunorreatividade ao anti-RelA, que é uma das subunidades do NF- κ B; (C) Imagens A e B sobrepostas, mostrando uma menor translocação nuclear do RelA em relação ao grupo LPS 6 horas; (D) Imagens sobrepostas de A e B com a imunorreatividade ao anti-GFAP. Escala : 50 μ M.

5.4 Padronização da dose e tempo para OUA com o ensaio de EMSA

A partir do ensaio de EMSA, podemos detectar de forma mais precisa se o NF- κ B está ativa, ou seja, se liga na sua sequência específica e não apenas se há a sua translocação para o núcleo como foi feito anteriormente por imunofluorescência.

Na figura 31, comparamos os grupos controle, LPS 6 horas, OUA 1 μ M 15 minutos e OUA 1 μ M 15 minutos + LPS 6 horas e observamos diferenças significativas tanto para o controle e a OUA 1 μ M 15 minutos com LPS 6 horas e

OUA 1 μ M 15 minutos + LPS 6 horas. Porém, o pré-tratamento com OUA durante 15 minutos não conseguiu reverter a ativação do NF- κ B causada pelo LPS durante 6 horas e essa dose também não alterou a atividade basal do NF- κ B.

Separamos os dados para LPS 1 hora de acordo com a dose de OUA e apenas o grupo pré-tratado com OUA 10 μ M foi capaz de reverter de forma significativa a ativação causada pelo LPS que é demonstrado na Figura 32. Logo, essa será a dose e o tempo que será utilizada para futuros experimentos.

Outro experimento que é necessário no EMSA é o “super-shift” que é uma forma de descobrir quais são as subunidades de NF- κ B que estão envolvidas nessa ativação, além do ensaio de competição, na qual podemos distinguir a banda inespecífica do NF- κ B. Como visto na figura 33, a subunidade p50 está envolvida nesse processo uma vez que ocorre o “supershift da banda original, porém, a subunidade p65 diminui a intensidade da banda original também e isso é indicativo de que também existe a competição do anticorpo pela ligação do p65 (RelA) embora sem o supershift. Vale ainda salientar que tanto o p50 como o RelA são dímeros classicamente envolvidos quando há ativação do NF- κ B pelo LPS (77, 78). O experimento será repetido, pois a banda do cRel apresentou uma modificação o que pode ser um possível envolvimento também dessa subunidade na ativação por LPS.

Figura 30 - Resultados do ensaio de EMSA para o fator de transcrição NF- κ B do tratamento com diversas doses de OUA e tempos diferentes na presença e ausência de LPS (1 μ g/kg).

Mostrando que provavelmente o LPS é capaz de ativar o NF- κ B em relação ao controle e que a OUA é capaz de diminuir essa ativação com um pré-tratamento ao LPS. Sendo (A) o gel de EMSA com todos os grupos e (B) corresponde a quantificação da análise densitométrica da banda NF- κ B normalizada em relação ao controle de cada gel. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais.

Figura 31 - Efeito da OUA (1 μ M por 15 minutos) e LPS (1 μ g/mL por 6 horas).

Quantificação da análise densitométrica da banda NF- κ B normalizada em relação ao controle de cada gel. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais. Sendo que ***vs LPS 6hrs e OUA 1 μ M 15'+LPS 6hrs e** vs LPS 6hrs e OUA 1 μ M 15'+LPS 6hrs ($p < 0,05$) (Análise de variância de uma via seguida do teste de Newman-Keuls). Mostrando que o pré -tratamento com OUA não reverte a ativação causa pelo LPS.

Figura 32 - Efeito da OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora).

Quantificação da análise densitométrica da banda NF- κ B normalizada em relação ao controle de cada gel. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais. Sendo que ***vs controle e OUA 10 μ M 1 hora e ** vs LPS 1hora ($p < 0,05$) (Análise de variância de uma via seguida do teste de Newman-Keuls). Mostrando que o pré-tratamento com OUA 10 μ M por 1 hora é capaz de reverter a ativação causada pelo LPS.

Figura 33 - Ensaio de “super-shift” de células da glia tratadas com LPS (1 µg/mL) por 6 horas.

Gel representativo do supershift. Os extratos nucleares (2,5 µg) foram incubados na presença ou ausência de anticorpos (1 µL) contra as subunidades p50, RelA (p65) e cREL. Os extratos foram incubados na presença ou ausência do oligonucleotídeo frio ou TFIID 10 vezes de excesso molar.

5.5 Silenciamento da isoforma α2 – Na⁺, K⁺- ATPase

Num primeiro momento utilizamos um pool de três plasmídeos que continham, cada um, uma sequência de RNAi da isoforma α2 – Na⁺,K⁺- ATPase (Santa Cruz) para o silenciamento da mesma. Entretanto, após diversas tentativas, não fomos bem sucedidos no silenciamento. Assim, resolvemos utilizar somente o RNAi (somente a sequência) nas células. Com isso obtivemos uma transfecção transiente eficaz comparado com o grupo tratado com uma sequência aleatória que não interfere na expressão de proteínas na célula (esse grupo foi chamado de scramble), como observado na figura 33.

Após o tratamento, a expressão da subunidade α2 - Na⁺,K⁺-ATPase nas células de glia foi observada pelo ensaio de Western Blotting.

Figura 34 - Resultados do tratamento com a sequência scramble e com RNAi em células da glia na expressão da $\alpha 2$ -Na⁺,K⁺-ATPase.

(A) Radiografia com bandas representativas dos tratamentos; (B) Análise densitométrica em unidades arbitrárias. Mostrando que o tratamento com RNAi foi eficaz na diminuição da expressão da proteína em relação ao grupo scramble e pode ser utilizado para experimentos futuros como ferramenta de silenciamento. Sendo que *vs scramble ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais e analisados com teste t não pareado.

5.6 Alteração da via de sinalização da proteína ERK

Para verificar se os tratamentos com OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora) são capazes de modular a via de sinalização da ERK, foi realizado o ensaio de Western Blotting com as proteínas do extrato citosólico e foi observado que no grupo scramble, o tratamento com LPS aumentou a fosforilação da ERK e consequentemente, a sua atividade (Figura 35).

Esse aumento é estatisticamente significativo em comparação com os outros grupos (controle, OUA e OUA+LPS). Porém, essa diferença não é encontrada nas células silenciadas, como mostrado na figura 36. Além disso, cada tratamento foi comparado entre os grupos scramble e RNAi. No tratamento com OUA, o silenciamento aumentou a fosforilação da ERK enquanto que no tratamento com LPS, houve uma diminuição da fosforilação (Figura 37).

Figura 35 - Resultados dos tratamentos de OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora) nas células da glia tratadas previamente com a sequência scramble na fosforilação da ERK.

Os dados foram avaliados na relação entre a fração fosforilada da ERK e a fração total da ERK. Sendo (A) Radiografia com bandas representativas dos tratamentos e (B) Análise densitométrica em unidades arbitrárias. Mostrando que o tratamento com LPS aumenta a relação pERK/Total ERK em relação aos outros tratamentos. Sendo que *vs controle, OUA e OUA+LPS ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 7 experimentos individuais e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls.

Figura 36 - Resultados dos tratamentos de OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora) nas células da glia tratadas previamente com o RNAi na fosforilação da ERK.

Os dados foram avaliados na relação entre a fração fosforilada da ERK e a fração total da ERK. Sendo (A) Radiografia com bandas representativas dos tratamentos e (B) Análise densitométrica em unidades arbitrárias. Mostrando que não há diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 7 experimentos individuais e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls.

Figura 37- Resultados dos tratamentos de OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora) nas células da glia tratadas previamente com a sequência scramble ou RNAi na fosforilação da ERK.

Os dados foram avaliados na relação entre a fração fosforilada da ERK e a fração total da ERK. Mostrando que não há diferenças estatísticas entre os tratamentos. (A) Diferença na relação de pERK/tERK entre o grupo scramble e RNAi no tratamento com OUA. Sendo * vs scramble ($p < 0,05$). (B) Diferença na relação de pERK/tERK entre o grupo scramble e RNAi no tratamento com LPS. Sendo * vs scramble ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 7 experimentos individuais e analisados com o teste t não - pareado.

5.7 Alteração dos níveis citoplasmáticos da RelA (p65)

Para verificar se os tratamentos com OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora) são capazes de modular os níveis citoplasmáticos de p65 uma das subunidades do NF- κ B, foi realizado o ensaio de Western Blotting com as proteínas do extrato citosólico e foi observado que no grupo scramble, o tratamento com LPS diminuiu os níveis citoplasmáticos de p65 em relação ao grupo controle e OUA+LPS, sugerindo uma maior translocação dessa subunidade para o núcleo e uma consequente maior ativação do NF- κ B. Outro dado interessante que já foi observado no ensaio EMSA é que o pré-tratamento com a OUA diminui a translocação do NF- κ B para o núcleo (Figura 38). Porém, o mesmo fenômeno não ocorre quando as células da glia são silenciadas (Figura 39) o que sugere que a isoforma $\alpha 2$ - Na⁺,K⁺- ATPase tem atua em alguma via relacionada com o NF- κ B.

Figura 38 - Resultados dos tratamentos de OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS(1 μ g/mL por 1 hora) nas células da glia tratadas previamente com a sequência scramble nos níveis citosólicos de RelA (p65).

Mostrando que o tratamento com LPS aumenta a translocação nuclear de RelA (p65) em relação ao grupo controle e OUA+LPS. Sendo que *vs controle e OUA+LPS ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls.

Figura 39 - Resultados dos tratamentos de OUA (10 μ M por 1 hora) e LPS (1 μ g/mL por 1 hora) nas células da glia tratadas previamente com o RNAi nos níveis citoplasmáticos de RelA (p65).

Mostrando que não há diferenças estatísticas entre os tratamentos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 7 experimentos individuais e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO

O fator de transcrição NF- κ B é um regulador de diversos processos celulares como a apoptose, adesão celular, proliferação, respostas imunes adaptativas e inatas, inflamação, resposta ao estresse celular e remodelação tecidual (52). O NF- κ B possui 5 subunidades diferentes denominadas : NF- κ B1 (p50 e seu precursor p105), NF- κ B2 (p52 e seu precursor p100), RelA (p65), RelB e cRel que podem ser combinados formando homodímeros ou heterodímeros. O mecanismo envolvido no NF- κ B é muito interessante, pois dependendo do dímero que é ativado, os genes ativados podem ser pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios e sua ativação depende da natureza e do contexto celular.

No caso do SNC, em neurônios glutamatérgicos, o NF- κ B é constitutivamente ativado e sua inibição resulta em perda de neuroproteção e alterações na memória e no aprendizado. Enquanto que nas células da glia, o NF- κ B possui uma ativação apenas induzida e regula diversos processos inflamatórios os quais são importantes em diversas patologias como isquemia e doença de Alzheimer (79).

Outro dado interessante é que o NF- κ B interage com diversas vias celulares como a via da JNK e do p53 e por isso, alterações na ativação do NF- κ B pode gerar patologias inflamatórias e câncer.

A via clássica do NF- κ B é a ativação por LPS ou citocinas como TNF através da ativação de IKK que fosforila I κ B α que posteriormente é degradada e como consequência, há a liberação do dímero p50RelA de NF- κ B o que permite a sua translocação para o núcleo (77).

A subunidade RelA faz parte do dímero p50/RelA que é um modulador importante da expressão de proteínas pró-inflamatórias e por esse motivo a subunidade RelA foi utilizada para observar os possíveis efeitos protetores da OUA frente a um estímulo inflamatório como o LPS (79).

A OUA, assim como o NF- κ B, tem um papel dual, mas a sua resposta é dose dependente, uma dose alta de OUA é capaz até mesmo de levar a morte celular, pois há a inibição da Na⁺, K⁺ - ATPase que leva a uma depleção de íons K⁺ culminando em desenvolvimento de apoptose celular e também a um aumento de íons Na⁺ e Ca⁺² intracelular que origina a necrose em neurônios (80). Esse poder

citotóxico pode ser utilizado em muitas células cancerígenas humanas, logo, a OUA ou seus derivados podem ser uma alternativa para futuros tratamentos contra o câncer.

Estudos recentes no nosso laboratório, mostram que a OUA, em neurônios cerebelares, ativa o NF- κ B através da ativação da cascata NMDA-Ras-Raf-ERK e que essa cascata seria importante para uma resposta adaptativa do SNC e que a perda dessa ativação poderia ter como consequência processos degenerativos, uma vez que existe uma modulação da expressão gênica do *Bdnf* (41).

O papel protetor do composto já foi estudado em lesões de ácido cáínico no estriado em que baixas doses de OUA (0,01 nmol) reduzem a apoptose pelo aumento de Bcl-2, porém, esse mecanismo não é vinculado ao NF- κ B em função de estudos de imunohistoquímica que não foram capazes de relevar alterações envolvendo a translocação da subunidade p65 para o núcleo (81).

Apesar desse trabalho não apoiar a participação do NF- κ B no aumento de Bcl-2 induzido pela OUA, esse resultado é baseado em uma evidência indireta (translocação nuclear do p65) e não na atividade deste fator de transcrição. Assim, problemas de decurso temporal ou de ordem metodológica podem ter mascarado a modulação do Bcl-2 por esse fator.

A privação de soro em cultura de células embrionárias do rim pode servir como modelo para avaliar os efeitos de uma desnutrição nos rins durante o período embrionário, que por sua vez pode aumentar a susceptibilidade a doenças renais. Neste modelo, a OUA foi capaz de impedir a morte celular induzida pela ausência de soro no meio de cultura pela ativação do NF- κ B (82).

Neste caso as células do rim possuem somente a isoforma α 1, assim sendo nosso estudo passa a ser de importância uma vez que o efeito da OUA está sendo estudada em células da glia (isoformas α 1 e 2) que são células com perfil inflamatório e cuja ativação persistente parece estar presente em inúmeras doenças que atingem o organismo, em especial o SNC.

Outro trabalho do mesmo grupo, observou em cultura primária de rim que a OUA é protetora frente a toxina shiga (causa da síndrome hemolítica urêmica), diminuindo a apoptose, aumentando a expressão da proteína Bcl-2 devido à ativação do NF- κ B (83).

Estudos recentes mostram que baixas doses de OUA teriam propriedades

anti-inflamatórias, por restaurar as mudanças induzidas por LPS em astrócitos, como exemplo, a redução de IL-1 β liberada de astrócitos reativos, além, de prevenir a diminuição da expressão ou atividade funcional (*down-regulation*) da Na⁺, K⁺- ATPase (84).

Tem se mostrado que animais tratados com substâncias como zymosan (composto que se liga ao TLR2) e carragenina usadas para induzir edema de pata, a OUA foi capaz de diminuir essa resposta inflamatória nos dois modelos. Esse potencial antiinflamatório pode ocorrer devido à inibição da prostaglandina E2, bradicinina e a degranulação de mastócitos (85). Também, já foi observado que há outros mecanismos envolvidos nesse potencial antiinflamatório como a diminuição da expressão de citocinas IL-6 e TNF (86) ou pelo bloqueio da ativação da via TNF / NF- κ B (glicosídeos cardiotônicos) (87).

Um efeito interessante da OUA em neurônios é a cascata de sinalização desencadeada pela interação OUA - Na⁺, K⁺- ATPase que é capaz de ativar o CREB que leva ao aumento da quantidade da árvore dendrítica o que pode estar diretamente relacionado com o aumento da plasticidade (88). Além disso, a OUA é capaz de aumentar a sobrevivência de células ganglionares da retina em cultura (89). Esse fenômeno não ocorre somente no SNC, pois a OUA tanto em altas como em baixas doses estimula a proliferação e diferenciação de células cardíacas (90).

Atualmente, a ativação de cascatas de sinalização é mais estudada como resultado da interação OUA com a Na⁺,K⁺-ATPase. Assim, acredita-se que, na verdade, a enzima Na⁺, K⁺- ATPase apresenta duas funções distintas. Um destes *pools* está associado às propriedades de transporte de íons Na⁺ e K⁺, enquanto que o outro altera a interação proteína-proteína, levando à ativação de vias independentes dos íons Na⁺ e K⁺ (38). Existem duas vias que são mais importantes para explicar as respostas celulares como proliferação, apoptose e migração celular.

A primeira é a ativação do receptor de IP₃ (1,4,5-trifosfato de inositol) que libera estoques de cálcio do retículo endoplasmático criando oscilações de cálcio que ativam fatores de transcrição como NF- κ B (9, 34). Porém, a ativação do NF- κ B pela OUA não foi encontrada em nosso estudo, o que pode estar associado a diferença de dose utilizada no nosso projeto. Nós usamos nesse estudo doses 20 vezes menores e um tempo de tratamento maior do que no trabalho de Liu e

colaboradores em astrócitos.

A segunda via muito estudada é a formação de um complexo entre a Na^+, K^+ -ATPase e a Src. A ativação de Src transativa o receptor de EGF que recruta a proteína adaptadora Shc que ativa a cascata Ras-Raf-ERK. Além disso, há a produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de PKC (proteína quinase C) (91). Sendo que provavelmente o primeiro mecanismo é ativado nas células da glia, pois o tratamento com LPS também gera ondas de cálcio (84) e no nosso estudo, a OUA diminui a ativação de NF- κ B quando há o tratamento posterior com LPS.

As doses escolhidas no nosso estudo podem ser vistas como doses muito altas, porém, recentemente, foi demonstrada a presença de OUA no SFB na ordem de 0,3-0,4 nM (92). Logo, as células já estão adaptadas (sensibilizadas) a presença de OUA em concentrações na ordem de nanomolar o que provavelmente não resultaria em alterações significativas para a célula. Talvez se estivéssemos manipulando neurônios, a dose deveria ser menor que 1 μM que é uma dose que inibe a isoforma α_3 - Na^+, K^+ -ATPase para esse tipo celular (93). Em cultura primária cerebelar de ratos, foi demonstrado que 1 e 10 μM da OUA não tiveram efeitos significativos na atividade das isoformas $\alpha_{2/3}$ - Na^+, K^+ -ATPase (94), o que mostra que os resultados obtidos não são consequência da inibição da Na^+, K^+ -ATPase.

Um estudo recente demonstrou que um modelo de sepse diminui a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no córtex e hipocampo em ratos (95). Assim, para termos certeza de que a dose de 10 μM não altera a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e para observar se o LPS também diminui atividade da Na^+, K^+ -ATPase, nós iremos avaliar a atividade da mesma para a publicação.

As diferenças na expressão, atividade e regulação das isoformas da Na^+, K^+ -ATPase sugerem que essa heterogenicidade das subunidades catalíticas possui relevância fisiológica. Pierre et al (14) fizeram um estudo em células Sf9 (originado de *Spodoptera frugiperda*) infectadas com todas as isoformas α com a isoforma β_1 e a partir desse modelo, as células foram tratadas com OUA e foi avaliado a ativação de ERK. Apenas as células com a isoforma α_2 , não apresentaram a ativação da ERK, o que sugere uma sinalização diferente dessa isoforma ou que seria necessário a interação com outras isoformas β ou que para a sinalização

ocorrer é preciso segundos mensageiros que estão presentes apenas em células de mamíferos.

A isoforma $\alpha 2$ tem uma importância no SNC, pois mutações nessa isoforma estão relacionadas com a enxaqueca familiar do tipo 2 (96). Além disso, camundongos com a falta de um alelo da isoforma $\alpha 2$ tem um aumento na pressão porque a concentração do fluido cerebrospinal de Na^+ é aumentada devido a ativação do sistema renina- angiotensina no SNC (97). Foi demonstrado também que a falta de um alelo da isoforma $\alpha 2$ aumenta o comportamento ansioso, diminui a atividade locomotora e altera o aprendizado e memória espacial (28).

Foi demonstrada que a isoforma $\alpha 2 - \text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$ está relacionada com respostas à estímulos lesivos no SNC. No caso de um tratamento com ácido caínico, há um aumento nos níveis de RNAm da isoforma $\alpha 2$ em hipocampus de rato (98) e o mesmo ocorre em astrócitos tratados com amônia (29).

O tratamento com LPS em astrócitos ativa a ERK que é uma quinase que é ativada em resposta a um estresse celular (99) e como esperado o tratamento com LPS diminui significativamente a expressão protéica de RelA no citoplasma, já que ocorre a ativação do NF- κB o qual é translocado para o núcleo.

O interessante é que o tratamento prévio com OUA reverte o efeito causado pelo LPS no tratamento com uma sequência aleatória (scramble), mostrando o papel protetor da OUA que de certa forma prepara as células para um posterior estímulo lesivo. O mesmo já foi observado em nosso laboratório em hipocampo de ratos tratados com OUA e LPS (injeção intraperitoneal) no qual o tratamento prévio com OUA diminui os níveis de RNAm de *IL1- β* , *iNOS* e a relação de *Bax/Bcl2*. O tratamento de OUA e LPS não alteraram a atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Kinoshita et al., *in preparation*).

Porém, quando há o silenciamento da isoforma $\alpha 2$, a ativação da ERK não ocorre na presença do LPS e o silenciamento com o tratamento com OUA aumentou a ativação da ERK em comparação ao grupo scramble. O que demonstra a importância da isoforma $\alpha 2$ na resposta celular ao LPS que é considerado um estímulo inflamatório. É possível observar que provavelmente, a modulação dessa isoforma altera alguma via de sinalização capaz de modular a via do TLR4. Mostrando que provavelmente essa isoforma seja essencial para desencadear a resposta inflamatória associada ao LPS.

7 CONCLUSÃO

Na cultura primária de glia de camundongos, o pré-tratamento de 10 μ M de OUA é capaz de reverter o aumento de atividade de NF- κ B causado por um estímulo inflamatório como o LPS (1 μ g/mL), evidenciando o papel anti-inflamatório da OUA. Além disso, através do silenciamento da isoforma α 2 da Na⁺,K⁺-ATPase, observamos que essa isoforma tem um papel importante na sinalização inflamatória causada pelo LPS, pois o silenciamento diminui a ativação da ERK em células tratadas com LPS em relação ao grupo “scramble” e leva a perda da translocação nuclear de RelA causada pelo tratamento com LPS.

REFERÊNCIAS¹

1. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*. 1998;275(Renal Physiol. 44):F633-F50.
2. Gloor SM. Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett*. 1997;412:1-4.
3. Glynn IM. All hands to the sodium pump. *J Physiol (Lond)*. 1993;462:1-30.
4. Jorgensen PL. Structure and molecular mechanisms of the Na,K-pump. *Monovalent Cations in Biological Systems*. 1990;1:117-54.
5. Skou JC. The energy coupled of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na,K-pump. *FEBS Lett*. 1990;268:314-24.
6. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. 1992;24:249-61.
7. Johanson CE, Fishman MW. The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev*. 1989;41:3-52.
8. Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem*. 2002;269(10):2434-9.
9. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. 2007 Jan;261(1):44-52.
10. Albers RW. Cell membrane structures and functions. 6th ed. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. New York: Raven Press; 1999.
11. Pressley TA. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metabol*. 1996;22:264-71.
12. Liu AY, Bentley PJ. A comparison of the toxicity of ouabain in vivo and in vitro in the frog, *Rana pipiens*, and the toad, *Bufo marinus*. *Comp Gen Pharmacol*. 1971 Dec;2(8):476-8.
13. Wang H, Yuan W, Lu Z. Effects of ouabain and digoxin on gene expression of sodium pump alpha-subunit isoforms in rat myocardium. *Chin Med J (Engl)*. 2001 Oct;114(10):1055-9.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors.[Internet].Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references.[updated 2011 jul 15]. Available from:www.icmje.org

14. Pierre SV, Sottejeau Y, Gourbeau JM, Sanchez G, Shidyak A, Blanco G. Isoform specificity of Na-K-ATPase-mediated ouabain signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr;294(4):F859-66.
15. Chow DC, Forte JG. Functional significance of the β subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J Exp Biol*. 1995;198:1-17.
16. Geering K. Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. 2005 Dec;37(6):387-92.
17. Wessman M, Kaunisto MA, Kallela M, Palotie A. The molecular genetics of migraine. *Ann Med*. 2004;36(6):462-73.
18. Kamphuis DJ, Koelman H, Lees AJ, Tijssen MA. Sporadic rapid-onset dystonia-parkinsonism presenting as Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006 Jan;21(1):118-9.
19. Fambrough DM. The sodium pump becomes a family. *Trends Neurosci*. 1988;11:325-8.
20. Levenson R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1994;123:1-45.
21. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na,K-ATPase. *J Biol Chem*. 1994;269:19659-62.
22. Sweadner KJ. Isozymes of the Na^+/K^+ -ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 1989;988:185-220.
23. Sweadner KJ. Overview: subunit diversity in the Na^+/K^+ -ATPase. *Soc Gen Physiol Ser*. 1991;46:63-76.
24. Beltowski J, Wójcicka G. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med Sci Monit*. 2002;8(2):RA39-52.
25. Shull GE, Greeb J, Lingrel JB. Molecular cloning of three distinct forms of the Na^+ , K^+ -ATPase α subunit from rat brain. *Biochemistry*. 1986;25:8125-32.
26. Schwartz A. Sodium-potassium adenosine triphosphatase-a receptor for digitalis? *Biochem Pharmacol*. 1976 Feb 1;25(3):237-39.
27. McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci*. 1991;11:381-91.
28. Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci*. 2007 Jan 17;27(3):616-26.

29. Xue Z, Li B, Gu L, Hu X, Li M, Butterworth RF, et al. Increased Na, K-ATPase alpha2 isoform gene expression by ammonia in astrocytes and in brain in vivo. *Neurochem Int*. 2010 Nov;57(4):395-403.
30. Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert GT, Jr., et al. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6654-9.
31. Schoner W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(7):449-54.
32. Furstenwerth H. Ouabain - the insulin of the heart. *Int J Clin Pract*. 2010 Nov;64(12):1591-4.
33. Liu X, Spicarova Z, Rydholm S, Li J, Brismar H, Aperia A. Ankyrin B modulates the function of Na,K-ATPase/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor signaling microdomain. *J Biol Chem*. 2008 Apr 25;283(17):11461-8.
34. Liu XL, Miyakawa A, Aperia A, Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *Neuroreport*. 2007 Apr 16;18(6):597-600.
35. Jaiswal MK, Dvela M, Lichtstein D, Mallick BN. Endogenous ouabain-like compounds in locus coeruleus modulate rapid eye movement sleep in rats. *J Sleep Res*. 2010 Mar;19(1 Pt 2):183-91.
36. Aizman O, Aperia A. Na,K-ATPase as a signal transducer. *Annals of New York Academy of Sciences*. 2003;986:489-96.
37. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):18694-702.
38. Xie Z, Askari A. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem*. 2002 May;269(10):2434-9.
39. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2009 Mar;61(1):9-38.
40. Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amara FG, et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-kappaB in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*. 2012 Jan;90(1):213-28.
41. de Sa Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AM, Curi R, et al. Ouabain activates NFkappaB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology*. 2013 Jun 15;73C:327-36.

42. Aizman O, Uhlen P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 6;98(23):13420-4.
43. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):705-16.
44. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*. 1996 Oct 4;87(1):13-20.
45. Siebenlist U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb 22;1332(1):R7-13.
46. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
47. O'Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in Neuroscience*. 1997;20(6):252-8.
48. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.
49. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):773-85.
50. Pickart CM. Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J*. 1997 Nov;11(13):1055-66.
51. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):243-52.
52. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):49-62.
53. Barnes PJ, Adcock IM. NF- κ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends in Pharmacological Science*. 1997;18:46-50.
54. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech Dev*. 1993 Oct;43(2-3):135-47.
55. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle PA. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. *Mol Cell Biol*. 1994 Jun;14(6):3981-92.
56. Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, et al. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol*. 2006 Apr;26(8):2936-46.

57. Camandola S, Mattson MP. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Feb;11(2):123-32.
58. Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, De Sá Lima L, Curi-Boaventura MF, et al. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells. *Mol Brain* 2009;2((1)):3.
59. Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci Res*. 2008;86(4):845-60.
60. Lipsky RH, Xu K, Zhu D, Kelly C, Terhakopian A, Novelli A, et al. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J Neurochem* 2001;78(2):254-64.
61. Ndubaku U, de Bellard ME. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem*. 2008;110(3):182-95.
62. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006 Dec;2(12):679-89.
63. Yuan TM, Sun Y, Zhan CY, Yu HM. Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling. *J Neuroimmunol*. 2010 Dec 15;229(1-2):16-25.
64. Kala G, Kumarathasan R, Peng L, Leenen FH, Hertz L. Stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity, increase in potassium uptake, and enhanced production of ouabain-like compounds in ammonia-treated mouse astrocytes. *Neurochem Int*. 2000 Mar;36(3):203-11.
65. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20.
66. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*. 2006 Sep;5(18):2103-9.
67. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012 Feb 16;482(7385):331-8.
68. Schenborn ET. Transfection technologies. *Methods Mol Biol*. 2000;130:91-102.
69. Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):413-20.
70. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

71. Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem.* 1996;67(2):662-8.
72. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
73. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
74. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 2):F633-50.
75. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7240-4.
76. Ting AY, Endy D. Signal transduction. Decoding NF-kappaB signaling. *Science.* 2002 Nov 8;298(5596):1189-90.
77. Pereira SG, Oakley F. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(8):1425-30.
78. Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MC, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. *Neuropharmacology.* 2003;45(8):1120-9.
79. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Sep;1(3):a001271.
80. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci.* 2002 Feb 15;22(4):1350-62.
81. Golden WC, Martin LJ. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo. *Neuroscience.* 2006;137(1):133-44.
82. Li J, Khodus GR, Kruusmagi M, Kamali-Zare P, Liu XL, Eklof AC, et al. Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. *Nat Commun.* 2010;1:42.
83. Burlaka I, Liu XL, Rebetz J, Arvidsson I, Yang L, Brismar H, et al. Ouabain Protects against Shiga Toxin-Triggered Apoptosis by Reversing the Imbalance between Bax and Bcl-xL. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Jun 6.
84. Forshammar J, Block L, Lundborg C, Biber B, Hansson E. Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. *J Biol Chem.* 2011 Sep 9;286(36):31586-97.

85. de Vasconcelos DI, Leite JA, Carneiro LT, Piuvezam MR, de Lima MR, de Moraes LC, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:912925.
86. Matsumori A, Ono K, Nishio R, Igata H, Shioi T, Matsui S, et al. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. *Circulation.* 1997 Sep 2;96(5):1501-6.
87. Yang Q, Huang W, Jozwik C, Lin Y, Glasman M, Caohuy H, et al. Cardiac glycosides inhibit TNF-alpha/NF-kappaB signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5;102(27):9631-6.
88. Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjo S, Nanou E, Estrada M, et al. Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 17;106(7):2212-7.
89. de Rezende Correa G, Araujo dos Santos A, Frederico Leite Fontes C, Giestal de Araujo E. Ouabain induces an increase of retinal ganglion cell survival in vitro: the involvement of protein kinase C. *Brain Res.* 2005 Jul 5;1049(1):89-94.
90. Manunta P, Messaggio E, Casamassima N, Gatti G, Carpinì SD, Zagato L, et al. Endogenous ouabain in renal Na(+) handling and related diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Dec;1802(12):1214-8.
91. Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv.* 2003 May;3(3):157-68.
92. Dvela M, Rosen H, Ben-Ami HC, Lichtstein D. Endogenous ouabain regulates cell viability. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Jan 15;302(2):C442-52.
93. Azarias G, Kruusmagi M, Connor S, Akkuratov EE, Liu XL, Lyons D, et al. A specific and essential role for Na,K-ATPase alpha3 in neurons co-expressing alpha1 and alpha3. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2734-43.
94. Petrushanko I, Bogdanov N, Lapina N, Boldyrev A, Gassmann M, Bogdanova A. Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. *J Gen Physiol.* 2007;130(4):389-98.
95. Jeremias IC, Scaini G, Constantino L, Vuolo F, Ferreira AK, Scherer EB, et al. The decrease on Na(+), K(+)-ATPase activity in the cortex, but not in hippocampus, is reverted by antioxidants in an animal model of sepsis. *Mol Neurobiol.* 2012 Oct;46(2):467-74.
96. De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet.* 2003 Feb;33(2):192-6.

97. Hou X, Theriault SF, Dostanic-Larson I, Moseley AE, Lingrel JB, Wu H, et al. Enhanced pressor response to increased CSF sodium concentration and to central ANG I in heterozygous $\alpha 2$ Na⁺-K⁺-ATPase knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 May;296(5):R1427-38.
98. Anderson WR, Stahl WL. Alpha 2 mRNA of Na⁺K⁺ ATPase is increased in astrocytes of rat hippocampus after treatment with kainic acid. *Neurochem Int*. 1997 Oct;31(4):549-56.
99. Liao CK, Wang SM, Chen YL, Wang HS, Wu JC. Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 May;42(5):762-70.

ANEXO A – Sequências do RNAi para a isoforma $\alpha 2$ - Na⁺, K⁺- ATPase

A:

- Sense: GACGAACCAUCCAACGAUAtt
- Antisense: UAUCGUUGGAUGGUUCGUCtt

B:

- Sense: GCAAUCGUGCUGUCUUCAAtt
- Antisense: UUGAAGACAGCACGAUUGCtt

C:

- Sense: CAAGUUCACCGGCUAAUUAAtt
- Antisense: UAAUUAGCCGGUGAACUUGtt

Todas as sequências estão na orientação de 5' para 3'.