ANA MARIA MARQUES ORELLANA

**ADMINISTRAÇÃO INTRAHIPOCAMPAL DE OUABAÍNA ATIVA O NF- κ B
E A SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA WNT EM RATOS**

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
2012

ANA MARIA MARQUES ORELLANA

**ADMINISTRAÇÃO INTRAHIPOCAMPAL DE OUABAÍNA ATIVA O NF- κ B
E A SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA WNT EM RATOS**

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**

Versão Original

São Paulo
2012

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

Orellana, Ana Maria Marques.

Administração intrahipocampal de ouabaína ativa o NF- κ B e a sinalização da proteína WNT em ratos / Ana Maria Marques Orellana. – São Paulo, 2012.

Orientador: Cristoforo Scavone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Mecanismos da sinalização da ouabaína no SNC

Versão do título para o inglês: Intrahippocampal injection of ouabain activates NF- κ B and WNT signaling pathways in rats.

Descritores: 1. Sistema nervoso central 2. Neurofarmacologia 3. Ouabaína 4. WNT 5. NF- κ B 6. Neuroinflamação I. Scavone, Cristoforo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB06/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Maria Marques Orellana.

Título da Dissertação: Administração intrahipocampal de ouabaína ativa o NF-kB e a sinalização da proteína WNT em ratos.

Orientador(a): Cristoforo Scavone.

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

() **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. Lúcio Prestes, 2418 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **124** nas fls. **93** 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 **Efeitos da administração intracampal de Ouabaina na sinalização da proteína Wnt em ratos** do qual participam o(s) alunos **Ana Maria Marques Orellana**, 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 **07.12.2010**, com **validade de 3 anos**.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010.

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

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

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO

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

ANA MARIA MARQUES ORELLANA

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

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

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

SÃO PAULO, 24 DE MAIO DE 2011.

PRESIDENTE DA COMISSÃO
DE CULTURA E EXTENSÃO
UNIVERSITÁRIA

PROFA. DRA. ELISABETE DE
SANTIS BRAGA DA GRAÇA
SARAIVA

IO
Instituto
Oceanográfico

DIRETOR
MICHEL MICHAEOVITCH DE
MAHIQUES

*Aos meus pais, meus grandes exemplos,
e ao meu marido, por todo amor e companheirismo,
sem os quais a realização dessa obra não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristoforo Scavone, por me aceitar em seu laboratório, pelo enorme incentivo a continuar, pelo tempo dedicado, pela paciência, pela confiança, pela amizade e por todas as portas que me abriu. Sem sua enorme ajuda e apoio, essa etapa não existiria na minha vida.

Agradeço à Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz (ICB-USP) pelas enriquecedoras discussões científicas e pelas sugestões, sempre muito úteis.

Ao Prof. Dr. José Cipolla Neto, pela colaboração e a Dra. Fernanda Gaspar do Amaral pela enorme paciência e por me ensinar a técnica de estereotáxia.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular e do Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, por me receberem de braços abertos e pelos agradáveis dias que passamos juntos. Durante esse período a ajuda de muitos de vocês foi fundamental. Ao Leonardo Santana Novaes e a Rafaela Florindo Pestana Ferrão Batalhote pela ajuda com a manipulação dos animais. A Paula Fernanda Kinoshita, e a Andréa Rodrigues Vasconcelos por tudo que me ensinaram e me ajudaram. A Dra. Lídia Mitiko Yshii e a Dra. Ana Elisa Böhmer pela enorme ajuda na bancada e intelectual. A Dra. Elisa Mitiko Kawamoto pelas ricas discussões científicas.

À Larissa Lima, agradeço por tudo que me ensinou, pela paciência, pelo apoio técnico e burocrático e pela amizade.

À Diana Zukas Andreotti pela valiosa ajuda diária na bancada e pela amizade; e a Fernando de Souza Lula pelo apoio com o biotério.

Às secretárias da Pós-graduação do Departamento de Farmacologia: Selma Rigonatti e Camila Trindade, por todo apoio burocrático.

Aos meus pais, Amália Marques Orellana e Antonio Orellana Vilchez, por toda educação e valores que me proporcionaram e pelo grande amor que me dedicaram.

A Luis Alfredo Gatti, pelo companheirismo e apoio incondicional.

A todos aqueles que contribuíram para que este momento pudesse acontecer.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

Finalmente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho, por me conceder saúde e proteção.

“Quando um homem extirpa, ó Partha, todos os desejos do seu coração,
e se satisfaz no Eu pelo Eu, então pode dizer-se sábio de mente constante.

Aquele cujo coração está livre de ansiedade na dor, indiferente ao prazer,
desapegado da paixão, do temor e da cólera,
Aquele pode dizer-se sábio.

Quem a nada se apega, nem se imuta na sorte próspera ou adversa,
nem gosta nem repugna, tal homem é de equilibrada mente.”

BHAGAVAD GITA

RESUMO

ORELLANA AMM. Administração Intrahipocampal de Ouabaína ativa o NF- κ B e a sinalização da proteína WNT em ratos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

A enzima Na⁺, K⁺-ATPase (Sódio Potássio Adenosina Trisfosfatase), é uma proteína de membrana altamente conservada em eucariotos, que através da hidrólise de uma molécula de ATP é capaz de gerar um gradiente eletroquímico, fundamental para manter o balanço osmótico das células, o potencial de repouso das membranas e a propriedade excitatória das células musculares e nervosas. Além de seu papel regulatório na homeostasia iônica, desempenha um papel na transdução de sinal e na ativação de transcrição gênica, modulando na presença de ouabaína o crescimento celular, migração e morte celular programada. A Ouabaína (OUA) é um esteróide cardiotônico, produzido no córtex da adrenal e no hipotálamo. Em linhas gerais, a sinalização da Na⁺, K⁺-ATPase promovida pela OUA parece ativar vias associadas à modulação de fatores de transcrição como a via da Src, MAPK, Ca²⁺ e NF- κ B. Evidências indicam que o NF- κ B exerça algum tipo de modulação na via canônica do WNT, no entanto os mecanismos moleculares ainda são desconhecidos. As vias de sinalização celular associadas à proteína WNT desempenham funções importantes durante a embriogênese e na homeostase de tecidos adultos, por estar relacionada ao processo de neurogênese. Assim, o objetivo do presente projeto é verificar se a administração intrahipocampal de ouabaína é capaz de modular a atividade das vias canônicas do NF- κ B e da WNT. Estas vias foram estudadas em um decurso temporal imediato (1 -2 horas) e tardio (10, 24 e 48 horas) utilizando técnicas como Western Blotting, RT-PCR e Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética para NF- κ B (EMSA). Os resultados encontrados mostram que a OUA (10 nM) foi capaz de ativar a via de sinalização NF- κ B, após 1 hora, 10, 24 e 48 horas, seguindo um comportamento oscilatório. A OUA também foi capaz de ativar a via canônica do WNT, sendo que 10 horas após a sua administração ocorreu aumento da fosforilação da proteína GSK-3 β , enquanto que em 24 horas, observamos aumento da translocação nuclear da β -CATENINA. Além disso, pode-se verificar aumento de BDNF ao longo de todo o decurso temporal. Em resumo, 10 nM de OUA é capaz de ativar primeiramente a via do NF- κ B e tardiamente a via canônica do WNT.

Palavras-chave: Ouabaína. WNT. NF- κ B. Neuroinflamação. β -CATENINA.

ABSTRACT

ORELLANA AMM. Intrahippocampal injection of Ouabain activates NF- κ B and WNT signaling pathways in rats. [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

The enzyme Na⁺,K⁺-ATPase (Sodium Potassium Adenosine Trisfosfatase) is an integral membrane protein, highly conserved in eukaryotes, which through hydrolysis of one ATP molecule establishes the electrochemical gradient across the plasma membrane, which is essential to maintain the osmotic balance of cells, the resting membrane potential and the excitatory property of nerve and muscle cells. Besides its role in ion homeostasis, several recent studies suggest that this pump may also act as a signal transducer and transcription activator involved in cell growth, differentiation and programmed cell death. Ouabain (OUA), the ligand of Na⁺,K⁺-ATPase, is a steroid derivative that is produced by the adrenal cortex and hypothalamus. After OUA binding, the Na⁺,K⁺-ATPase signaling seems to activate pathways such as Src, MAPK, NF- κ B and Ca²⁺. Some evidence indicate a possible crosstalk between the NF- κ B signaling pathway and the canonical WNT pathway, however the molecular mechanisms are still unknown. The canonical WNT play important roles during embryogenesis and in adult tissue homeostasis, as it is related to neurogenesis process. The aim of this project is to verify if the intrahippocampal administration of OUA is able to modulate the activity of the canonical pathways of NF- κ B and WNT. Both pathways were studied after 1 and 2 hours, and after 10, 24 and 48 hours by Western blot, RT-PCR and Electrophoretic mobility shift assays, that were used to determine changes in both canonical pathways. The results show that the OUA (10 nM) was able to activate the NF- κ B signaling pathway after 1, 10, 24 and 48 hours following an oscillatory profile. The OUA was also able to activate the canonical WNT pathway, since after 10 hours there was an increased phosphorylation of GSK-3 β protein, whereas in 24 hours, we observed increased nuclear translocation of β -CATENIN. Moreover, we found increased levels of BDNF throughout the time course. In summary, OUA 10 nM is able to first activate the NF- κ B signaling pathway and later the canonical WNT pathway.

Key words: Ouabain. NF- κ B. WNT. β -CATENIN. Neuroinflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc - Adenosina Monofosfato Ciclico
APC - *adenomatous polyposis coli*
ATP - Trifosfato de adenosina
BAFF - Fator Ativador de célula B
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
Ca²⁺ - Cálcio
CD40 - Proteína pertencente a família dos receptores de TNF
cDNA - DNA complementar
Ci - Curie
CK1 - caseína quinase -1
Cl⁻ - íon cloreto
CREB - Elemento de Resposta Ligado ao AMPc
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DEPC - Dietil Dicarbonato, inibidor de RNase
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
DTT - Ditioneitol, inibidor de protease
Ebi - Ubiquitina Ligase
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético, agente quelante
EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
EMSA - Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética
E.P.M - Erro padrão da média
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
g – RCF: Força Centrífuga Relativa
Gapdh – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GSK-3β - Glicogênio Sintase Quinase-3β
H⁺ - Hidrogênio
HCl - Ácido Clorídrico
HEK293 - human embryonic kidney 293 /células embrionárias de rim humano 293
IKK - complexo de quinases do IκB
IL-1R - receptor de interleucina-1
IL6 - Interleucina 6
IL-1β - Interleucina 1β
i.p - Intra-peritoneal

IP3 - Inositol-trifosfato

IP3R - Receptor Inositol-trifosfato

I κ B - Proteína Inibitória κ B

K⁺ - Potássio

KCl - Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ - Dihidrogenofosfato de Potássio

LPS- lipopolissacarídeo

LRP-6/-5 - receptor de lipoproteína de baixa densidade tipo 5 ou 6

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

Na⁺ - Sódio

NaCl - Cloreto de Sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato de sódio dibásico

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

NEMO - Modificador essencial de NF- κ B

NF- κ B - Fator de transcrição Nuclear kappa B

nM - nanomolar

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

NO - Óxido Nítrico

NOSi - Oxido Nítrico Sintase induzida

OUA - Ouabaína

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCP -Polaridade planar celular

PCR- Reação em cadeia de polimerase

PKA - Proteína Quinase A

PKB- Proteína Quinase B

PMSF - Inibidor de Protease

PO₄³⁻ - Fosfato

q.s.p. - quantidade suficiente para

Ras - Proteína G de baixo peso molecular

RNA- Ácido Ribonucléico

RNAm - RNA mensageiro

RT-PCR - Reação em cadeia de polimerase por Transcrição Reversa

SDS- Dodecilsulfato de Sódio

SGZ - zona subgranular

SGK1 - Quinase-1 dependente de glicocorticóide e soro

Siah-1 - Proteína Ubiquitina Ligase tipo E-3, “*Seven in absentia homolog 1*”

Skp1 - Proteína Quinase 1 Associada a Fase S

SNC - Sistema Nervoso Central

SO₄²⁻ - Sulfato

Src - Proteína Tirosina-quinase proto-oncogênica

SVZ - zona subventricular

TAD - Domínio de transativação

TBE - Tampão Tris- Borato - EDTA

TBS - Tampão Tris-Salina

TCF/LEF - Fator promotor de célula T/linfócito

TGF-β - Fator de Crescimento Transformante beta

TLR - Receptor do tipo Toll

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNFR - receptor do fator de necrose tumoral

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

U.A - Unidade arbitrária

UV - Luz Ultra-violeta

VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
<i>1.1 Na⁺, K⁺-ATPase.....</i>	<i>17</i>
<i>1.2 As subunidades</i>	<i>17</i>
<i>1.3 A enzima Na⁺, K⁺-ATPase e a Ouabaína.....</i>	<i>18</i>
<i>1.4 NF-κB</i>	<i>20</i>
<i>1.5 Via de sinalização WNT</i>	<i>23</i>
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
<i>3.1 Animais</i>	<i>27</i>
<i>3.2 Implantação da cânula no hipocampo dos ratos.....</i>	<i>27</i>
<i>3.3 Infusão da Ouabaína (OUA).....</i>	<i>28</i>
<i>3.4 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares.....</i>	<i>29</i>
<i>3.5 Ensaio de Western Blotting para GSK3β, β-CATENINA, IκB, p65, NOSi, BDNF, AKT e ERK.....</i>	<i>30</i>
<i>3.6 RT-PCR.....</i>	<i>31</i>
<i>3.6.1 Reação de RT (transcriptase reversa): Transcrição do cDNA</i>	<i>31</i>
<i>3.6.2 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).....</i>	<i>32</i>
<i>3.7 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA).....</i>	<i>33</i>
<i>3.7.1 Marcação da sonda</i>	<i>33</i>
<i>3.7.2 Reação de Ligação e corrida do gel.....</i>	<i>33</i>
<i>3.8 Análise dos resultados</i>	<i>34</i>
4 RESULTADOS	34
<i>4.1 Padronização da Quantificação das Proteínas GSK-3β, pGSK-3β, β-CATENINA e NOSi, pelo Método de Western Blotting.....</i>	<i>34</i>
<i>4.1.1 GSK-3β e pGSK-3β.....</i>	<i>35</i>
<i>4.1.2 β-CATENINA Nuclear e Citoplasmática.....</i>	<i>36</i>
<i>4.1.3 NOSi</i>	<i>37</i>
<i>4.2 Resultados dos Efeitos da Administração de OUA (10 nM) na sinalização imediata e tardia associada ao NF-κB</i>	<i>38</i>
<i>4.2.1 Efeitos da OUA (10 nM) na expressão de IκB e pIκB em hipocampo</i>	

<i>de rato, após 1 hora.....</i>	<i>38</i>
4.2.2 Efeitos da OUA (10 nM) na translocação da subunidade p65 do NF-κB	
<i>em hipocampo de ratos, após 1 hora.....</i>	<i>39</i>
4.2.3 Efeitos da OUA (10 nM) na translocação da subunidade p65 do NF-κB	
<i>em hipocampo de ratos, após 2 horas.....</i>	<i>40</i>
4.2.4 Efeitos da administração de OUA (10 nM, nos tempos 1 e 2 horas)	
<i>na ativação da via NF-κB, por ensaio de EMSA</i>	<i>41</i>
4.2.5 Efeitos da Administração de OUA (10 nM, nos tempos 10, 24 e 48 hrs)	
<i>na ativação do NF-κB, por ensaio de EMSA</i>	<i>43</i>
4.3 Efeitos da OUA (10 nM) na expressão de NOSi	44
4.4 Efeitos da administração de OUA (10 nM) nos níveis de RNAm dos genes	
<i>Bcl2, Bax, Bdnf, Tnf, Nosi e IκBα, em hipocampo de rato, após 1 hora.....</i>	44
4.5 Efeitos da administração de OUA (10 nM) nos níveis de RNAm dos genes	
<i>Bcl2, Bax, Bdnf, Tnf e Nosi em hipocampo de rato, no período de</i>	
<i>10, 24 e 48 horas.....</i>	46
4.5.1 Em 10 horas.....	46
4.5.2 Em 24 horas.....	48
4.5.3 Em 48 horas.....	48
4.6 Efeitos da OUA (10 nM) na ativação do BDNF, nos períodos de	
<i>10, 24 e 48 horas.....</i>	49
4.7 Resultados dos Efeitos da Administração de OUA (10 nM) na sinalização	
<i>intracelular associada a via da WNT: GSK-3β e a β-CATENINA, após 1h, 10, 24 e 48</i>	
<i>horas.....</i>	50
4.7.1 GSK-3β e pGSK-3β, após 1 hora.....	51
4.7.2 β-CATENINA Nuclear, após 1 hora.....	52
4.7.3 GSK-3β e pGSK-3β, 10 horas.....	53
4.7.4 β-Catenina Nuclear, 10 horas.....	54
4.7.5 GSK-3β e pGSK-3β, em 24 horas	55
4.7.6 β-CATENINA Nuclear, em 24 horas.....	56
4.7.7 GSK-3β e pGSK-3β, 48 horas.....	57
4.7.8 β-CATENINA, 48 horas.....	58
4.8 Efeitos da OUA (10 nM) na via da AKT.....	59

4.8.1 pAKT/AKT, em 1 e 2 horas.....	59
4.8.2 pAKT/AKT, 10 horas	61
4.8.3 pAKT/ AKt em 24 horas.....	62
4.8.4 pAKT/AKT, 48 horas	63
4.9 Efeitos da OUA (10 nM) na via de sinalização da ERK2, em 24 horas	64
4.10 Resumo dos Resultados	65
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIA.....	81
Anexo A – Sequência do RNAm do gene <i>Nos2</i>	97
Anexo B – Sequência do RNAm do gene <i>IκBα</i>	998
Anexo C – Sequência do RNAm do gene <i>Tnf</i>	99
Anexo D – Sequência do RNAm do gene <i>Bax</i>	100
Anexo E – Sequência do RNAm do gene <i>Bcl-2</i>	101
Anexo F – Sequência do RNAm do gene <i>Bdnf</i>	102
Anexo G – Sequência do RNAm do gene <i>Gapdh</i>	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Na^+ , K^+ -ATPase

A enzima Na^+ , K^+ -ATPase (Sódio Potássio Adenosina Trisfosfatase) é uma proteína de membrana altamente conservada em eucariotos (Gloor, 1997) que estabelece e mantém altas concentrações intracelulares de K^+ e baixas de Na^+ . Através da hidrólise de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP), a enzima eletrogênica obtém a energia necessária para transportar 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular. O gradiente eletroquímico gerado é fundamental para manter o equilíbrio osmótico das células, o potencial de repouso das membranas e a propriedade excitatória das células musculares e nervosas (Gloor, 1997; Blanco e Mercer, 1998), além de ser responsável pela geração de energia que mantém ativo os transportadores secundários acoplados ao Na^+ , tais como a translocação de íons (H^+ , Ca^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} e SO_4^{2-}), substratos (glicose e aminoácidos) e neurotransmissores por meio da membrana plasmática (Glynn, 1993; Blanco e Mercer 1998).

1.2 As subunidades

Em 1978, o grupo de Marks e Seeds, realizava estudos sobre a sensibilidade da Na^+ , K^+ -ATPase à presença de inibidores (esteróides cardiotônicos, como por exemplo a Ouabaína), quando observou a existência de curvas de inibição heterogêneas. Baseado nos resultados deste trabalho, eles sugeriram a provável existência de isoenzimas na composição da bomba, dados confirmados em trabalhos posteriores (Marks e Seeds, 1978; Peterson et al., 1978; Sweadner, 1979). O termo isoenzima foi usado pela primeira vez em 1959 por Markert e Moller, para designar proteínas diferentes que catalisavam as mesmas reações bioquímicas (Market e Moller, 1959). Com o advento da biologia molecular, diferentes isoformas foram identificadas na constituição das isoenzimas da Na^+ , K^+ -ATPase.

A Na^+ , K^+ -ATPase é uma proteína heterodimérica e integral de membrana composta por três subunidades: uma subunidade α , uma subunidade β altamente glicosilada e uma subunidade γ (Sweadner, 1979; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Malik et al., 1996; Kaplan, 2002). A subunidade α é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima, pois contém sítios de ligação para os íons, para os glicosídeos cardiotônico (como a Ouabaína) e para o ATP (Mercer, 1993; Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Pressley, 1996). São conhecidas quatro isoformas da subunidade α : α_1 , α_2 , α_3 e α_4 (Shamraj e Lingrel, 1994) e

quatro da subunidade β : β_1 , β_2 , β_3 e β_m (Blanco e Mercer, 1998; Geering, 2010). A subunidade β modula a afinidade da enzima pelos íons, favorecendo sua inserção na membrana, enquanto que a subunidade γ parece modular a afinidade aparente pelos íons e pelo ATP (Chow e Forte, 1995; Blanco e Mercer, 1998; Geering, 2008). De forma geral, a Na^+, K^+ -ATPase possui um perfil tecido específico de expressão. Por exemplo, a subunidade α_1 é expressa em todos os tecidos, incluindo neurônios e células da glia, porém no sistema nervoso central (SNC), os neurônios são os sítios de maior abundância da subunidade α_3 enquanto que as células da glia expressam preferencialmente a α_2 . A combinação $\alpha_1\beta_1$ é encontrada em quase todos os tecidos do corpo, sendo a principal isoenzima do rim. A maioria dos neurônios expressa as subunidades α_3 e β_1 , as células da glia expressam predominantemente α_2 e β_2 (em astrócitos) e β_3 (em oligodendrócitos) (Blanco e Mercer, 1998; Benarroch, 2011). A isoforma α_1 é relativamente resistente à Ouabaína (OUA) e às espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto que as isoformas α_2 e α_3 são sensíveis à OUA e as EROs, em ratos (Karpova et al., 2010). O perfil de expressão das isoformas pode variar mediante desenvolvimento, alterações hormonais e durante processos patológicos (Blanco e Mercer, 1998).

1.3 A enzima Na^+, K^+ -ATPase e a Ouabaína

Alguns estudos sugerem que a enzima Na^+, K^+ -ATPase, além de seu papel regulatório na homeostasia iônica, desempenha um papel na transdução de sinal e na ativação da transcrição gênica (Peng et al. 1996; Kometiani et al., 1998; Tian et al., 2001; Xie e Askari, 2002), modulando na presença de OUA, o crescimento e migração celular e a morte celular programada (Abramowitz et al., 2003; Liu et al., 2004; Barwe et al., 2005).

A OUA é um glicosídeo cardiotônico, extraída da árvore africana *Ouabaio* e da planta *Strophanthus gratus*. Após uma série de estudos mostrarem que a adição exógena de esteróides cardiotônicos às células animais resultava em numerosas respostas fisiológicas e bioquímicas (Aizman et al., 2001; Schoner, 2002; Nesher et al., 2007; Larre e Cereijido, 2010), a OUA foi considerada um hormônio endógeno de mamíferos, produzido no córtex da adrenal e no hipotálamo (Schneider et al., 1998; Kawamura et al., 1999; Komiyama et al., 2001; Schoner, 2002). Níveis elevados de OUA circulantes, ainda na faixa de concentração nanomolar (nM), estão associados a alguns processos patológicos como falência renal crônica, hiperaldosteronismo, falência cardíaca congestiva e pré-eclâmpsia (Blaustein 1993, Hamlyn et al., 1998, Bagrov e Shapiro, 2008), e também associados às condições de crescimento e desenvolvimento, à gestação e à vida neonatal (doses que

variam em relação ao período e ao organismo, mas sempre na faixa de picomolar a nanomolar) (Bagrov e Shapiro, 2008; Schoner, 2002; Schoner e Scheiner-Bobis, 2007). Especialmente no período de desenvolvimento fetal, a ligação da OUA a Na^+, K^+ -ATPase parece desempenhar efeito protetor frente a situações deletérias como falta de nutrientes (Li et al., 2010), promovendo no feto o crescimento de dendritos no SNC (Desfrere et al., 2009). Nesse contexto, estudos sugerem que a OUA em concentrações compatíveis com suas ações fisiológicas (entre 0,2 e 1,0 nM) desempenha uma ação importante na atividade de fatores de crescimento (Graves et al., 1984; Blaustein, 1994; Hilton et al., 1996; Dvela et al., 2011).

De fato, podemos destacar que a OUA é capaz de regular a viabilidade celular, quando em concentrações da mesma ordem de magnitude de seus níveis circulantes (Bagrov et al., 2009; Dvela et al., 2011), o que sugere uma relevância fisiológica para o efeito exercido pelos esteróides cardiotônicos na viabilidade celular. Dvela et al. (2011), sugerem que a OUA endógena pode afetar a estimulação de crescimento mediada por outros fatores de crescimento. Entretanto, apesar das evidências mostrarem uma ampla intercomunicação entre fatores de crescimento com a Na^+, K^+ -ATPase e com os esteróides cardiotônicos (Daniel et al., 2010; Kotova et al., 2002), os mecanismos envolvidos nessas interações ainda são desconhecidos.

O fato de a ligação entre OUA e a Na^+, K^+ -ATPase ocorrer com alta afinidade, justificaria as baixas doses de OUA capazes de desencadear a ativação de diferentes vias de sinalização. Estudos mostram que uma das vias ativadas é a $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ (Inositol-trifosfato/Cálcio). Quando a OUA se liga a Na^+, K^+ -ATPase promove uma mudança conformacional que favorece a interação direta de uma região conservada no N-terminal da subunidade α com a região N-terminal do receptor de canal de Ca^{2+} IP_3R , presente no retículo endoplasmático, resultando em abertura e fechamento ritmados do canal. Além dessa interação, a OUA é capaz de promover a oscilação de Ca^{2+} por via dos canais de Ca^{2+} -voltagem dependentes (Aizman e Aperia, 2003; Zhang et al., 2006; Aperia, 2007). Ainda, a enzima Na^+, K^+ -ATPase é capaz de ativar a via da Src quinase (Tian et al., 2006), por meio das interações proteína-proteína. Essa interação se deve principalmente ao fato de estar localizada em cavéolas (Yuan et al., 2005; Tian et al., 2006; Nguyen et al., 2007; Cai et al., 2008). As cavéolas consistem em um subconjunto dos *lipid rafts*, definidas pela presença da proteína caveolina (Parton e Simons, 2007). O conceito de *lipid raft* foi introduzido em 1997, quando se postulou a interação entre esfingolípídios, colesterol e proteína, formando complexos para atuar no tráfego e na sinalização da membrana plasmática (Simon e Gerl, 2010). Assim ocorre a consequente transativação do receptor de

fator de crescimento epidermal (EGFR), que leva a estimulação da via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (Gerondakis, 1999). A via da MAPK, por sua vez pode ativar vários fatores de transcrição, tais como CREB (elemento de resposta ligado ao AMP cíclico) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), os quais estão associados a inúmeros fatores neurotróficos e citocinas (Xie e Askari, 2002; Aizman e Aperia, 2003).

1.4 NF- κ B

Descoberto em 1986, o NF- κ B quando ativo, 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 (Sen e Baltimore, 1986). Este fator é um dímero, geralmente constituído pelas subunidades RelA (também chamado p65) e p50 (Baeuerle e Baltimore, 1996; Siebenlist, 1997). Em mamíferos existem cinco membros da família do fator de transcrição NF- κ B: RelA, RelB e c-Rel, e as proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) e NF- κ B2 (p100) que são processadas a p50 e p52, respectivamente (Hayden e Gosh, 2004). As diferentes combinações de dímeros são responsáveis por ativar (por exemplo, pela ação do dímero p50/RelA) ou bloquear a expressão de genes distintos, como os homodímeros inibitórios p50/p50 e p52/p52 (Ghosh et al., 1998). Todos os elementos κ B possuem um domínio homólogo Rel que é responsável pela ligação ao DNA e pela dimerização.

O fator de transcrição NF- κ B é encontrado em uma variedade de tipos celulares, incluindo neurônios e microglia (Kaltschmidt et al., 1993). O NF- κ B pode ser ativado por estímulos pró-inflamatórios, tais como lipopolissacarídeo (LPS), citocinas (por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 beta (IL-1 β)) e EROs (Glezer et al., 2003; Munhoz et al., 2006; Hoffmann e Baltimore, 2006; Mattson e Meffert, 2006). Na ausência de estímulo, os dímeros de NF- κ B estão ligados às proteínas inibitórias I κ B, que mantém o complexo NF- κ B no citoplasma. Para que ocorra a ativação da via canônica do NF- κ B, é necessário que o complexo de quinases I κ B (IKK), formado por duas subunidades cataliticamente ativas IKK α , IKK β , e pela subunidade regulatória NF- κ B (*essential modifier* - NEMO) ou IKK γ , sejam ativados e promovam a fosforilação da proteína inibitória I κ B que uma vez fosforilada, é ubiquitinada e degradada via proteassoma, liberando os dímeros de NF- κ B, que consequentemente translocam para o núcleo (Perkins, 2007). A atividade transcricional nuclear do NF- κ B é depois controlada por modificações pós-translacionais (Hayden e Gosh, 2004; Oeckinghaus et al., 2011) (Figura 2).

De forma geral, duas principais vias de ativação do NF- κ B existem na célula. A via canônica é induzida pela maioria dos estímulos fisiológicos do NF- κ B, como por exemplo, sinais emanados dos receptores de citocinas como o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), o receptor da interleucina-1 (IL-1R), os receptores de antígenos e receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos, incluindo o receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4). A via canônica é caracterizada pela dependência dos elementos IKK β e NEMO, levando principalmente à fosforilação do I κ B α e à translocação nuclear de dímeros que em sua maioria contém a subunidade RelA. A via não canônica depende da fosforilação mediada pela IKK α , da subunidade p100 associada à RelB que leva ao processamento parcial da p100 gerando complexos p52/RelB. A via não canônica da sinalização do NF- κ B é induzida por membros específicos da família de citocinas TNF, como o ligante de CD40, o fator ativador de célula B (BAFF) e linfotóxina β (Hayden e Gosh, 2004; Oeckinghaus et al., 2011) (Figura 1).

O NF- κ B, regula a expressão de genes que controlam a morte celular programada, a adesão celular, a proliferação, a inflamação e o remodelamento tecidual (Gerondakis et al., 1999; Pahl, 1999; Hayden e Ghosh, 2004; Bonizzi e Karin, 2004; Pasparakis et al., 2006; Oeckinghaus et al., 2011). Dados da literatura mostram que a ativação da via do NF- κ B pode modular a ativação da via canônica do WNT (Gordon et al., 2005), em células embrionárias de drosófila e em linhagens celulares de rim, pâncreas e células tumorais de humanos. A relação funcional entre essas vias pode representar uma das chaves de controle de processos tumorais e neurodegenerativos (Kasperczyk et al., 2009). Dados da literatura indicam um papel dual do NF- κ B no SNC em doenças neurodegenerativas, pois foi demonstrado que a ativação do NF- κ B em neurônios promove sua sobrevivência, enquanto a ativação em células gliais e imunes medeia processos patológicos inflamatórios (Camandola e Mattson, 2007).

A grande relevância do NF- κ B decorre da quantidade de genes implicados em vários processos celulares que são regulados por esse fator de transcrição, tais como a Óxido Nítrico Sintase induzida (*Nosi*), *Il-1 β* , *Tnf*, *I κ B α* , além de genes relacionados à neuroproteção como o Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro (*Bdnf*). Uma vez que a regulação da expressão destes genes tem consequências notáveis para o funcionamento cerebral, o NF- κ B é também reconhecido como um importante modulador dos processos de desenvolvimento, de plasticidade, neurodegenerativos e inflamatórios (O'Neill e Kaltschmidt, 1997; Mattson e Camandola, 2001; Mattson e Meffert, 2006; Tang et al., 2008).

Estudos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que a após 1 hora da administração intrahipocampal de OUA em ratos ocorreu aumento na expressão de genes associados à sinalização inflamatória e possível neuroproteção através da modulação do NF- κ B, em parte pela ação dos receptores glutamatérgicos tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato)(Kawamoto et al., 2012a). Além disso, estudos em cultura de células primárias de cerebelo de rato mostraram o envolvimento da via NMDA-Src-Ras-MAPK na ativação do NF- κ B pela OUA (Sá Lima et al., em fase de publicação). Os resultados desses estudos confirmam a existência de um novo tipo de sinalização para a OUA no SNC (Kawamoto et al., 2012a).

Figura 1 - Vias de sinalização canônica e não canônica do NF- κ B. Na ausência de estímulo, os dímeros do NF- κ B encontram-se ligados à proteína inibitória I κ B, que retém o complexo inativo do NF- κ B no citoplasma. Na presença de estímulo, a proteína I κ B é degradada pela fosforilação mediada pelo complexo I κ B quinase (IKK), constituído das subunidades cataliticamente ativas IKK α e IKK β e pela subunidade regulatória NEMO. As proteínas I κ B fosforiladas são alvo para a ubiquitinação e para a degradação via proteassoma, que libera os dímeros de NF- κ B para translocar para o núcleo. A sinalização do NF- κ B ocorre por duas vias distintas, a via canônica esquematizada a esquerda e a não canônica, esquematizada a direita.

FONTE: Oeckinghaus et al. (2011).

1.5 Via de sinalização WNT

As proteínas WNT constituem uma família de glicoproteínas secretadas que são importantes mediadores da comunicação celular, e que participam de diversos processos celulares, na embriogênese e na homeostase de tecidos adultos, inclusive do SNC (Inestrosa e Arenas, 2010). A sinalização pela proteína WNT pode acontecer por meio de três vias conhecidas: a via canônica WNT/ β -CATENINA e duas vias não canônicas, uma relacionada à polaridade celular e a outra relacionada à sinalização por Ca^{2+} . No entanto, a mais estudada e conhecida é a via canônica WNT/ β -CATENINA, altamente conservada entre espécies, que regula a estabilidade da β -CATENINA citoplasmática, permitindo sua translocação para o núcleo (Logan e Nusse, 2004).

No momento da estimulação por WNT, dois receptores de membrana distintos atuam para iniciar a sinalização: o receptor de sete alças transmembrana chamado Frizzled e o receptor de lipoproteína de baixa densidade tipo 5 ou 6 (LRP-6/-5) (Bhanot et al., 1996; Pinson et al., 2000; Wehrli et al., 2001; Huang e He, 2008; Fiedler et al., 2011), que formam um complexo que inicia uma cascata de interações moleculares, levando à estabilização citoplasmática do modulador transcricional β -CATENINA. A β -CATENINA estável acumula-se no citoplasma e migra para o núcleo, aonde irá se complexar com membros da família do fator promotor de célula T/linfócito (TCF/LEF) (Fiedler et al., 2011; Billic et al., 2007), aumentando a expressão de genes como a *Ciclina D1* (Tetsu e McCormick, 1999), *c-Myc* (He et al., 1998), *VEGF* (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular), *Endotelina-1*, *Dickkopf 1*, *TCF-1*, dentre outros (Freese et al., 2010).

Na ausência de estímulo, a estabilidade da proteína β -CATENINA é comprometida devido a sua ligação ao supressor tumoral *adenomatous polyposis coli* (APC) que favorece a ação das quinases Glicogênio Sintase Quinase-3 β (GSK-3 β) e caseína quinase-1 (CK1), que fosforilam os resíduos serina e treonina na porção N-terminal da β -CATENINA, sinalizando sua degradação através do sistema ubiquitina-proteassoma. As proteínas AXINA, APC, GSK-3 β e CK-1 compõem o complexo de destruição (Huang e He, 2008; Fiedler et al., 2011).

Essa via regula o destino celular, a proliferação, a auto-renovação de células-tronco e progenitoras, a diferenciação, a transformação, a migração e a adesão celular (Angers e Moon, 2009). A sinalização anormal da WNT/ β -CATENINA está associada ao aparecimento de câncer, osteoporose, a inflamação, ao envelhecimento e as doenças degenerativas (Logan e Nusse, 2004; Clevers, 2006; Huang e He, 2008; Hu et al., 2011). Mutações que levam ao aumento da estabilidade da β -CATENINA são observadas em tumores (Clevers et

al., 2006; Barker et al., 2006), enquanto que a redução dos níveis de sinalização da β -CATENINA parece estar associada a doenças neurodegenerativas (Terstappen et al., 2006; Verkaar et al., 2011).

Na fase de desenvolvimento, a via canônica da WNT parece estimular a divisão das células progenitoras resultando na expansão do tubo neural e na diferenciação dessas células em neurônios (Chenn e Walsh, 2002). Na fase adulta, a via da WNT participa no aumento da proliferação das células tronco neuronais (Lie et al., 2005; Wexler et al., 2009). No SNC de mamíferos adultos, a neurogênese é considerada um processo ativo, que ocorre em duas regiões específicas do cérebro, a zona subgranular (SGZ) no giro denteado (hipocampo) e na zona subventricular (SVZ) no ventrículo lateral do prosencéfalo. A neurogênese engloba a proliferação celular e a especificação do destino das células neuronais progenitoras adultas, com subsequente diferenciação, maturação, movimentação e integração aos circuitos neuronais já existentes (Duan et al., 2008). Evidências sugerem que esses novos neurônios são essenciais para as funções cerebrais, como aprendizado, memória, olfato e modulação do humor (Lie et al., 2004).

Para regular a diferenciação de células e tecidos, a via WNT interage com outras vias de sinalização, como a Sonic Hedgehog (Liebner e Plate, 2010) e a NF- κ B, dentre outras (Hu et al., 2011). Aparentemente, a GSK-3 β , regulador negativo da β -CATENINA, tem papel central nessa interação, regulando positivamente o NF- κ B pela modulação do I κ B. Ainda, a β -CATENINA por si só interage com a subunidade p50 impedindo a ativação da via (Bournat et al., 2000; Hoeflich et al., 2000; Holmes et al., 2008; Vlantis et al., 2011). Recentemente, sugeriu-se que a β -CATENINA parece ser um potente estimulador da Na⁺,K⁺-ATPase. Sopjani et al. (2010) mostraram que o aumento da expressão de β -CATENINA em ovócitos de *Xenopus* parece aumentar o fluxo de íons pela bomba, através de sua estimulação. Alguns trabalhos sugerem que essa estimulação deve ocorrer porque a β -CATENINA é capaz de estimular o transporte e o aumento da expressão da proteína SGK1 (*serum- and glucocorticoid- inducible kinase1*) (Naishiro et al., 2005; Dehner et al., 2008), que regula a atividade de uma variedade de canais iônicos, inclusive da Na⁺, K⁺-ATPase (Lang et al., 2006; Boehmer et al., 2008a, b; Schuetz et al., 2008; Gehring et al., 2009; Krueger et al., 2009; Laufer et al., 2009; Lang et al., 2009). Além disso, a SGK1 regula a atividade de uma série de enzimas e proteínas, como a GSK-3, a β -CATENINA, o NF- κ B e o p53. (Lang et al., 2006, 2009; Tai et al., 2009). A SGK1 ainda participa da sinalização do BDNF em ratos (Lang et al., 2006). O BDNF regula a sobrevivência neuronal, a plasticidade, o humor e a formação de memória de longa duração (Lang et al., 2006).

Apesar de muito estudada no desenvolvimento embrionário, pouco se sabe sobre o papel da sinalização induzida pela WNT no SNC adulto. Evidências indicam que a via de sinalização WNT modula aspectos fundamentais do SNC adulto, como a neurogênese, a estabilidade sináptica e a plasticidade em algumas áreas do cérebro, o que remete essa via a possíveis benefícios terapêuticos (Inestrosa e Arenas, 2010; Kawamoto et al., 2012b). Drogas capazes de modular a via WNT podem se tornar ferramentas para a regeneração e a neuroproteção e para o tratamento de doenças associadas à perda de neurônios como, por exemplo, as doenças de Alzheimer e Parkinson (Logan e Nusse, 2004; Clevers, 2006; Huang e He, 2008).

Figura 2 - Esquema simplificado das vias de sinalização intracelular associadas à ação da proteína WNT nos receptores Frizzled (FZ). A ligação da proteína WNT ao Fz ativa uma proteína citoplasmática denominada Dishevelled (DVL). A DVL ativada induz a separação de um complexo que consiste de AXIN, *adenomatous polyposis coli* (APC), glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3 β) e β -catenina. Nas células que não são estimuladas pela WNT, a GSK-3 β fosforila a β -catenina que é então degradada pelo sistema proteassoma. Porém, a ativação da via resulta na inibição da GSK-3 β , que leva a um aumento nos níveis de β -catenina citoplasmática, que migra para o núcleo para formar o complexo da β -catenina com o fator de transcrição célula T específica (TCF) e com o fator reforçador (*enhancer*) do linfócito (LEF) que por sua vez, modula a transcrição de genes alvos. Além da via canônica ou WNT/ β -catenina, outras duas vias podem ser ativadas pela DVL: a via da polaridade planar celular (PCP), e a via WNT/cálcio, sendo que existem evidências de que pode ocorrer um *crosstalk* entre estas vias. A proteína WNT pode sinalizar também via Tab1/Tak 1 (proteína quinase ativada pelo fator de crescimento TGF- β) que ativa NLK (proteína quinase do tipo nemo) e que por sua vez reprime a ativação do fator de transcrição NF- κ B.

FONTE: Scavone C (2012).

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi verificar se a administração intrahipocampal de OUA é capaz de ativar o NF- κ B e modular a via de sinalização canônica da WNT em ratos.

Para atingir o objetivo proposto, realizamos as seguintes abordagens experimentais:

- 1) Avaliamos a influência da OUA, após 1h, 2, 10, 24 e 48 horas da sua administração intrahipocampal, sobre o fator de transcrição NF- κ B, por ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) para NF- κ B e Western blotting da subunidade RelA do NF- κ B, e da relação entre a forma fosforilada e não fosforilada do I κ B α ;
- 2) Avaliamos a modulação pela OUA da via canônica da WNT pela relação entre a forma fosforilada e não fosforilada da GSK-3 β citoplasmática e da forma total citoplasmática e nuclear da β -CATENINA por Western blotting em hipocampus de ratos, ao longo do decurso temporal explorado;
- 3) Avaliamos a influência da OUA (1h, 2, 10, 24 e 48 horas após a sua administração intrahipocampal) sobre a transcrição gênica de *Bax/Bcl-2*, *Tnf*, *Nosi* e *Bdnf* por ensaio de RT-PCR;

Esquema 1 - Esquema representativo resumando o objetivo do projeto. Nessa figura a OUA ligada a Na⁺,K⁺-ATPase promove a ativação da via NF- κ B após 1 hora. Em paralelo está a via de sinalização WNT/ β -CATENINA ativada pela ligação da WNT ao receptor. O Objetivo é verificar se a via da WNT é ativada na presença de OUA, e se essa ativação é imediata ou tardia.

FONTE: Orellana AMM (2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (250-300 g) provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O protocolo experimental segue todas as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado sob o número 124, na folha 93 do livro 2. Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia-ICB, USP/SP, onde permaneceram em grupos de 3 animais por gaiola de polipropileno, por um período de ambientação mínimo de 1 semana antes do início dos experimentos. A temperatura ambiente foi mantida constante (22 ± 2 °C), sob ciclo de iluminação controlado claro / escuro (claro entre 6 - 18h) e fornecimento de água e ração *ad libitum*.

3.2 Implantação da cânula no hipocampo dos ratos

A cânula implantada situa-se na região CA1 do hipocampo, de ambos os hemisférios dos ratos. O animal foi anestesiado com a mistura (1:1) de quetamina 10% (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e xilazina 2% (Syntec) (0,15 ml/kg, i.p.). Após tricotomia, a cabeça do animal foi fixada no estereotáxico, seguida de assepsia local com peróxido de hidrogênio 3% e via incisão de 2 cm, a calota craniana foi exposta e limpa com algodão retirando-se a dura-máter. Tomando-se o bregma como referência, o crânio foi perfurado com broca odontológica em dois pontos situados exatamente a 3,5 mm posterior ao bregma, 2,0 mm lateralmente e as cânulas foram inseridas a 2,7 mm de profundidade (de acordo com o atlas Paxinos, Watson, 1986). A cânula foi fixada ao crânio com acrílico autopolimerizante. Na cânula foi colocado mandril (fio ortodôntico), com a ponta externa dobrada, para evitar a exposição da região interna do crânio ao meio ambiente. A verificação da posição correta das cânulas foi feita logo após a decaptação, de forma visual e por meio de corte histológico (Figura 3).

Figura 3 - Corte histológico representativo de uma seção coronal do cérebro de um rato. O corte mostra a posição bilateral da inserção das cânulas guia no hipocampo dorsal (setas). CA1, campo CA1 do hipocampo, cc, corpo caloso, DG giro denteado.

FONTE: Kawamoto et al. (2012a). Com permissão.

3.3 Infusão da Ouabaína (OUA)

As infusões foram realizadas após quinze dias da cirurgia, para evitar a interferência de um possível processo inflamatório decorrente da intervenção cirúrgica. Foram usadas microseringas Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA) com auxílio da bomba de infusão (KdScientific, Holliston, MA, EUA), conectada a um tubo de polietileno, onde é fixada uma agulha gengival 30G (Terumo, Toquio, Japão). O hemisfério direito do animal foi selecionado para receber o tratamento e o hemisfério esquerdo, para ser o controle. A OUA (Sigma, St Louis, MO, EUA) foi dissolvida em salina 0,9% obtendo-se a concentração final de 5 nM. Os animais receberam volume total de 2 μ L da solução de Ouabaína ou de salina. O tempo de infusão foi de 2 minutos, permanecendo a agulha inserida na cânula guia por mais 4 minutos, a fim de evitar o refluxo do líquido infundido (Bersier e Arnaiz, 2009). Alguns animais não receberam solução salina no hemisfério controle, para verificar o efeito da cânula por si só sobre as variáveis avaliadas.

Os grupos de animais tratados estão esquematizados na seguinte tabela:

Tabela 1 - Esquema de tratamento dos grupos de animais.

Grupo	Controle	Tratamento	Esquema Tratamento	N amostral
1 hora	Salina 0,9%	Ouabaína 10 nM	Sacrifício após 1 h	10
2 horas	Salina 0,9%	Ouabaína 10 nM	Sacrifício após 2 hrs	10
10 horas	Salina 0,9%	Ouabaína 10 nM	Sacrifício após 10 hrs	10
24 horas	Salina 0,9%	Ouabaína 10 nM	Sacrifício após 24 hrs	10
48 horas	Salina 0,9%	Ouabaína 10 nM	Sacrifício após 48 hrs	10

Os animais foram sacrificados por decapitação para testes bioquímicos e os cérebros foram rapidamente retirados em solução fria de tampão salina-fosfato (PBS). O hipocampo foi dissecado e imediatamente imerso em nitrogênio líquido. Os tecidos foram estocados a -80°C até à preparação dos tecidos para os ensaios de RT-PCR, Western blotting e EMSA.

Esquema 2 - Representação esquemática do delineamento experimental. Ratos Wistar machos adulto foram submetidos à cirurgia de implantação de cânulas por meio de estereotaxia. Cânulas foram implantadas na região CA1 do hipocampo, em ambos os hemisférios. Após o intervalo de 15 dias os animais receberam infusão de salina 0,9 % no hemisfério esquerdo (controle) e OUA 10 nM no hemisfério direito (tratado). Os animais foram primeiramente divididos em 2 grupos e sacrificados após 1 hora e 24 horas. Após análise dos resultados foram acrescentados mais três grupos, nos quais os animais foram sacrificados após 2 horas, 10 horas e 48 horas.

FONTE: Orellana AMM (2012).

3.4 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares

O método usado foi descrito em Rong e Baudry (1996). As estruturas (aproximadamente 100 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em homogeneizadores vidro-vidro com tampão fosfato-salina (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; KH_2PO_4 1,27 mM; Na_2HPO_4 8,06 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases (PMSF 0,5 M; DTT 0,5 M; leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; antipaína 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e EDTA 0,1 mM e centrifugado à $12,000 \times g$ por 30 segundos à 4°C . O pellet foi ressuscitado em 700 μL de tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl_2 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; antipaína

2µg/mL), incubado 10 minutos em gelo e adicionado 10 µL de NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se à 12.000 x g por 30 segundos à 4 °C. O sobrenadante foi armazenado e o pellet foi ressuspendido em 100 µL de tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25 %; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL) e incubado 20 minutos em gelo, centrifugando-se o extrato à 12.000 x g por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando reagente da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina fornece a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.5 Ensaio de Western Blotting para GSK3β, β-CATENINA, IκB, p65, NOSi, BDNF, AKT e ERK2

A preparação do tecido e a extração das proteínas seguem conforme item 3.4.

O método usado é baseado no descrito por Laemmli et al (1970). As proteínas foram ajustadas na concentração adequada com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M DTT; 0,02% azul de bromofenol; pH 6,8) e aquecidas por 5 minutos a 95 °C. As amostras foram aplicadas no gel de SDS-PAGE 10 % [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10 % SDS]. Para a eletroforese (2 h, 90 V) é usado um tampão de corrida (25 mM tris-base; 0,192 M glicina; 0,1 % SDS). Ao final da corrida, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose por 90 min a 400 mA. Para a transferência é 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 deixadas por 1 hora na solução de bloqueio (TBS [100 mM tris-base; 0,9 % NaCl e água], 0,5 % leite desnatado, 0,05 % tween 20). Após essa etapa, as membranas foram lavadas em solução de TTBS (TBS; 0,1 % Tween 20) e incubadas com o anticorpo primário diluído em TTBS, *overnight*, a 4 °C. Os anticorpos primários usados foram: anti- GSK3β 1:1000 (Cell Signaling; Danvers, MA, EUA), anti- pGSK3β 1:500 (Cell Signaling), Anti-β-CATENINA 1:1000 (Millipore, Billerica, MA, USA), Anti-IκB 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA), Anti-plkB 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology), Anti-p65 1:500 (Santa Cruz Biotechnology), Anti-NOSi 1:500 (NOS2-Santa Cruz Biotechnology), Anti-BDNF 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology), Anti-pAKT 1:500 (Santa Cruz Biotechnology), Anti-AKT 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology), Anti pERK2 1:500 (Santa Cruz Biotechnology) e Anti ERK2 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-Mouse 1:2000

(Sigma), anti-Rabbit 1:2000 (Sigma) e anti-Goat 1:3000 (Sigma). A revelação foi feita por meio de kit de quimioluminescência ECL (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 RT-PCR

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). O RNA total extraído foi ressuspensionado em água com DEPC e estocado a -80 °C até o dia do ensaio. A leitura das absorbâncias para o cálculo das concentrações de RNA total foi realizada em 260 nm e então uma solução contendo 2 µg de RNA total foi preparada para ser utilizada no ensaio de RT-PCR.

3.6.1 Reação de RT (transcriptase reversa): Transcrição do cDNA

Em uma primeira etapa, todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen) de acordo com o fabricante para eliminar a presença de DNA nas amostras. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 25 °C numa mistura contendo DNase livre de RNase e tampão da DNase livre de RNase. Após este tempo, as amostras foram incubadas a 65 °C com EDTA (25 mM) (Invitrogen) por 10 minutos.

A reação pela transcriptase reversa (RT) foi realizada usando 500 ng de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) a 70 °C por 5 minutos. Após este tempo, os tubos foram imediatamente colocados no gelo e os seguintes reagentes foram adicionados: 4 µL de tampão RT 5x concentrado (Fermentas, Hanover, MD, EUA), 2 µL de dNTP mix 10 mM (Fermentas, Hannover, MD, EUA), 1 µL de inibidor de ribonuclease 1000 U (Fermentas) por 5 minutos a 25 °C e em seguida foi adicionado 1 µL de RT 1000U (Fermentas). Essa mistura foi incubada por 10 minutos a 25 °C, seguida de uma incubação de 60 minutos a 42 °C e por último de 70 °C há 10 minutos. Após esse tempo, a reação terminou com aquecimento de 70 °C por 15 minutos. Até o momento de serem submetidas ao RT-PCR, as amostras foram mantidas a -80 °C.

3.6.2 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

Os oligonucleotídeos iniciadores para *Nosi*, *IκBα*, *Tnf*, *Bax*, *Bcl-2*, *Bdnf* e *Gapdh* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foram diluídos em tampão TE (10mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1mM de EDTA) a uma concentração de 100 μM. O volume final da reação de PCR foi de 25 μL, contendo 1 μL de cDNA (amostra), 2,5 μL de tampão para PCR 10 x concentrado (Invitrogen), 0,5 μL do oligonucleotídeo iniciador 5' (direto) (10 μM), 0,5 μL do oligonucleotídeo iniciador 3' (inverso) (10 μM), 0,5 μL de dNTP Mix (100 mM), 1 μL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 μL de *Taq Polimerase* 5 U/mL (Invitrogen) e 18,81 μL de água com DEPC. A reação foi realizada em aparelho PCR Modelo TC-512, Techne Inc. (Burlington, NJ, USA).

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de RT-PCR, para amplificação da região codificadora de *Nosi*, *IκBα*, *Tnf*, *Bax*, *Bcl-2*, *Bdnf*, *Gapdh*.

Primer	Sequência (5'-3')
<i>Nosi</i> (Anexo A)	Direto: GTGCTAATGCGGAAGGTCAT Inverso: CCAAATGTGCTTGTCCACCAC
<i>IκBα</i> (Anexo B)	Direto: CATGAAGAGAAGACACTGACCATGGAA Inverso: TGGATAGAGGCTAAGTGTAGACACG
<i>Tnf</i> (Anexo C)	Direto: AGGCGCTCCCCAAAAAGATG Inverso: GATGGCAGAGAGGAGGCTGA
<i>Bax</i> (Anexo D)	Direto: TGAAGTGGACAACAACATGGAGC Inverso: GCTGCTTGTCTGGATCCAAGACC
<i>Bcl2</i> (Anexo E)	Direto: GGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAG Inverso: TATGCACCCAGAGTGATGCAGGC
<i>Bdnf</i> (Anexo F)	Direto: ATGCTCAGCAGTCAAGTGCC Inverso: AGCCTTCCTTCGTGTAACCC
<i>Gapdh</i> (controle interno) (Anexo G)	Direto: GCCAAGTATGATGACATCAAG Inverso: TCCAGGGTTTCTTACTCCTTGGA

Aproximadamente 20 μL dos produtos de reação de PCR foram submetidos a um gel de agarose 1,5 % contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio. A visualização dos géis foi realizada sob luz UV e as imagens foram capturadas usando um aparelho Eagle Eye (Amersham, Piscataway, NJ, USA).

3.7 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

3.7.1 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.

3.7.2 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 poli(acrilamida) 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).

3.8 Análise dos resultados

Os dados decorrentes do ensaio de EMSA, de Western blotting e de RT-PCR foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando o programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Os dados receberam tratamento estatístico pelo teste t-Student, onde as diferenças serão consideradas significantes para o valor $p \leq 0,05$. Todos os gráficos são representados como a média dos valores $\pm$ erro padrão da média (E.P.M).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da Quantificação das Proteínas GSK-3 β , pGSK-3 β , β -CATETINA e NOSi, pelo Método de Western Blotting

O objetivo da padronização era definir qual a concentração ideal de proteínas totais, e qual era a diluição mais adequada de anticorpo primário, para cada uma das proteínas analisadas. Baseando-se em experiências anteriores do laboratório foi possível prever, quais seriam os pontos da curva. Assim, para cada anticorpo foram feitas duas membranas contendo cinco pontos de concentrações diferentes, sendo uma membrana incubada na diluição de anticorpo primário 1:500 e a outra em 1:1000.

Os anticorpos padronizados foram: os anti-GSK-3 β (Cell Signaling), anti-pGSK-3 β (Cell Signaling), Anti- β -CATENINA (Cell Signaling) e anti-NOSi (NOS2-Santa Cruz Biotechnology). Para os anticorpos Anti-I κ B (Santa Cruz), Anti-pI κ B α (Santa Cruz), Anti-p65 (Santa Cruz), Anti-pAKT (Santa Cruz), Anti-AKT (Santa Cruz) e Anti-BDNF (Santa Cruz) não foi necessário realizar a padronização em função da existência de padronização prévia no laboratório. Os anticorpos secundários foram utilizados nas diluições de anti-camundongo 1:2000 (Sigma), anti-coelho 1:2000 (Sigma) e anti-cabra 1:3000 (Sigma).

O ponto da curva escolhido como ideal foi o que estava entre os pontos de ascensão da sigmóide, ou seja, os de fácil diferenciação de valores de leitura de densidade óptica, em relação ao ponto abaixo e acima do máximo e mínimo de detecção, através do software ImageJ.

Em todos os ensaios de Western Blotting foi usado um controle positivo. Para a via da WNT, o controle positivo foi células HEK293 (1×10^6 células) cultivadas por 3 dias em placa de 75 cm² com DMEM suplementado de 2 mM glutamax (Invitrogen), 1 % penicilina, estreptomicina (Invitrogen) e 10 % soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Após o período de cultivo, as células foram raspadas com PBS e centrifugadas. O pellet foi removido para extração de proteínas citosólicas e nucleares. O controle positivo para a via do NF- κ B foi amostras de hipocampo de rato que recebeu uma dose intraperitoneal de LPS (5 mg/Kg), suficiente para desenvolver uma resposta inflamatória intensa, sob a qual o animal foi mantido por 2 horas até ser sacrificado.

4.1.1. GSK-3 β e pGSK-3 β

Para padronizar a quantidade de proteína para o ensaio, foram aplicados 2, 5, 7, 10 e 15 μ g de proteínas totais. Para a forma total do GSK-3 β , o ponto de melhor diferenciação foi 7 μ g, que se encontra no centro da ascensão da curva do gráfico da análise densitométrica do GSK-3 β (U.A.) por μ g de proteína, sendo a melhor diluição do anticorpo primário a de 1:1000 (Figura 4A). Já para a forma fosforilada da proteína, pGSK-3 β , o melhor ponto foi 5 μ g, e a diluição do anticorpo primário foi de 1:500 (Figura 4B). O controle positivo utilizado foram as células HEK293.

Figura 4 - Ensaio de Western Blotting para curva de padronização do GSK-3 β e pGSK-3 β (48KDa), de hipocampo. (A) Autoradiografia e análise densitométrica em unidades arbitrárias (U.A) das bandas obtidas no ensaio de GSK-3 β , em diferentes concentrações de proteína total a partir de amostra controle. A concentração que corresponde ao centro da curva em ascensão é 7 μ g. **(B)** Autoradiografia e análise densitométrica das bandas em unidades arbitrárias (U.A) obtidas no ensaio de pGSK3 β . Os resultados mostram bandas correspondentes as diferentes concentrações de proteína, provenientes de amostra de rato controle. A concentração que corresponde ao centro da curva em ascensão é 5 μ g.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.1.2 β -CATENINA Nuclear e Citoplasmática

Durante o processo de padronização das amostras para β -CATENINA, foram feitas as curvas para as proteínas citoplasmáticas e nucleares seguindo os pontos 2, 5, 7, 10 e 15 μ g. Para a curva da β -CATENINA citoplasmática, a concentração ideal foi de 7 μ g (Figura 5). No entanto, para a curva das amostras nucleares, devido à baixa concentração de β -CATENINA no núcleo em condições normais foi necessário aumentar a concentração de proteínas aplicadas. Dessa forma a curva foi feita com os pontos: 10, 15, 20, 25 e 30 μ g. A concentração ideal foi de 15 μ g. As diluições dos anticorpos encontradas foram 1:500 e 1:1000, respectivamente.

Figura 5 - Ensaio de Western Blotting para curvas de padronização das proteínas β -CATENINA citoplasmática e nuclear (95KDa), de hipocampo. (A) Autoradiografia e análise densitométrica das bandas em unidades arbitrárias (U.A.) obtidas no ensaio correspondentes à expressão protéica da β -CATENINA na fração citosólica, nas concentrações de 2, 5, 7, 10 e 15 μ g. A concentração que corresponde ao centro da curva em ascensão é 7 μ g. (B) Autoradiografia e análise densitométrica das bandas em unidades arbitrárias (U.A.) obtidas no ensaio da expressão protéica da β -CATENINA na fração nuclear, nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 μ g. Nesse caso, a concentração que corresponde ao centro da curva em ascensão é 15 μ g.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.1.3 NOSi

A Oxido Nítrico Sintase Induzida (NOSi) pode ser considerada como um dos indicativos da ativação da via NF- κ B. No entanto, também pode indicar aumento da produção de EROs e a presença de processos inflamatórios. Visto seu importante papel na sinalização do NF- κ B, a padronização foi feita usando as concentrações de 2, 5, 7, 10 e 15 μ g. A menor concentração possível capaz de ser claramente distinguida pela leitura de densidade óptica foi a de 5 μ g (Figura 6). O controle positivo utilizado foi uma amostra de hipocampo de rato tratado com LPS.

Figura 6 - Ensaio de Western Blotting para curva de padronização da proteína NOSi (130 KDa), de hipocampo. (A) Autoradiografia e análise densitométrica das bandas em unidades arbitrárias (U.A) obtidas no ensaio da NOSi correspondente as concentrações 2, 5, 7, 10 e 15 μ g. A curva de concentração das proteínas totais indica o ponto 5 μ g como ideal.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.2 Resultados dos Efeitos da Administração de OUA (10 nM) na sinalização imediata e tardia associada ao NF- κ B

4.2.1 Efeitos da OUA (10 nM) na expressão de I κ B e pI κ B em hipocampo de rato, após 1 hora

O grupo OUA apresentou após 1 hora de infusão, aumento na expressão de pI κ B e diminuição na expressão de I κ B, em relação ao controle. Esses dados sugerem aumento na degradação das proteínas I κ B, pelo aumento da sua fosforilação e, portanto, possível aumento da translocação nuclear dos dímeros de NF- κ B, livres no citoplasma (Figura 7).

Figura 7 - Efeitos da OUA (10 nM) na modulação das proteínas I κ B e pI κ B, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1 hora da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia representativa de Western Blotting das proteínas I κ B, pI κ B e β -TUBULINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de I κ B/ β -TUBULINA e pI κ B/ β -TUBULINA. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais. * $p < 0,05$; Dados pareados, salina *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.2.2 Efeitos da OUA (10 nM) na translocação da subunidade p65 do NF- κ B em hipocampo de ratos, após 1 hora

Os ensaios de Western Blotting revelam que o hemisfério que recebeu OUA apresenta maior translocação nuclear da subunidade p65 em relação ao hemisfério controle. A subunidade p65 citoplasmática, por sua vez, apresenta-se diminuída no grupo OUA em relação ao grupo controle, confirmando os dados obtidos na fração nuclear. O controle positivo usado foi extrato de hipocampo de rato que recebeu uma dose de LPS, 5 mg/Kg (dados não apresentados). A β -ACTINA foi usada como controle endógeno.

Figura 8 - Efeitos da OUA (10 nM) na translocação da subunidade p65 do NF- κ B, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1 hora da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina (injetada no hipocampo oposto). **(A)** Autoradiografia representativa de Western Blotting da subunidade p65 nuclear, citosólica e β -ACTINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de p65 nuclear/ β -ACTINA e p65 citosólica/ β -ACTINA. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais. * $p < 0,05$; dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.2.3 Efeitos da OUA (10 nM) na translocação da subunidade p65 do NF- κ B em hipocampo de ratos, após 2 horas

Com o intuito de verificar se a ativação em 1 hora era persistente, um grupo de animais foi sacrificado 2 horas após receber a infusão de 10 nM de OUA e salina. Os achados mostram que não há alteração na translocação nuclear da subunidade p65 dos dímeros de NF- κ B (Figura 9).

Figura 9 - Efeitos da OUA (10 nM) na translocação da subunidade p65 do NF- κ B, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 2 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia representativa de Western Blotting da subunidade p65 nuclear, e β -TUBULINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de p65 nuclear/ β -TUBULINA. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. Dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.2.4 Efeitos da administração de OUA (10 nM, nos tempos 1 e 2 horas) na ativação da via NF- κ B, por ensaio de EMSA

Dados obtidos no ensaio de EMSA das amostras de hipocampo de ratos em 1 e 2 horas, revelam ativação da via do NF- κ B após 1 hora, com translocação predominante dos dímeros de p65/p50 e p50/p50 para o núcleo (Figura 10).

Figura 10 - Curva de decurso temporal de 1 e 2 horas na ativação da via NF- κ B em hipocampo de ratos. **A.** As proteínas nucleares (10 μ g) foram extraídas do hipocampo de ratos e obtidas após 1 hora ou 2 horas da infusão de OUA (10 nM), ou salina 0,9% (injetada no hipocampo oposto). A posição dos complexos de proteína-DNA formados está indicada (p65p50 e p50p50). **B.** As proteínas nucleares extraídas do hipocampo de ratos, após 1 hora da infusão de OUA (10 nM), ou salina 0,9% (injetada no hipocampo oposto). A posição dos complexos de proteína-DNA formados está indicada (p65p50 e p50p50). LI, ligação inespecífica. A localização da sonda livre está indicada. Os ensaios são representativos de três experimentos. **C.** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das bandas p50/p50 e p65/p50 presentes em B. **D.** Ensaio de Competição e Super shift da ativação do NF- κ B. O ensaio de competição foi feito na presença e na ausência de oligonucleotídeos específicos de NF- κ B, 20 vezes em excesso, ou não específicos (sequência consenso TFIID, 20 vezes em excesso). O ensaio de super shift foi feito com extrato nuclear incubado na presença e na ausência de anticorpos contra as subunidades p50, p65 p52 e c-Rel, todos na diluição 1:20. Os anticorpos foram adicionados 20 minutos antes da adição do oligonucleotídeo consenso para NF- κ B, radioativo. LI, ligação inespecífica. Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média (n=4). *p<0,001; dados pareados, salina *versus* OUA (Teste t-Student).

4.2.5 Efeitos da Administração de OUA (10 nM, nos tempos 10, 24 e 48 hrs) na ativação do NF- κ B, por ensaio de EMSA

Para verificar se o tratamento com a OUA foi capaz de promover a ativação da via do NF- κ B, ao longo do decurso temporal, foram realizados ensaios EMSA das amostras de hipocampo de ratos obtidas nos tempos de 10, 24 e 48 horas. Os resultados revelam ativação da via do NF- κ B.

Figura 11 - Curva de decurso temporal de 10 a 48 horas na ativação da via do NF- κ B em hipocampo de ratos. A. As proteínas nucleares (10 μ g para os tempos 10 e 48 horas e 20 μ g para o tempo 24 horas) foram extraídas do hipocampo de ratos e obtidas após 10, 24 ou 48 horas da infusão de OUA (10 nM), ou salina 0,9%. A posição dos complexos de proteína-DNA formados está indicada (NF- κ B). B, C e D. Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das bandas representativas dos complexos formados proteína-DNA, após 10, 24 e 48 horas, respectivamente, expostos em A. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=5). *p<0,001; dados pareados, salina *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.3 Efeitos da OUA (10 nM) na expressão de NOSi

Os ensaios de Western Blotting mostram ausência de modulação na expressão da enzima NOSi após 1 hora da infusão de OUA 10 nM (Figura 12). A β -TUBULINA foi usada como controle endógeno.

Figura 12 - Efeitos da OUA (10 nM) na modulação da proteína NOSi (130 KDa), em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1 hora da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. (A) Autoradiografia representativa de Western Blotting da proteína NOSi e β -TUBULINA. (B) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de NOSi/ β -TUBULINA. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão de 6 experimentos individuais. * $p < 0,05$; dados pareados, salina versus OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.4 Efeitos da administração de OUA (10 nM) nos níveis de RNAm dos genes *Bcl2*, *Bax*, *Bdnf*, *Tnf*, *Nosi* e *I κ B α* , em hipocampo de rato, após 1 hora.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) das amostras obtidas após 1 hora da infusão de OUA 10 nM ou salina 0,9%, mostrou que o grupo que recebeu a OUA apresentou aumento nos níveis de RNAm dos genes *Bcl2*, *Nosi*, *Tnf* e *Bdnf*. Os níveis de RNAm dos genes *Bax* e *I κ B α* não foram modulados pela OUA.

Figura 13 - Efeitos da OUA (10 nM) nos níveis de RNAm para *Bcl2*, *Bax*, *Bdnf*, *Tnf*, *Nos* e *I κ B*, em hipocampo de rato. Fotografias representativas de PCR e análise densitométrica (unidades arbitrárias, U.A) das bandas específicas do grupo tratado com OUA. Os níveis de RNAm são apresentados em relação aos níveis de RNAm do controle *Gapdh*. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para 4 experimentos individuais. * $p < 0.05$, controle versus tratamento em hipocampus opostos. (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.5 Efeitos da administração de OUA (10 nM) nos níveis de RNAm dos genes *Bcl2*, *Bax*, *Bdnf*, *Tnf* e *Nosi* em hipocampo de rato, no período de 10, 24 e 48 horas

4.5.1 Em 10 horas

Os resultados obtidos nos ensaios de RT-PCR das amostras obtidas após 10 horas da infusão de OUA ou salina sugerem ausência de modulação da OUA para os genes *Bdnf* e *Bcl-2*. Embora ocorra diminuição nos níveis de RNAm do gene *Bax*, a relação *Bax/Bcl-2* apresentou aumento. Os níveis de RNAm para o *Tnf* estão diminuídos em relação ao controle. Os níveis de RNAm do gene *Nosi* estão aumentados no grupo OUA quando comparado com o controle (Figura 14).

Figura 14 - Efeitos da OUA (10 nM), em 10 horas, nos níveis de RNAm dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Bdnf*, *Nosi* e *Tnf*, em hipocampo de rato. Na parte superior de cada figura estão às fotografias representativas de PCR e na parte inferior a análise densitométrica (unidades arbitrárias, U.A) das bandas específicas do grupo tratado com OUA. Os níveis de RNAm são apresentados em relação aos níveis de RNAm do controle endógeno *Gapdh*. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para 5 experimentos individuais. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$, controle *versus* tratamento em hipocampus opostos. (Teste t-Student). C: Controle e O: OUA.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.5.2 Em 24 horas

No período de 24 horas, não foi observado o efeito da modulação da OUA sob os genes *Bax*, *Bcl-2*, *Tnf* e *Nosi*, porém os níveis de RNAm do gene *Bdnf* estavam diminuídos no grupo que recebeu OUA em relação ao controle (Figura 15).

Figura 15 - Efeitos da OUA (10 nM), em 24 horas, nos níveis de RNAm dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Bdnf*, *Nosi* e *Tnf*, em hipocampo de rato. Na parte superior de cada figura estão às fotografias representativas de PCR e na parte inferior a análise densitométrica (unidades arbitrárias, U.A.) das bandas específicas do grupo tratado com OUA. Os níveis de RNAm são apresentados em relação aos níveis de RNAm do controle endógeno *Gapdh*. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para 5 experimentos individuais. * $p < 0.05$, controle *versus* tratamento em hipocampus opostos. (Teste t-Student). C: Controle e O: OUA.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.5.3 Em 48 horas

Em 48 horas, dados obtidos pelo ensaio de RT-PCR mostram ausência de um efeito modulatório da OUA sobre os genes *Bdnf* e *Bcl-2*. No entanto, a OUA parece diminuir a expressão de RNAm de *Nosi* e *Tnf* e aumentar a expressão de RNAm do gene *Bax*. No entanto, a relação *Bax/Bcl-2* não apresenta alteração (Figura 16).

Figura 16 - Efeitos da OUA (10 nM), em 48 horas, nos níveis de RNAm dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Bdnf*, *Nosi* e *Tnf*, em hipocampo de rato. Na parte superior de cada figura estão às fotografias representativas de PCR e na parte inferior a análise densitométrica (unidades arbitrárias, U.A.) das bandas específicas do grupo tratado com OUA. Os níveis de RNAm são apresentados em relação aos níveis de RNAm do controle endógeno *Gapdh*. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para 5 experimentos individuais. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$, controle *versus* tratamento em hipocampus opostos. (Teste t-Student). C: Controle e O: OUA.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.6 Efeitos da OUA (10 nM) na ativação do BDNF, nos períodos de 10, 24 e 48 horas

Ao longo do período determinado pelos ensaios de 10 a 48 horas, foi possível verificar aumento persistente da expressão protéica de BDNF (Figura 17).

Figura 17 - Efeitos da OUA (10 nM) na expressão da proteína BDNF, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 10, 24 e 48 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia representativa de Western Blotting da proteína BDNF e β -ACTINA, em 10 horas, seguida da análise de densitometria (unidades arbitrárias) da expressão de BDNF, em 10 horas. **(B)** Autoradiografia representativa de Western Blotting da proteína BDNF e β -ACTINA, em 24 horas, seguida da análise de densitometria (unidades arbitrárias) da expressão de BDNF, em 24 horas. **(C)** Autoradiografia representativa de Western Blotting da proteína BDNF e β -ACTINA, em 48 horas, seguida da análise de densitometria (unidades arbitrárias) da expressão de BDNF, em 48 horas. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=5). **p<0,01; controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7 Resultados dos Efeitos da Administração de OUA (10 nM) na sinalização intracelular associada a via da WNT: GSK-3 β e a β -CATENINA, após 1h, 10, 24 e 48 horas

O primeiro grupo tratado (grupo 1 hora) era constituído de 10 animais que receberam no hemisfério esquerdo 2 μ L de salina 0,9% e no hemisfério direito 2 μ L de Ouabaína, 5 nM/ μ L, conforme descrito em materiais e métodos. O controle positivo usado em todo o ensaio bioquímico foi extrato de células HEK293, para anticorpos relacionados à via do WNT.

4.7.1 GSK-3 β e pGSK-3 β , após 1 hora

Após 1 hora da infusão de OUA 10 nM, não foi observado alteração nos níveis de pGSK-3 β em relação aos valores totais de GSK-3 β , embora ambas as proteínas estejam diminuídas no hemisfério que recebeu OUA em relação ao hemisfério controle. Nesse ensaio, a β -TUBULINA foi usada como controle interno.

Figura 18 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão das proteínas pGSK-3 β e GSK-3 β (48 KDa), em hipocampo de rato, 1 hora. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1 hora da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)**. Ensaio de Western Blot das proteínas pGSK-3 β , GSK-3 β e β -TUBULINA. **(B)**. Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pGSK-3 β /GSK-3 β . **(C)** e **(D)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de pGSK-3 β / β -TUBULINA e GSK-3 β / β -TUBULINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 4 experimentos individuais. * $p < 0,05$; dados pareados controle *versus* OUA (Teste T-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7.2 β -CATENINA Nuclear, após 1 hora

Não há diferença nos níveis de translocação para o núcleo da proteína β -CATENINA, entre os grupos controle e OUA (Figura 19).

Figura 19 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão da proteína β -CATENINA da fração nuclear (95 KDa), em hipocampo de rato, 1 hora. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1 hora da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia de Western Blotting da proteína β -CATENINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de β -CATENINA/ β -TUBULINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 6 experimentos individuais. Dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student). A β -TUBULINA foi usada como controle, para normalizar as bandas.

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7.3 GSK-3 β e pGSK-3 β , 10 horas

Transcorridas 10 horas da infusão intrahipocampal de OUA foi observado um aumento na relação entre a GSK-3 β fosforilada e a porção não fosforilada, no grupo que recebeu OUA em comparação ao grupo controle (Figura 20). A β -ACTINA foi usada como controle endógeno.

Figura 20. Efeito da OUA (10 nM) na expressão das proteínas pGSK-3 β e GSK-3 β (48 KDa), em hipocampo de rato, após 10 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 10 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A).** Ensaio de Western Blotting das proteínas pGSK-3 β , GSK-3 β e β -ACTINA. **(B).** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pGSK-3 β /GSK-3 β . **(C)** e **(D)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de pGSK-3 β / β -ACTINA e GSK-3 β / β -ACTINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. * $p < 0,001$; dados pareados controle *versus* OUA (Teste t-Student).

4.7.4 β -Catenina Nuclear, 10 horas

No tempo de 10 horas não se verificou aumento da translocação nuclear da β -Catenina. A β -ACTINA representa o controle endógeno (Figura 21).

Figura 21 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão da proteína β -CATENINA da fração nuclear (95 KDa), em hipocampo de rato, em 10 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 10 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia de Western Blotting da proteína β -CATENINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de β -CATENINA/ β -ACTINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. Controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7.5 GSK-3 β e pGSK-3 β , em 24 horas

Não houve alteração na relação entre os níveis de fosforilação da GSK-3 β e a porção total de GSK-3 β (pGSK-3 β /GSK-3 β) entre os hipocampus que receberam OUA e salina, após transcorridas 24 horas, apesar dos níveis de GSK-3 β totais estarem diminuídos no hemisfério que recebeu OUA (Figura 22).

Figura 22 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão das proteínas pGSK-3 β e GSK-3 β (48 KDa), em hipocampo de rato, após 24 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 24 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)**. Ensaio de Western Blotting das proteínas pGSK-3 β , GSK-3 β e β -ACTINA. **(B)**. Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pGSK-3 β /GSK-3 β . **(C)** e **(D)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de pGSK-3 β / β -ACTINA e GSK-3 β / β -ACTINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=5). *p<0,05; dados pareados controle *versus* OUA (Teste T-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7.6 β -CATENINA Nuclear, em 24 horas

Após 24 horas da infusão de OUA 10 nM foi possível observar aumento da quantidade de β -CATENINA no extrato nuclear do hemisfério tratado em relação ao controle, sugerindo possível ativação da via de sinalização WNT/ β -Catenina (Figura 23).

Figura 23 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão da proteína β -CATENINA da fração nuclear (95 KDa), em hipocampo de rato, em 24 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 24 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia de Western Blotting da proteína β -CATENINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de β -CATENINA/ β -ACTINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. * $p < 0,05$; dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7.7 GSK-3 β e pGSK-3 β , 48 horas

Como em 10 horas foi possível verificar aumento nos níveis de pGSK-3 β em relação a GSK-3 β e em 24 horas o aumento nos níveis de β -Catenina nuclear, obtivemos um indicativo da ativação da via de sinalização da WNT. Em 48 horas verificamos uma diminuição dos níveis de pGSK-3 β em relação ao GSK-3 β , dados que sugerem a desativação da via canônica da WNT e aumento da atividade quinase da GSK-3 β (Figura 24).

Figura 24 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão das proteínas pGSK-3 β e GSK-3 β (48 KDa), em hipocampo de rato, após 48 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 48 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A).** Ensaio de Western Blotting das proteínas pGSK-3 β , GSK-3 β e β -ACTINA. **(B).** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pGSK-3 β /GSK-3 β . **(C)** e **(D)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de pGSK-3 β / β -ACTINA e GSK-3 β / β -ACTINA. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. * $p < 0,001$; dados pareados controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.7.8 β -CATENINA, 48 horas

Não há variação nos níveis de β -CATENINA tanto citoplasmática quanto nuclear do grupo tratado em relação ao controle, após 48 horas. Os níveis de β -Catenina nuclear parecem já ter voltado ao basal (Figura 25).

Figura 25 - Efeito da OUA (10 nM) na expressão da proteína β -CATENINA da fração citosólica e nuclear (95 KDa), em hipocampo de rato, em 48 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 48 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. (A) Autorradiografia de Western Blotting da proteína β -CATENINA da fração citosólica. (B) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de β -CATENINA/ β -ACTINA, da fração citosólica. (C) Autorradiografia de Western Blotting da proteína β -CATENINA da fração nuclear. (D) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) de β -CATENINA/ β -ACTINA, da fração nuclear. Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. Controle *versus* OUA (Teste t-Student).

4.8 Efeitos da OUA (10 nM) na via da AKT

4.8.1 pAKT/AKT, em 1 e 2 horas

Devido ao fato de a via da AKT ser capaz de fosforilar a GSK-3 β , resolvemos acompanhar seu perfil de modulação para detectar se a fosforilação da GSK-3 β ocorreu devido a ativação da via do AKT. Foram realizados ensaios de Western Blotting para as proteínas pAKT e AKT total, para os grupos 1 e 2 horas. Os resultados obtidos mostram que não há alteração na relação entre as proteínas pAKT/AKT em ambos os períodos, embora em 1 hora pareça ocorrer uma tendência na diminuição dos níveis de pAKT e de AKT no grupo OUA em relação ao controle (Figura 26). Não há alteração no grupo 2 horas, o que sugere que os níveis já voltaram ao normal (Figura 27).

Figura 26 - Efeitos da OUA (10 nM) na ativação da via da AKT, em hipocampo de rato, 1 hora. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 1 hora da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. (A) Autorradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pAKT, AKT e β -ACTINA. (B) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pAKT/AKT. (C) e (D) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das relações pAKT/ β -ACTINA e AKT/ β -ACTINA, respectivamente. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

Figura 27 - Efeitos da OUA (10 nM) na ativação da via da AKT, em hipocampo de rato, 2 horas. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 2 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pAKT, AKT e β -ACTINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pAKT/AKT. **(C)** e **(D)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das relações pAKT/ β -ACTINA e AKT/ β -ACTINA, respectivamente. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. Dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.8.2 pAKT/AKT, 10 horas

Os resultados mostram que 10 horas após a administração intrahipocampal de OUA não existe ativação da via pAKT/AKT (Figura 28).

Figura 28 - Efeitos da OUA (10 nM) na ativação da via da AKT, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 10 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. (A) Autoradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pAKT, AKT e β -ACTINA. (B) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pAKT/AKT. (C) e (D) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das relações pAKT/ β -ACTINA e AKT/ β -ACTINA, respectivamente. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. Dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.8.3 pAKT/ AKt em 24 horas

No grupo 24 horas foi possível observar ativação da via do AKT. (Figura 29).

Figura 29 - Efeitos da OUA (10 nM) na ativação da via da AKT, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 24 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. (A) Autoradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pAKT, AKT e β -ACTINA. (B) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pAKT/AKT. (C) e (D) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das relações pAKT/ β -ACTINA e AKT/ β -ACTINA, respectivamente. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. * $p < 0,001$; dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.8.4 pAKT/AKT, 48 horas

Em 48 horas foi possível observar ativação da via do AKT, com aumento da pAKT em relação ao AKT total, conforme figura 30.

Figura 30 - Efeitos da OUA (10 nM) na ativação da via da AKT, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 48 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. (A) Autoradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pAKT, AKT e β -ACTINA. (B) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pAKT/AKT. (C) e (D) Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das relações pAKT/ β -ACTINA e AKT/ β -ACTINA, respectivamente. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos individuais. * $p < 0,01$; controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.9 Efeitos da OUA (10 nM) na via de sinalização da ERK2, em 24 horas

Para verificar se a OUA é capaz de modular a via de sinalização da ERK após 24 horas, foi realizado um ensaio de Western Blotting com as proteínas do extrato citosólico, e verificou-se diminuição da ativação da via no hipocampo que recebeu OUA em relação ao controle (Figura 31).

Figura 31 - Efeitos da OUA (10 nM) na ativação da via da ERK2, em hipocampo de rato. As proteínas foram extraídas de hipocampo de rato, obtidas após 24 horas da infusão intrahipocampal de OUA (10 nM) ou salina. **(A)** Autoradiografia representativa de Western Blotting das proteínas pERK2, ERK2 e β -ACTINA. **(B)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) da relação pERK2/ERK2. **(C)** e **(D)** Análise de densitometria (unidades arbitrárias) das relações pERK2/ β -ACTINA e ERK2/ β -ACTINA, respectivamente. Valores dos grupos representados no painel A. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=5). *p<0,05; dados pareados, controle *versus* OUA (Teste t-Student).

FONTE: Orellana AMM (2012).

4.10 Resumo dos Resultados

Em resumo, após 1 hora da infusão de 10 nM de OUA foi possível observar ativação da via do NF- κ B pelo aumento da translocação nuclear da subunidade RelA por Western Blotting e pelo aumento da ligação das subunidades RelA e p50 ao DNA, observado pelo ensaio de EMSA para as subunidades p65 e p50 (Figuras 8 e 10, respectivamente). Em relação aos genes, através do ensaio de PCR foi possível observar aumento nos níveis de RNAm dos genes *Bdnf*, *Nosi*, *Tnf* e *Bcl-2*, em 1 hora (Figura 13). No entanto, os resultados não são reprodutíveis no grupo de 2 horas.

Em 24 horas, foi possível verificar ativação da via do NF- κ B. Essa ativação ocorre em 10 horas e manteve-se em 48 horas (ensaio de EMSA, figura 11). Nesse período, verificamos aumento da translocação nuclear da β -CATENINA (Figura 23), evento que não ocorre em 10 horas (Figura 21) e não permanece em 48 horas (Figura 25). No entanto, a ativação da via WNT, pelo aumento da translocação da β -catenina nuclear (em 24 horas) parece ser em decorrência do aumento nos níveis de pGSK-3 β /GSK-3 β em 10 horas (Figura 20). Esses níveis aparecem diminuídos em 48 horas (Figura 24).

Para observar se o aumento da fosforilação da GSK-3 β ocorria devido à ativação da via da AKT, foi realizado ensaio de Western Blotting para acompanhar seu perfil de modulação. Verificou-se ativação da via da AKT apenas em 24 horas (figura 29), permanecendo ativa em 48 horas (Figura 30). Para avaliar melhor os efeitos da OUA na ativação da via do NF- κ B decidimos avaliar os níveis de BDNF, que se mantiveram aumentados ao longo de todo o período observado (Figura 17), enquanto que a via da MAPK (pERK-2), encontrava-se diminuída em 24 horas (Figura 31).

Em relação aos genes já observados em 1 hora, verificou-se que 24 horas após a administração de OUA, ocorre uma diminuição nos níveis de RNAm do *Bdnf* (Figura 15). Em 10 horas parece não haver modulação gênica de *Bdnf*, no entanto, a OUA foi capaz de diminuir os níveis de RNAm de *Bax* e *Tnf* e aumentar os de *Nosi* (Figura 14). Já em 48 horas, os níveis de RNAm de *Nosi* estavam diminuídos, assim como os de *Tnf*. Ao contrário disso, os níveis de RNAm de *Bax* estavam aumentados (Figura 16).

Esquema 3 - Resumo dos Resultados. A figura dividida em 4 quadrantes ilustra os 4 principais grupos de estudo, divididos em 1 hora, 10 horas, 24 horas e 48 horas. Em cada quadrante há as principais alterações induzidas pela administração intrahipocampal de OUA, no núcleo e no citoplasma. As setas ilustram aumento/diminuição dos níveis de RNAm ou de expressão protéica.

↑NF-κB = Via Ativa, complexo proteína-DNA; Expressão gênica; Expressão de proteínas

FONTE: Orellana AMM (2012).

5 DISCUSSÃO

Por mais de 200 anos os esteróides cardiotônicos derivados de plantas têm sido estudados e usados para tratar insuficiência cardíaca congestiva (Withering, 1785). A compreensão contemporânea do funcionamento dos esteróides cardíacos provém de descobertas feitas na década de 50. Em 1953, Albert Szent-Györgyi postulou a existência de digitálicos endógenos em mamíferos e seguindo a identificação da Na^+, K^+ -ATPase como uma proteína responsável pelo transporte de íons, foi demonstrado que a enzima tratava-se de um receptor específico para os digitálicos, e que estes poderiam de forma dose-dependente inibi-la (Schatzman, 1953). Atualmente é bem estabelecido que a enzima Na^+, K^+ -ATPase, além de seu papel regulatório na homeostasia iônica, desempenha um papel na transdução de sinal e na ativação de transcrição gênica (Kometiani et al., 1998; Peng et al., 1996; Tian et al., 2001; Xie e Askari, 2002). A OUA liga-se com alta afinidade a subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase, modulando a ativação de vias de sinalização que promovem por exemplo, o crescimento celular, a migração e a morte celular programada (Abramowitz et al., 2003; Aizman e Aperia, 2003; Liu et al., 2004; Barwe et al., 2005).

Uma característica importante da Na^+, K^+ -ATPase é que as isoformas α_2 e α_3 , predominantes na glia e nos neurônios, respectivamente, são sensíveis a concentrações de OUA 1000 vezes menores (μM) do que as necessárias para inibir a isoforma α_1 (mM) em preparações de tecido de ratos (Inoue e Matsui, 1990; Nathanson et al., 1995), o que confere uma ação tecido específico a OUA, uma vez que as diferentes subunidades requerem doses diferentes para serem inibidas. Assim, a dose de OUA utilizada nesse trabalho, 10 nM, parece ser suficiente para atuar com maior especificidade no SNC. Além disso, doses na faixa de 10 μM são incapazes de exercer efeito inibitório na atividade enzimática em cultura primária de cerebelo de rato, no entanto são suficientes para modular a expressão de genes envolvidos com a sinalização inflamatória (de Sá Lima et al., submetido para publicação). Alguns trabalhos reportam que a concentração de OUA endógena encontrada varia entre 0,2 e 1,0 nM, sendo essa concentração, compatível com suas ações fisiológicas, inclusive com as ações relacionadas aos fatores de crescimento (Graves et al., 1984; Blaustein, 1994; Hilton et al., 1996; Dvela et al., 2011), e também associada a processos patológicos (Blaustein, 1993; Hamlyn et al., 1998; Bagrov e Shapiro, 2008).

Um trabalho recente realizado em nosso laboratório mostrou pela medida de atividade da Na^+, K^+ -ATPase que a administração intrahipocampal de 10 nM de OUA, em ratos, é incapaz de alterar a atividade das subunidades α_1 , α_2 e α_3 da enzima mesmo após

1 hora da sua administração. Ensaios de EMSA mostraram ainda que a OUA é capaz de ativar a via do NF- κ B após 1 hora da infusão, e que as subunidades envolvidas nessa ativação são os dímeros p50p65 e p50p50 (Kawamoto et al., 2012). Baseando-se nessas informações, e visto que muitos trabalhos sugerem uma comunicação entre as vias do NF- κ B e canônica da WNT (Lamberti et al., 2001; Deng et al., 2004; Kim et al., 2005; Carayol, Wang, 2006; Perkins, 2007) iniciamos o presente trabalho avaliando o potencial de modulação da OUA na via de sinalização WNT com a dose de 10 nM.

Para acompanhar a modulação da via do NF- κ B, foram feitos ensaios de Western Blotting para as proteínas I κ B α , pI κ B α e para a subunidade p65, assim como ensaio de gel shift para verificar ativação da via. Para que ocorra a ativação da via canônica do NF- κ B, é necessário que o complexo de quinases I κ B (IKK), formado pelas subunidades catalíticas IKK α e IKK β , seja ativado e promova a fosforilação da proteína inibitória I κ B, que quando fosforilada é reconhecida pelo sistema ubiquitina-proteassoma, levando a degradação. Quando a proteína I κ B é degradada libera o(s) dímero(s) NF- κ B para sua consequente translocação para o núcleo (Perkins, 2007).

No presente trabalho, verificamos que a OUA é capaz de promover a ativação da via NF- κ B. Dados de Western Blotting mostram aumento na quantidade da subunidade RelA nuclear e diminuição da quantidade da subunidade RelA no citosol, após 1 hora, porém não após 2 horas. Também foi possível verificar aumento na fosforilação do I κ B α , liberando o(s) dímero(s) de NF- κ B, que translocam para o núcleo. O ensaio de EMSA revelou ativação da via após 1 hora, porém não após 2 horas. No entanto, foi possível detectar ativação da via, novamente, em 10 horas, 24 horas e 48 horas. Com o ensaio de Super Shift foi possível aferir que os principais dímeros envolvidos na ativação da via foram às subunidades p50 e p65, o que condiz com dados da literatura que mostram que no cérebro de roedores adultos a maioria dos complexos formados de DNA-NF- κ B são constituídos pelos complexos p50/p65 (Kaltschmidt et al., 1993; Bakalkin et al., 1993; Schmidt-Ullrich et al., 1996; Meffert et al., 2003; Kaltschmidt, Kaltschmidt, 2009).

Desde sua descoberta, há mais de duas décadas tem sido atribuído ao NF- κ B um papel fundamental em diversos processos biológicos, incluindo inflamação, imunidade e sobrevivência celular (Singh et al., 1986; Sen, Baltimore, 1986). Todas as subunidades do NF- κ B contêm um domínio de homologia Rel que é responsável pela ligação, dimerização, translocação para o núcleo e ligação ao I κ B. Além disso, Rel-A (p65), c-Rel e Rel-B contêm um domínio de transativação (TAD) que é requerido para a ativação gênica. Ambas as subunidades, p50 e p52, são processados pelos seus precursores, p105 e p100, respectivamente, e necessitam dimerizar com uma subunidade que contenha o TAD para

ativar a transcrição de genes associados à resposta pró e anti-inflamatória e pró e anti-apoptótica (Bhoj, Chen, 2009). As subunidades inibitórias incluem I κ B α (NFKBIA), I κ B β (NFKBIB), I κ B ϵ e BCL-3, este último, ao contrário dos demais, é nuclear e funciona como um co-ativador transcricional (Hayden, Ghosh, 2004). Em neurônios, o complexo mais comum de NF- κ B parece ser composto de p65, p50 e I κ B α (Mattson, Meffert, 2006).

Dados de Western Blotting das proteínas pI κ B α e I κ B α , mostraram que a OUA 10 nM foi capaz de aumentar a fração fosforilada do I κ B α (pI κ B α) e diminuir a quantidade de I κ B α total em 1 hora, sem no entanto alterar os níveis de RNAm do I κ B α . Estes dados sugerem que como a OUA foi administrada diretamente no hipocampo, não existe estimulação da liberação de glicocorticóides que induzem aumento nos níveis de RNAm do I κ B α visando bloquear a ativação do NF- κ B (Rodrigues et al., 2008). Por esse motivo é que os níveis de I κ B α encontram-se diminuídos e se correlacionam de forma positiva com o aumento do pI κ B α , após 1 hora.

Outro dado interessante é o perfil oscilatório de ativação do NF- κ B observado no decurso temporal realizado, com ativação observada em 1 hora, 10 horas, 24 e 48 horas após a infusão da OUA diretamente no hipocampo de ratos. De acordo com a literatura, em célula de mamíferos, vários sinais como hormônios, citocinas, e o próprio contato célula-célula provocam mudanças na expressão gênica mediada por fatores de transcrição. Muitos fatores de transcrição tardios induzem genes que promovem um ciclo de retro alimentação ou *feedback*, que normalmente são responsáveis por terminar a sinalização iniciada por fatores de transcrição. Esses ciclos determinados pelo *feedback* negativo é que geram o potencial do fator de transcrição oscilar entre o estado ativo e inativo por horas (Hoffmann et al., 2002; Nelson et al., 2004; Geva-Zatorsky et al., 2006). No entanto, o significado dessas oscilações ainda é desconhecido (Sung et al., 2009).

O NF- κ B é um exemplo clássico de fator de transcrição sujeito aos ciclos de *feedback* negativo. O NF- κ B regula numerosos processos de sinalização celular e sua atividade é controlada, em parte, pelo nível de translocação nuclear. Nas células em repouso, predominam os dímeros p50/p65 que estão em sua maioria complexados à proteína inibitória I κ B, no citoplasma (Hayden e Ghosh, 2004). Muitos sinais estimulatórios desta via induzem a degradação da proteína inibitória I κ B através da fosforilação pelo complexo das IKKs. Esse processo permite que o NF- κ B ativo transloque para o núcleo e ative a expressão de genes alvo, incluindo alguns genes responsáveis pela resposta de *feedback* negativo (Hayden, Ghosh, 2004). Um dos genes alvo é o *Nfkbia*, gene que codifica I κ B α . A nova síntese do I κ B α age como um forte *feedback* negativo, levando a inativação

do NF- κ B e sua volta ao citoplasma. No entanto, investigações bioquímicas e genéticas indicam que a propensão a oscilar, induzida pelo I κ B α , é contrabalanceada por mecanismos que modulam e minimizam a oscilação (Werner et al., 2005; Cheong et al., 2006; Kearns et al., 2006; Hayden, Gosh, 2008, Sung et al., 2009). Análises propõem que duas isoformas de I κ B, a I κ B β e I κ B ϵ tem papéis funcionais em diminuir a propensão oscilatória gerada pelo complexo NF- κ B/I κ B α , no ciclo de *feedback*. Esses dados foram confirmados experimentalmente pela observação do amortecimento das oscilações nucleares de NF- κ B em células duplo *knock-out* para I κ B β /I κ B ϵ , comparadas às células normais, quando foi possível constatar oscilações muito mais intensas na ausência dessas duas isoformas (Hoffmann et al., 2002; Barken et al., 2005; Kearns et al., 2006).

No entanto, a via de sinalização pela qual a OUA ativa o NF- κ B ainda é bastante discutida. Alguns estudos sugerem que quando a OUA se liga à Na⁺,K⁺-ATPase desencadeia uma mudança conformacional que favorece a interação direta de uma região conservada na porção N-terminal da subunidade α com a porção N-terminal do receptor de canal de cálcio IP₃R, presente no retículo endoplasmático, o que resulta em abertura e fechamento ritmados do canal da Ca²⁺. Assim, sugere-se inclusive que a OUA seria capaz de promover a oscilação de cálcio por via dos canais de cálcio voltagem dependente. Ocorre que o fator NF- κ B é bastante sensível a oscilações lentas nos níveis de cálcio e desta forma a OUA parece ser capaz de promover sua ativação (Aizman, Aperia, 2003; Zhang et al. 2006). No entanto, além da sinalização por cálcio, a enzima Na⁺/K⁺-ATPase, através de interações proteína-proteína, é capaz de ativar diversas vias de sinalização, como a Src quinase, com consequente transativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), recrutando o Shc (proteína contendo domínio SH-2), a Grb2 (proteína 2 ligada ao fator de crescimento), Sos (um fator de troca de nucleotídeo guanina) e com ativação da Ras (proteína G de baixo peso molecular). Com a ativação da Ras parece ocorrer um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) através de uma via desconhecida, que parece envolver a ativação da cascata da MAPK. Através da via da MAPK vários fatores de transcrição são ativados, tais como CREB e NF- κ B, os quais estão associados a inúmeros fatores neurotróficos e citocinas (Xie, Askari, 2002; Zhang et al., 2008; Desfrere et al., 2009).

De acordo com seu papel anti-apoptótico, foi demonstrado que o IKK β é capaz de fosforilar e inibir o FOXO3a, que é um supressor tumoral e fator de transcrição que induz a apoptose e a parada do ciclo celular. Também parece existir uma ligação entre a IKK β e a via pró-proliferativa da MAPK. Na ausência de estímulos, em células como macrófago e fibroblasto, a MAPK pode ser encontrada complexada com um subconjunto de subunidades

p105 do NF- κ B. O IKK β pode induzir a proteólise do p105, que por sua vez libera a TPL2, que resulta na ativação da via da MAPK (Beinke et al., 2004; Waterfield et al., 2004). Então, a proteólise do p105 induzida pela IKK β pode levar a ativação de várias vias de sinalização independentes do NF- κ B. O IKK β pode ainda fosforilar a proteína DOK1, proteína adaptadora que diminui a ativação da MAP quinase, permitindo outra possível ligação com a regulação dessa via (Lee et al., 2004). Uma implicação clara desses resultados é que a diminuição da ativação da via da MAPK, em 24 horas, pode ser em decorrência do término de sua sinalização, ocorrida logo após a infusão de OUA, como sugerem vários trabalhos (Xie, Askari, 2002; Aizman, Aperia, 2003), ou ainda pode ser em decorrência da interação com a IKK β . Fato é que, de maneira geral, as características pró-inflamatórias, anti-apoptóticas e proliferativas, que foram atribuídas ao IKK β (Bonizzi, Karin, 2004; Pasparakis et al., 2006; Kim et al., 2006) em parte podem resultar de efeitos que independem do NF- κ B.

Em 2004, Marini et al. mostraram que o BDNF é induzido pelo NF- κ B em resposta a ativação do receptor de glutamato (Marini et al., 2004; Mattson, Meffert, 2006). Em trabalho realizado em nosso laboratório, Kawamoto et al. (2012a) mostraram que quando a OUA se liga à Na⁺, K⁺-ATPase é capaz de ativar receptores tipo NMDA. A ativação de NF- κ B induzida pela OUA parece ser, pelo menos parcialmente, dependente da ação moduladora da Na⁺, K⁺-ATPase nos receptores NMDA no hipocampo, e dessa forma, o NF- κ B pode modular genes que desempenham importantes papéis na neuroplasticidade adaptativa e em processos de neuroproteção (Albensi, Mattson, 2000; Srinivasan et al., 2004; Mattson 2008, Kawamoto et al., 2012a), como o *Bdnf*.

No presente trabalho, mostramos que a OUA foi capaz de aumentar a expressão de BDNF. Por ensaio de Western Blotting verificamos aumento da expressão da proteína BDNF ao longo de todo o decurso, exceto em 1 hora. No entanto, a diferença temporal e espacial entre a dinâmica da proteína e os níveis de RNAm sugerem a importância do processo pós translacional e ou subcelulares para a produção do BDNF, o que pode se dar inclusive por interação com outras vias. O aumento persistente do BDNF pode ser reflexo da sua atividade biológica (Nawa et al., 1995) e reforça a nossa hipótese que uma das ações fisiológicas da OUA pode estar associada à neuroproteção.

O BDNF é essencial para a formação das bases moleculares da memória e aprendizado (Korte et al. 1995, 1996; Lim et al., 2008), regula a sobrevivência, o desenvolvimento e a função dos neurônios (Huang e Reichardt, 2003), sendo importante para a regeneração dos axônios, para a formação das sinapses (Vicario-Abejon et al., 2002), na plasticidade sináptica (Zhang, Poo, 2002) e na diferenciação de células

precursoras (Ahmed et al., 1995). Fan et al. (2006) realizaram um estudo em que células ganglionares de retina humana (RGC5) foram expostas a 1 mM de glutamato, por diferentes períodos de tempo. Os resultados desse trabalho mostraram que o tratamento com glutamato estimulava a expressão de BDNF nas células RGC5 através da ativação do NF- κ B (Fan et al., 2006). A transcrição gênica do *Bdnf* pode ainda ser modulada durante um processo inflamatório, pela presença de TNF (Iskra et al., 2011).

Em relação ao TNF, foi possível verificar oscilação de seus níveis durante o decurso temporal. Através do ensaio de RT-PCR, verificou-se aumento da expressão de RNAm de *Tnf* em 1 hora, diminuição da expressão de RNAm de *Tnf* em 10 horas, ausência de modulação em 24 horas e novamente diminuição da expressão de RNAm de *Tnf* em 48 horas. No SNC, o TNF (proteína de 17 KDa) se liga ao receptor de TNF (TNF-R) expresso tanto na glia quanto nos neurônios. A expressão do gene *Tnf* é alvo da auto-regulação via ativação do NF- κ B, pela ação de dois receptores diferentes, o p55 (TNFR1) e o p75 (TNFR2). O receptor p55 é o principal envolvido na ativação do NF- κ B, sendo que estudos sugerem ainda que o complexo IKK α / β é crucial para a ativação do TNF mediado pelo NF- κ B (Widera et al., 2006; Parameswaran, Patial, 2010). De fato, podemos deduzir pelo perfil de modulação observado do *Tnf*, ao longo do decurso temporal estudado, que o NF- κ B está sendo ativado por outros mecanismos independentes desta citocina pró-inflamatória. Contudo, vale ressaltar que o TNF pode ser considerado um mitógeno na zona subventricular de ratos (Wu et al., 2000; Widera et al., 2006) e que se torna tóxico as células precursoras neurais quando a sua proliferação cessa (Cacci et al., 2005).

Em 1 hora, quando os níveis de TNF estavam elevados, pudemos verificar aumento nos níveis de RNAm de *Bcl2*, enquanto que para *Bax* não houve alteração nos níveis de RNAm comparado ao grupo controle. No entanto, em 10 horas, quando observamos diminuição dos níveis de *Tnf*, pudemos notar aumento na relação *Bax/Bcl-2*. Em 24 horas, verificamos ausência de modulação tanto para o *Tnf*, quanto para *Bax* e *Bcl-2* (Figura 30), enquanto que em 48 horas, quando os níveis de *Tnf* estavam reduzidos, foi possível observar aumento na expressão de RNAm para *Bax*, embora a relação *Bax/Bcl-2* permaneça inalterada.

Tanto *Bax* quanto o *Bcl-2* são proteínas que possuem papel fundamental na regulação da apoptose, que é um tipo de morte celular programada. A apoptose é um dos fenômenos mais estudados no SNC, e é um processo regulado por proteases cisteínicas chamadas caspases. As caspases efetoras clivam uma grande variedade de substratos de proteína com finalidade de causar degradação e morte celular (Schulze-Osthoff et al., 1998). Diversos fatores podem ativar a apoptose, dentre eles, o estresse oxidativo, danos

no DNA e acúmulo de proteínas danificadas (Yuan, Yankner, 2000 ; Mattson, 2000 ; Miller et al., 2000). Dois grupos da família de proteínas BCL-2 (B-cell leukemia/limphoma 2) possuem um papel fundamental na regulação da apoptose: as proteínas pró-apoptóticas como BAX (proteína X associada ao Bcl-2) e BAD (promotor de morte associado ao Bcl); e proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e BCL-XL (Akhtar et al., 2004; Yuan, 2006). Estas proteínas controlam o destino das células interagindo com a membrana da mitocôndria. BAX e BAD aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial por meio da formação de poros e consequentemente levam a liberação de citocromo C, além disso, essas proteínas inibem a ação das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL, que estabilizam a membrana (Cheung et al., 2005) .

Para os membros da família BCL2, como Bcl2 e BAX, o papel relativo à morte celular programada ou ao ciclo celular depende da linhagem celular e do contexto genético (Zinkel et al., 2006) o Bcl-2 atua como uma proteína anti-apoptótica e o BAX como uma proteína pró-apoptótica (Er et al., 2006). Ocorre que a ativação de BAX durante a morte celular, normalmente não requer aumento na transcrição de genes, pois estudos mostram que o BAX situa-se preferencialmente no citoplasma das células (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997), sendo que no momento da ativação ocorrem modificações conformacionais que direcionam essa proteína à membrana mitocondrial aonde irá se inserir e oligomerizar (Gross et al., 1998; Antonsson et al., 2001). Diante dessa situação, é necessário acompanhar os níveis da relação *Bax/Bcl2*. Em trabalho anterior, Kawamoto et al. (2012a) realizaram ensaio de Fluoro-Jade B (FJB) nas amostras obtidas após 1 hora da infusão de OUA 10 nM , e constataram ausência de degeneração neuronal.

De fato, existem estudos que mostram que uma dose baixa de OUA (0,01 nM) foi capaz de induzir aumento na expressão de *Bcl2*, que foi correlacionado com efeitos protetores deste hormônio contra a apoptose induzida pelo ácido caínico (Golden, Martin, 2006). No entanto, parte da explicação para os diferentes efeitos da OUA sob a viabilidade celular pode decorrer do papel das diferentes isoformas α_1 e α_3 da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ na sinalização neuronal. Quando células neuronais são incubadas por 24 horas com baixas doses de Ouabaína (nM), verifica-se um efeito protetor da OUA sobre os neurônios, frente à apoptose, enquanto que altas doses de OUA parecem induzir um processo tóxico, pois a isoforma α_3 , quando no estado ativo, parece estimular a transformação apoptótica dos neurônios, enquanto que a isoforma α_1 parece manter a viabilidade neuronal e prevenir o desencadeamento da apoptose (Karpova et al., 2010). Além disso, altas doses de OUA podem inibir a $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ levando a morte celular.

Existe uma resposta adaptativa das células e dos organismos frente a um estresse moderado, normalmente intermitente, que se chama hormese. A hormese pode apresentar muitos efeitos benéficos ao sistema biológico, no entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos neste processo (Calabrese, 2001, 2008a). Exemplos de estimulação hormética incluem a exposição a baixas doses de certos fitoquímicos como curcumina, isotocianatos e resveratrol, o exercício físico e a dieta intermitente (Calabrese, 2008b). Assim, acredita-se que baixas doses de OUA podem atuar expondo o organismo a um tipo de estimulação hormética, que ativaria os mecanismos de defesa do organismo, tornando a célula ou o organismo mais resistente a estímulos tóxicos.

Além disso, o NF- κ B é um conhecido regulador da apoptose e parece induz genes favoráveis a sobrevivência celular; o produto desses genes incluem os inibidores celulares da apoptose (IAPs), BCL-2s, os fatores 1 e 2 associados ao TNFR (TRAF1/TRAF2), e a superóxido desmutase (SOD). O NF- κ B pode também modular a expressão de citocinas promotoras de apoptose como TNF e FAS, assim como o ligante de FAS (FASL) (Mattson, Meffert, 2006).

Outros estudos sugerem que a ativação do NF- κ B promove a morte de neurônios, sob certas condições. A ativação do NF- κ B nas células da glia (microglia e astrócitos) parece induzir indiretamente a morte neuronal. Microglia e astrócitos podem por mecanismos mediados pelo NF- κ B, produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e EROs (Glass et al., 2010). O NF- κ B, nas células da glia, pode induzir a NOS, resultando na produção de NO e a neurotoxicidade relativa às EROS. Ou seja, a ativação do NF- κ B em neurônios parece promover a sobrevivência, no entanto, a ativação do NF- κ B em células da glia parece induzir a produção de neurotoxinas (Mattson, Meffert, 2006).

Assim, outra constatação de nosso trabalho é que a OUA foi capaz de aumentar os níveis de RNAm de *Nosi*, após 1 hora de infusão e após 10 horas de infusão. No entanto, parece não haver modulação em 24 horas e parece ocorrer diminuição da expressão de RNAm para *Nosi* em 48 horas. O padrão de expressão da enzima NOSi, que é modulada por uma série de fatores, pode ser alterada inclusive, pela atividade da via do NF- κ B (Musial, Eissa, 2001; Akhtar et al., 2004), como já discutido acima. Ao contrário dos dados obtidos por RT-PCR, nos ensaios de Western Blotting, realizados com as amostras obtidas após 1 hora de infusão, os níveis da proteína NOSi não apresentaram alterações, possivelmente porque o pico de efeito da expressão protéica ocorreu em intervalo de tempo não analisado. Porém, de acordo com alguns trabalhos, visto que a OUA tem sido relacionada à liberação de glutamato (Rossi et al., 2000) e que a ativação dos receptores NMDA induzida pela Glutamato parece induzir a ativação do NF- κ B em várias estruturas do cérebro

(Guerrini et al., 1995; Kaltschmidt et al., 1995; Munhoz et al., 2006), produzindo aumento nos níveis de *Nosi* (Munhoz et al., 2006; 2010) poderíamos sugerir que o glutamato é que está, em via de fato, relacionado à via do NO (Glezer et al., 2003). Conforme descrito em Kawamoto et al. (2012a), 1 μ M de NMDA é capaz de causar a ativação do NF- κ B, efeito este potencializado pela administração de 10 nM de OUA que além de ativar o NF- κ B aumenta os níveis de RNAm de NOSi (Kawamoto et al., 2012a).

Os dados mostram ainda que a ativação do NF- κ B pela OUA é parcialmente revertida pela administração de MK-801 (um antagonista do receptor NMDA), reforçando que as ações mediadas pela OUA na sinalização do NF- κ B dependem pelo menos em parte do receptor NMDA. No entanto, enquanto 1 μ M de NMDA induz aumento na atividade da NOS, a OUA não foi capaz de ativar a NOS isoladamente ou mesmo de potencializar o efeito do NMDA no hipocampo de ratos (Kawamoto et al., 2012a). Portanto, os nossos dados sugerem que a ligação da OUA à Na^+ , K^+ -ATPase possa induzir uma interação com o receptor NMDA que levaria a ativação de uma via de sinalização ligada a Src-Ras-MAPK que por sua vez pode ativar o NF- κ B (Kawamoto et al., 2012a).

Figura 32 - Modelo simplificado da ativação do NF- κ B modulada pela ligação da OUA à Na^+ , K^+ -ATPase e pela cascata de sinalização desencadeada pelo receptor tipo NMDA, em hipocampo de rato, e suas implicações na regulação gênica. A ativação do receptor NMDA aumenta atividade da nNOS, a atividade da α_2 e α_3 da Na^+ , K^+ -ATPase e ativa NF- κ B no SNC. A OUA (10 nM) pode ativar o complexo da Na^+ , K^+ -ATPase que resulta na ativação do NF- κ B no SNC, levando ao aumento nos níveis de RNAm para *Bdnf*, *Nosi*, *Tnf* e *Bcl-2*. Os efeitos da OUA não estão ligados a mudanças na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e nem nos níveis de nNOS. A Na^+ , K^+ -ATPase parece estimular as cascatas de sinalização do Ca^{2+} e da Src-Ras-MAPK, que por sua vez ativam o NF- κ B (setas vermelhas). O tratamento com NMDA leva ao aumento da ativação de NF- κ B induzida pela OUA, mas o MK-801, um antagonista do receptor de NMDA, bloqueia parcialmente a ativação do NF- κ B pela OUA.

FONTE: Kawamoto et al. (2012a). Com permissão.

Finalmente, para verificar se a OUA era capaz de modular a via canônica da WNT foram feitos ensaios de Western Blot para as principais proteínas da via, como GSK-3 β e β -CATENINA. As vias de sinalização celular WNT têm papel central na embriogênese e na homeostase de tecidos adultos, no entanto a proteína GSK-3 β participa de muitas vias de sinalização celular. A GSK-3 β foi assim denominada por ser primeiramente identificada como uma enzima quinase que fosforilava a enzima sintetizadora de glicogênio, a glicogênio sintase (Embi et al., 1980). Em seguida foi identificada como um fator importante da via da insulina e da via de sinalização WNT (Jope et al., 2007). Recentemente foi classificada como uma proteína pró-inflamatória, pois está envolvida em diversos processos inflamatórios e sua atividade é necessária para estimular plenamente a produção de muitas citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), IL-1 β e TNF, seguido à estimulação de vários receptores do tipo *Toll* (TLR) em monócitos e células sanguíneas mononucleares periféricas (Martin et al., 2005). A GSK-3 β está envolvida inclusive na regulação da migração celular, uma vez que controla a degradação da β -CATENINA (Balda e Matter, 2003).

A β -CATENINA é uma proteína multifuncional envolvida em dois tipos de sinalização, principais. Primeiro, ela participa do processo de adesão célula-célula, por mediar a associação da E-CADERINA com o citoesqueleto. Em segundo lugar, é um componente crítico da via WNT1 ou via de transdução de sinal Wingless (Lamberti et al., 2001). Nas junções aderentes (Ajs), a β -CATENINA se liga ao domínio citoplasmático da E-CADERINA assim como a α -CATENINA. A α -CATENINA se associa a ACTINA do citoesqueleto intracelular para contribuir com a organização da ACTINA nas junções aderentes (Balda e Matter, 2003). A manutenção da integridade desse complexo é crítico para a formação e manutenção de adesão estável para a célula. No entanto, a ligação entre a β -CATENINA e a E-CADERINA é de alta afinidade, sendo que a fosforilação da E-CADERINA aumenta ainda mais essa afinidade. Algumas observações estruturais têm demonstrado que a ligação entre β -CATENINA e a E-CADERINA ou TCF-3 é muito similar, ou seja, a região que faz a interação parece não adquirir diferentes conformações para acomodar diferentes ligantes. Assim, o aumento da expressão de E-CADERINA inibe a atividade transcricional da β -CATENINA, pois a semelhança estrutural entre as ligações com a CADERINA e com TCF sugere que a CADERINA possa ser um potente inibidor da sinalização promovida pela β -CATENINA, na via de sinalização WNT. No entanto, a competição entre o TCF e a CADERINA é controlada, por exemplo, quando a E-CADERINA está fosforilada aumenta a afinidade desta pela β -CATENINA em detrimento de sua ligação ao TCF. Porém, quando a E-CADERINA não está fosforilada, a β -CATENINA liga-se ao complexo nuclear (Gottardi e Gumbiner 2001). Dessa

forma, a GSK-3 β tem um papel regulatório na adesão celular, e para verificar se a OUA é capaz de ativar a via da WNT a variação das quantidades de GSK-3 β devem sempre estar acompanhadas dos níveis de variação da β -CATENINA.

Assim, verificamos em nosso trabalho, por ensaio de Western Blot, que 10 horas após a infusão de OUA, ocorreu aumento nos níveis de pGSK-3 β em relação ao GSK-3 β total, níveis que já haviam se normalizado em 24 horas e que encontravam-se diminuídos em 48 horas. No entanto, em 24 horas foi possível detectar aumento da translocação nuclear da β -CATENINA, aumento que não persistiu até 48 horas. Esses achados mostram o perfil de ativação da via iniciando-se em 10 horas e chegando ao ponto máximo em torno de 24 horas.

Entretanto, a GSK-3 β poder ser fosforilada pela via da AKT (Freyberg et al., 2010), assim, foi realizado ensaio de Western Blotting para acompanhar o perfil de modulação desta via, com o objetivo de descartar uma possível interferência. Assim, verificou-se ativação da via da AKT apenas em 24 horas, período posterior ao do início do aumento da fosforilação da GSK-3 β , permanecendo ativa em 48 horas. Para verificar se a OUA, em 24 horas, é capaz de ativar a via da MAPK, realizamos ensaio de Western Blotting para as proteínas pERK2 e ERK2. Os resultados mostraram diminuição da ativação da via.

Tanto IKK α quanto IKK β são RelA quinases. Por exemplo, a RelA é fosforilada: na Ser276 pela subunidade catalítica da proteína quinase A (PKAc), na Ser311 pela atípica PKC ζ ; na Ser468 pela IKK β , IKK ϵ e pela GSK-3 β (Perkins, 2006). Essas fosforilações podem ser genericamente descritas como modificações estimulatórias, que aumentam a atividade transcricional da RelA e sua habilidade de interagir com dois co-ativadores, como p300 e o co-fator transcricional CBP (Zhong et al., 1998; Hoberg, et al., 2006). A fosforilação da Ser536 da RelA pela IKK β permite um mecanismo que integra a via do NF- κ B com a fosfoinositideo 3- quinase (PI3K) e PKB/AKT, que é induzida por fatores de crescimento, citocinas e oncogenes como o Ras. Similar à ativação do IKK β , a ativação dessa via promove a sobrevivência celular. Alguns estudos sugerem que para que ocorra a fosforilação da IKK β na Ser536 é necessário que a via PI3K/AKT esteja ativa (Madrid et al., 2001; Haller et al., 2002; Mantioli et al., 2004; Jeong et al., 2005; Perkins et al., 2007).

Em relação à via da WNT, estudos têm sugerido que exista intercomunicação entre a via de sinalização da WNT e a via do NF- κ B/IKK (Lamberti et al., 2001; Deng et al., 2002; Albanese et al., 2003; Deng et al., 2004). Lamberti et al. mostraram que tanto a IKK α quanto a IKK β podem modular a transcrição dependente da β -CATENINA/Tcf. A IKK α pode fosforilar diferentes resíduos na porção N-terminal da β -CATENINA, além da Ser33 e Ser37,

fosforiladas pela GSK-3 β (Lamberti et al., 2001; Carayol et al., 2006), e o mecanismo pelo qual a IKK α seria capaz de promover a estabilização da β -CATENINA baseia-se no bloqueio da degradação da β -CATENINA induzida pelo via canônica Axina/APC/GSK3 β , de forma NF- κ B independente. Alguns trabalhos sugerem ainda que a IKK α pode suprimir a degradação da β -CATENINA pela ação da SIAH-1 (*Seven in absentia homolog 1*), que consiste em um segundo mecanismo de degradação da β -CATENINA independente da fosforilação mediada pela GSK-3 β , e que é iniciada pelo aumento das proteínas SIAH-1. SIAH-1 interage na sequência com a proteína de interação SIAH (SIP), Skp1 e Ebi, que se liga diretamente a β -CATENINA e induz sua degradação via proteassoma. A degradação da β -CATENINA induzida pela SIAH-1 é independente da proteólise mediada pela ubiquitina ligase β -TrCP (Matsuzawa e Reed, 2001; Liu et al., 2001; Iwai et al., 2004). Porém, existem trabalhos que sugerem que a GSK-3 β , o regulador negativo da β -CATENINA, tem papel central na interação entre essas vias, regulando positivamente o NF- κ B pela modulação do I κ B. Além do mais, a β -CATENINA por si só interage com a subunidade p50 impedindo a ativação da via (Bournat et al., 2000; Hoeflich et al., 2000; Holmes et al., 2008; Vlantis et al., 2011). No entanto, de acordo com nossos dados, a estabilização da β -CATENINA ocorre em decorrência da fosforilação da GSK-3 β , pela presença da OUA, pois verificamos a inativação da GSK-3 β em momento anterior ao aumento da translocação nuclear da β -CATENINA, e no mesmo período, pode-se verificar o perfil oscilatório de ativação da via do NF- κ B, que requer a participação intensa de I κ B α .

A presença dessa sinalização tardia para a OUA nos leva a crer que existem mecanismos muito complexos e diversas vias que podem estar se intercomunicando até chegar à ativação da via canônica do WNT, em 24 horas. Alguns trabalhos têm demonstrado que a ligação da OUA a subunidade α da Na⁺,K⁺-ATPase é tão forte que é possível observar efeitos de uma única dose de OUA, em altas concentrações, por até 9 dias (Ruktanonchai et al., 1998; Hamid et al., 2009; Riegel et al., 2009; Jornada et al., 2010; Freitas et al. 2010 e Yu et al., 2010). No entanto, além do quesito temporal, a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase pode ser regulada por alterações na quantidade de enzima presente na membrana plasmática ou pela influência da atividade da enzima já presente na superfície de membrana. De fato, alterações na síntese e/ou degradação dos polipeptídeos individuais da Na⁺,K⁺-ATPase, assim como a mobilização das subunidades α e β dos sítios de armazenamento endossomal para a superfície, levam a uma modificação da atividade basal da enzima (McDonough, Farley, 1993; Ewart, Klip, 1995).

O processo de ajuste rápido na função da Na^+, K^+ -ATPase permitindo uma adaptação funcional da enzima, a qual estará integrada aos demais processos celulares pode ser modulado por vários agentes intracelulares, tais como o Na^+ , compostos endógenos com características semelhantes aos da OUA e, principalmente, por processos que envolvem alterações no padrão de fosforilação e defosforilação de proteínas (Bertorello, Katz, 1993; Ewart, Klip, 1995; Gloor, 1997; Blanco, Mercer, 1998).

A fosforilação de proteínas tem sido aceita como um dos mais importantes mecanismos de regulação da função celular. Há evidências de que os sinais extracelulares produzem diversos efeitos fisiológicos através da regulação do estado de fosforilação dos diversos tipos de fosfoproteínas presentes no interior da célula (Nestler, Greengard, 1999). De fato, inúmeros trabalhos têm demonstrado que os nucleotídeos cíclicos (AMP cíclico e GMP cíclico), assim como o cálcio, regulam uma variedade de funções, tais como transporte axoplasmático, além de síntese, liberação, geração de potenciais de ação e diferenciação celular através de proteínas quinases (por exemplo: PKA, PKG). Estas proteínas catalisam a transferência de grupos fosfato do ATP para aceptores protéicos (grupos hidroxila dos resíduos de treonina, serina ou tirosina) modulando a atividade funcional destas proteínas (Francis, Corbin, 1994; Nestler, Greengard, 1999). Vale salientar que o mesmo conceito formulado para o processo de fosforilação deve ser estendido à via inversa, ou seja, aos processos envolvendo a defosforilação de proteínas através da ação de proteínas fosfatases (Nestler, Greengard, 1999). Assim, diversos são os fatores que podem alterar a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e sua capacidade de resposta.

Somando-se a isso, um estudo realizado por Josipa Bilic e colaboradores através de ensaios de microscopia confocal em tempo real, demonstrou que após 15 minutos de tratamento com a proteína WNT, apenas uma pequena fração da proteína LRP6 (co-receptor) começa a coalescer em estruturas pontuais na membrana citoplasmática, co-localizando com a AXINA (Bilic et al., 2007). Após 10 minutos da administração de WNT, foi possível detectar a fosforilação do LRP6 (Davidson et al., 2005). Ou seja, após a WNT ser secretada e alcançar o receptor Frizzled na membrana plasmática da célula, 10 minutos são necessários para que ocorra a fosforilação do co-receptor de membrana e 15 minutos para que o sinalossomo se forme e inicie a sinalização intracelular, o que justifica uma sinalização não imediata.

Por fim, recentemente, sugeriu-se que a β -CATENINA parece ser um potente estimulador da Na^+, K^+ -ATPase. Sopjani et al. (2010) mostraram que a β -CATENINA quando super expressa em ovócitos de *Xenopus* parece aumentar o fluxo de íons pela bomba, estimulando-a. Alguns trabalhos sugerem que essa estimulação deve ocorrer porque a β -

CATENINA é capaz de estimular o transporte e o aumento da expressão da proteína SGK1 (*serum- and glucocorticoid- inducible kinase1*) (Naishiro et al., 2005; Dehner et al., 2008), que regula a atividade de uma variedade de canais iônicos, inclusive da Na^+, K^+ -ATPase (Lang et al., 2006; Boehmer et al., 2008 a,b; Schuetz et al., 2008; Gehring et al., 2009; Krueger et al., 2009; Laufer et al. 2009; Lang et al., 2009). Além disso, a SGK1 regula a atividade de uma série de enzimas e proteínas, como a GSK-3 β , a β -catenina, o NF- κ B e o p53. (Lang et al., 2006,2009; Tai et al., 2009). A SGK1 pode também participar da sinalização do BDNF, em ratos (Lang et al., 2006).

Além do mais, para regular a diferenciação de células e tecidos, a via WNT interage com outras vias de sinalização, como a Sonic Hedgehog (Shh) (Liebner e Plate, 2010). As proteínas Hedgehog (Hh) pertencem a uma família de morfógenos (Ingham e McMahon, 2001), a qual se inclui alguns membros da família WNT (Ficher e Howie, 2007), exercendo atividade crucial no crescimento, na padronização e morfogênese de diferentes regiões do corpo de vertebrados e invertebrados. A via de sinalização Shh também parece ser modulada pela via do NF- κ B (Kasperczyk et al. 2009), e dados da literatura mostram que a ativação da via Shh ocorre de maneira direta pela ligação das subunidades p50 e p65 a diferentes regiões promotoras do gene Sonic Hedgehog (Kasperczyk et al. 2009) .

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que:

- 1) A OUA foi capaz de ativar a via de sinalização do NF- κ B após 1 hora, 10, 24 e 48 horas, seguindo um comportamento oscilatório.
- 2) A OUA também foi capaz de ativar a via canônica da WNT, sendo que 10 horas após a sua administração ocorreu aumento da fosforilação da proteína GSK-3 β , enquanto que em 24 horas, observamos aumento da translocação nuclear da β -CATENINA.
- 3) A OUA (10 nM) induziu aumento de BDNF após 1 hora, 10, 24 e 48 horas.

Os nossos dados mostram, portanto, que a OUA é capaz de ativar primeiramente a via do NF- κ B e tardiamente a via canônica da WNT. Dados da literatura exploram das mais diversas formas a extensa intercomunicação entre as vias NF- κ B e WNT/ β -CATENINA, assim como mostram extensa comunicação dessas vias com outras, como a AKT, ERK, BDNF e Sonic Hedgehog (não explorada nesse trabalho). Assim, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento referente aos mecanismos envolvidos na ativação das vias NF- κ B e WNT/ β -CATENINA pela OUA, e qual o papel fisiológico dessas vias para a viabilidade celular e para o organismo nos processos neuroadaptativos e na senescência.

REFERÊNCIAS

- Abramowitz J, Dai C, Hirschi KK, Dmitrieva RI, Doris PA, Liu L, Allen JC. Ouabain- and Marinobufagenin-Induced Proliferation of Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells and a Rat Vascular Smooth Muscle Cell Line, A7r5. *Circulation*. 2003;108:3048–53.
- Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci*. 1995;15(8):5765-78.
- Aizman O, Aperia A. Na, K-ATPase as a signal transducer. *Ann NY Acad Sci*. 2003;986:489-96.
- Aizman O, Uhlén P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *PNAS*. 2001;98(23):13420-4.
- Akhtar RS, Ness JM, Roth KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):189-203.
- Albanese C, Wu K, D'Amico M, Jarrett C, Joyce D, Hughes J, Hulit J, Sakamaki T, Fu M, Ben-Ze'ev A, Bromberg JF, Lamberti C, Verma U, Gaynor RB, Byers S, Pestell RG. IKK α regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):585-99.
- Albensi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*. 2000;35(2):151-9.
- Angers S, Moon RT. Proximal Events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;7:468-77.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*. 2001;276:11615–23.
- Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. 2007;261(1):44-52.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kB: ten years after. *Cell*. 1996;87:13-20.
- Bagrov AY, Shapiro JJ. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(7):378-92.
- Bagrov AY, Shapiro JJ, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2009;61(1):9-38.
- Bakalkin G, Yakovleva T, Terenius L. NF-kappa B-like factors in the murine brain. Developmentally-regulated and tissue-specific expression. *Brain Res Mol*. 1993;20:137-46.

Balda MS, Matter K. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2003;13(6):310-18.

Barken D, Wang CJ, Kearns J, Cheong R, Hoffmann A, Levchenko A. Comment on "Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression". *Science.* 2005;308(5718):52.

Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:997–1014.

Barwe SP, Anilkumar G, Moon SY, Zheng Y, Whitelegge JP, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1082–94.

Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK extracellular signal-regulated kinase mitogen activated protein kinase cascade is regulated by IκB kinase-induced proteolysis of NF-κB1 p105. *Mol Cell Biol.* 2004;24:9658–67.

Bertorello AM, Katz AI. Short-term regulation of renal Na,K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol.* 1993;265:F743-F55.

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 1996;382(6588):225-30.

Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature.* 2009;458:430-7.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. Wnt induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishvelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science.* 2007;316:1619-22.

Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998;275:F633-F50.

Blaustein MP. Endogenous Ouabain: Physiological Activity and Pathophysiological Implications. *Clin Investig.* 1994;72:706-7.

Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am J Physiol.* 1993;264:C1367-C87.

Boehmer C, Laufer J, Jeyaraj S, Klaus F, Lindner R, Lang F, Palmada M. Modulation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5 by the SGK1 protein kinase involves inhibition of channel ubiquitination. *Cell Physiol Biochem.* 2008a;22:591–600.

Boehmer C, Palmada M, Klaus F, Jeyaraj S, Lindner R, Laufer J, Daniel H, Lang F. The peptide transporter PEPT2 is targeted by the protein kinase SGK1 and the scaffold protein NHERF2. *Cell Physiol Biochem.* 2008b;22:705–14.

- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-8.
- Bournat JC, Brown AM, Soler AP. Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappaB in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 2000;61(1):21-32.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt Biochem.* 1976;72:248-54.
- Cacci E, Claassen JH, Kokaia Z. Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res.* 2005;80(6):789-97.
- Cai T, Wang H, Chen Y, Liu L, Gunning WT, Quintas LE, Xie ZJ. Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase. *J Cell Biol.* 2008;182(6):1153-69.
- Calabrese EJ. Converging concepts: adaptative response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson Law are manifestations for hormesis. *Ageing Res Rev.* 2008a;7(1):8-20.
- Calabrese EJ. Hormesis and Medicine. *Br J Clin Pharmacol.* 2008b;66(5):594-617.
- Calabrese EJ. Overcompensation stimulation: a mechanism for hormetic effects. *Crit Rev Toxicol.* 2001;31(4-5):425-70.
- Camandola S, Mattson MP. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(2):123-32.
- Carayol N, Wang CY. IKKalpha stabilizes cytosolic beta-catenin by inhibiting both canonical and non-canonical degradation pathways. *Cell Signal.* 2006;18(11):1941-6.
- Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science.* 2002;297(5580):365-9.
- Cheong R, Bergmann A, Werner SL, Regal J, Hoffmann A, Levchenko A. Transient IkappaB kinase activity mediates temporal NF-kappaB dynamics in response to a wide range of tumor necrosis factor-alpha doses. *J Biol Chem.* 2006;281(5):2945-50.
- Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP, Vanderluit JL, Ferguson KL, McIntosh WC, Park DS, Bennett SA, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J Neurosci.* 2005;25:1324-34.
- Chow DC, Forte JG. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J Exp Biol.* 1995;198:1-17.
- Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006;127:469-80.

Daniel L, Etkovitz N, Weiss SR, Rubinstein S, Ickowicz D, Breitbart H. Regulation of the sperm EGF receptor by ouabain leads to initiation of the acrosome reaction. *Dev Biol*. 2010;344:650-7.

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*. 2005;438(7069):867-72.

Dehner M, Hadjihannas M, Weiske J, Huber O, Behrens J. Wnt signaling inhibits Forkhead box O3a-induced transcription and apoptosis through up-regulation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *J Biol Chem*. 2008;283(28):19201-10.

Deng G, Song GA, Pong E, Sleisenger M, Kim YS. Promoter methylation inhibits APC gene expression by causing changes in chromatin conformation and interfering with the binding of transcription factor CCAAT-binding factor. *Cancer Res*. 2004;64(8):2692-8.

Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin SY, Hung MC. Beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*. 2002;2(4):323-34.

Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjö S, Nanou E, Estrada M, Miyakawa A, Lagercrantz H, Manira AE, Lal M, Uhlén P. Na, K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *PNAS*. 2009;7(106):2212-7.

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2008;18(1):108-15.

Dvela M, Rosen H, Cohen-Ben AH, Lichtstein D. Endogenous ouabain regulates cell viability. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011: In press.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. 1980;107:519-27.

Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:1301-11.

Ewart HS, Klip A. Hormonal regulation of the Na⁺ K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol*. 1995;269 (Cell Physiol. 38):C295-C311.

Fan W, Agarwal N, Cooper NG. The role of CaMKII in BDNF-mediated neuroprotection of retinal ganglion cells (RGC-5). *Brain Res*. 2006;1067(1):48-57.

Fischer EC, Howie SEM. Shh and Gli Signalling and Development. Austin: Bioscience L; 2007. p. 1-8.

Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford RT, Mieszczanek J, Bienz M. Dishvelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating β -catenin. *PNAS*. 2011;108:1937-42.

- Fisher CE, Howie SE. The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Dev Biol.* 2006;296(2):279-97.
- Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:237-72.
- Freese JL, Pino D, Pleasure SJ. Wnt signaling in development and disease. *Neurobiol Dis.* 2010;38(2):148-53.
- Freitas TP, Rezin GT, Gonçalves CL, Jeremias GC, Gomes LM, Scaini G, Teodorak BP, Valvassori SS, Quevedo J, Streck EL. Evaluation of citrate synthase activity in brain of rats submitted to an animal model of mania induced by ouabain. *Mol Cell Biochem.* 2010;341(1-2):245-9.
- Freyberg Z, Ferrando SJ, Javitch JA. Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *Am J Psychiatry.* 2010;167(4):388-96.
- Geering K. Functional roles of Na, K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008;17(5):526-32.
- Gehring EM, Zurn A, Klaus F, Laufer J, Sopjani M, Lindner R, Strutz-Seebohm N, Tavare JM, Boehmer C, Palmada M, Lang UE, Seebohm G, Lang F. Regulation of the glutamate transporter EAAT2 by PIKfyve. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24:361-8.
- Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene.* 1999;18:6888-95.
- Geva-Zatorsky N, Rosenfeld N, Itzkovitz S, Milo R, Sigal A, Dekel E, Yarnitzky T, Liron Y, Polak P, Lahav G, Alon U. Oscillations and variability in the p53 system. *Mol Syst Biol.* 2006;2:1-13.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kB and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010;140(6):918-34.
- 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.
- Gloor SM. Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett.* 1997;412(1):1-4.
- Glynn IM. All hands to the sodium pump. *J Physiol.* 1993;462:1.
- 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.

Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, Nusse R. WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF- κ B in *Drosophila* development and immunity. *Nature*. 2005;437:746-9.

Gottardi CJ, Gumbiner BM. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol*. 2001;11(19):R792-4.

Graves SW, Williams GH. An endogenous ouabain-like factor associated with hypertensive pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59(6):1070-4.

Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*. 1998;17:3878-85.

Guerrini L, Blasi F, Denis-Donini S. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *PNAS*. 1995;92(20):9077-81.

Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C. IKK β and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria induced RelA phosphorylation and NF- κ B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J Biol Chem*. 2002;277:38168-78

Hamid H, Gao Y, Lei Z, Houglund MT, El-Mallakh RS. Effect of ouabain on sodium pump alpha-isoform expression in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(7):1103-6.

Hamlyn JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ, Hamilton BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin Exp Hypertens*. 1998;20(5-6):523-33.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195-224.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132:344-62.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281:1509-12.

Hilton PJ, White RW, Lord GA, Garner GV, Gordon DB, Hilton MJ, Forni LG, McKinnon W, Ismail FM, Keenan M, Jones K, Morden WE. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *Lancet*. 1996;348(9023):303-5.

Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, Mayo MW. I κ B kinase alpha mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Biol Cell*. 2006;26(457-471).

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000;406(6791):86-90.

Hoffmann A, Baltimore, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*. 2006;210:171-86.

- Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NFkappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. 2002;298:1241-5.
- Holmes T, O'Brien TA, Knight R, Lindeman R, Symonds G, Dolnikov A. The role of glycogen synthase kinase-3beta in normal haematopoiesis, angiogenesis and leukaemia. *Curr Med Chem*. 2008;15(15):1493-9.
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *PNAS*. 1997;94:3668-72.
- Hu LW, Kawamoto EM, Brietzke E, Scavone C, Lafer B. The role of Wnt signaling and its interaction with diverse mechanisms of cellular apoptosis in the pathophysiology of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;15(35):11-7.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:609-42.
- Huang H, He X. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(119-125).
- Inestrosa NC, Arenas E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(2):77-86.
- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001;15:3059-87.
- Inoue N, Matsui H. Activation of a brain type Na pump after glutamate excitation of cerebral neurons. *Brain Res*. 1990;534:309-400.
- Iskra EB, Vermehren-Schmaedick A, Balkowiec A. Tumor necrosis factor- α increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neuroscience*. 2011;180:322-33.
- Iwai A, Marusawa H, Matsuzawa S, Fukushima T, Hijikata M, Reed JC, Shimotohno K, Chiba T. Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene*. 2004;23(45):7593-600.
- Jeong SJ, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Park HU, Brady JN. Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene*. 2005;24(44):6719-28.
- Joep RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res*. 2007;32(4-5):577-95.
- Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res*. 2010;44(8):506-10.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(3):a001271.

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech Dev.* 1993;43(2-3):135-47.

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA. Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *PNAS.* 1995;92(21):9618-22.

Kaplan JH. Biochemistry of Na, K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:511-35.

Karpova LV, Bulygina E, Boldyrev AA. Different neuronal Na⁺/K⁺-ATPase isoforms are involved in diverse signaling pathways. *Cell Biochem Funct.* 2010;28:135-41.

Kasperczyk H, Baumann B, Debatin KM, Fulda S. Characterization of sonic hedgehog as a novel NF-kB target gene that promotes NF-kB-mediated apoptosis resistance and tumor growth *in vivo*. *FASEB J.* 2009;23(1):21-33.

Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amaral FG, Pestana RRF, Orellana AMM, Cipolla-Neto J, Britto LRG, Avellar MCW, Rossoni LV, Scavone C. Influence of N-Methyl-D-Aspartate Receptors on Ouabain Activation of Nuclear Factor- κ B in the Rat Hippocampus. *J Neurosci Res.* 2012a;90:213–28.

Kawamoto EM, Gleichmann M, Yshii LM, Sá Lima L, Mattson MP, Scavone C. The influence of activation of canonical Wnt signaling by Wnt 3a protein on the vulnerability of PC12 cells to oxidative and apoptotic insults. *Braz J Med Biol Res.* 2012b; 45(1):58-67.

Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert J, Garner T, Magil S, Gallagher RT, Berova N, Nakanishi K. On the structure of endogenous ouabain. *PNAS.* 1999;96(12):6654–9.

Kearns JD, Basak S, Werner SL, Huang CS, Hoffmann A. IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J Cell Biol.* 2006;173:659-64.

Kim HJ, Hawke N, Baldwin A S. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ.* 2006;13:738–47.

Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, Sawyers CL, Rosenfeld MG, Baek SH. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature.* 2005;434(7035):921-6.

Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1998;273:15249-56.

Komiyama Y, Nishimura N, Munakata M, Mori T, Okuda K, Nishino N, Hirose S, Kosaka C, Masuda M, Takahashi H. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells. *J Hypertens.* 2001;19:229-36.

- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *PNAS*. 1995;92(19):8856-60.
- Korte M, Staiger V, Griesbeck O, Thoenen H, Bonhoeffer T. The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *J Physiol Paris*. 1996;90(3-4):157-64.
- Kotova O, Galuska D, Essén-Gustavsson B, Chibalin AV. Metabolic and signaling events mediated by cardiotonic steroid ouabain in rat skeletal muscle. *Cell Mol Biol*. 2006;52(8):48-57.
- Krueger B, Haerteis S, Yang L, Hartner A, Rauh R, Korbmacher C, Diakov A. Cholesterol depletion of the plasma membrane prevents activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by SGK1. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24:605–18.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, Verma U, Verma IM, Byers S, Gaynor RB. Regulation of beta-catenin function by the IkappaB kinases. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42276-86.
- Lang F, Artunc F, Vallon V. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18:439–48.
- Lang F, Böhmer C, Palmada M, Seeböhm G, Strutz-Seeböhm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1151-78.
- Larre I, Cereijido M. Na,K-ATPase is the putative membrane receptor of hormone ouabain. *Commun Integr Biol*. 2010;3:625-8.
- Laufer J, Boehmer C, Jeyaraj S, Knuwer M, Klaus F, Lindner R, Palmada M, Lang F. The C-terminal PDZ-binding motif in the Kv1.5 potassium channel governs its modulation by the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23:25-36.
- Lee S, Andrieu C, Saltel F, Destaing O, Auclair J, Pouchkine V, Michelon J, Salaun B, Kobayashi R, Jurdic P, Kieff ED, Sylla BS. IkappaB kinase beta phosphorylates Dok1 serines in response to TNF, IL-1, or gamma radiation. *PNAS*. 2004;101(50):17416-21.
- Li J, Khodus GR, Kruusm M, Kamali-Zare P, Liu XL, Eklöf AC, Zelenin S, Brismar H, Aperia A. Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. *Nature*. 2010;1(42):1-7.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 2005;437(7063):1370-5.

Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:399-421.

Liebner S, Plate KH. Differentiation of the brain vasculature: the answer came blowing by the Wnt. *J Angiogenes Res*. 2010;2(1):1-10.

Lim JY, Park SI, Oh JH, Kim SM, Jeong CH, Jun JA, Lee KS, Oh W, Lee JK, Jeun SS. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res*. 2008;86(10):2168-78.

Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na, K-ATPase. *J Biol Chem*. 1994;269:19659.

Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell*. 2001;7(5):927-36.

Liu L, Abramowitz J, Askari A, Allen JC. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. *Am J Physiol*. 2004;287:H2173-H82.

Logan C, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.

Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NFkB through utilization of the Ikb kinase and activation of the mitogen- activated protein kinase p38. *J Biol Chem*. 2001;276:18934-40.

Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gros P, Levenson R. Identification of the Mammalian Na,K-ATPase b3 Subunit. *J Biol Chem*. 1996;271(37):22754-8.

Marini AM, Jiang X, Wu W, Tain F, Zhu D, Okagaki P, Lipsky RH. Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: from genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci*. 2004;22:121-30.

Market CL, Moller F. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Biochemistry*. 1959;45:753-63.

Marks MJ, Seeds NW. A heterogeneous ouabain-ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci*. 1978;23 (27-28):2735-44

Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*. 2005;6:777-84.

Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell*. 2001;7(5):915-26.

- Mattioli I, Sebald A, Bucher C, Charles RP, Nakano H, Doi T, Kracht M, Schmitz ML. Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol.* 2004;172(10):6336-44.
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:120-9.
- Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1144:97-112.
- Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest.* 2001;107(3):247-54.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 2006;13(5):852-60.
- McDonough AA, Farley RA. Regulation of Na,K-ATPase activity. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993;2:725-34.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci.* 2003;6(10):1072-8.
- Mercer RW. Structure of the Na, K-ATPase. *Int Rev Cytol.* 1993;137:139.
- Miller FD, Pozniak CD, Walsh GS. Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. *Cell Death Differ.* 2000;7:880-8.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, de Sá Lima L, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 2006;26(14):3813-20.
- Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *J Neurosci.* 2010;30(41):13690-8.
- Musial A, Eissa NT. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(26):24268-73.
- Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, Hirohashi S. Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein. *Oncogene.* 2005;24(19):3141-53.
- Nathanson JA, Scavone C, Scanlon C, McKee M. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron.* 1995;14(4):781-94.
- Nawa H, Carnahan J, Gall C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci.* 1995;7(7):1527-35.

Nelson DE, Ihekweba AEC, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MRH. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*. 2004;306:704-8.

Nesher M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci*. 2007;80(23):2093-107.

Nestler EJ, Greengard P. Serine and threonine phosphorylation. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, eds. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p. 471–495.

Nguyen AN, Wallace DP, Blanco G. Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(1):46-57.

O'Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. 1997;20(6):252-8.

Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kB signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12(8):695-708.

Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-66.

Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103.

Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:185-94.

Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ*. 2006;13:861-72. .

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. North Ryde, New South Wales, Australia: Academic; 1986.

Peng M, Huang Z, Xie, et al. Partial inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain induces the Ca²⁺- dependent expression of early-response genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1996;271:10372-8.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:49-62.

Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kB pathway. *Oncogene*. 2006;25:6717-30.

Peterson GL, Ewing RD, Conte FP. Membrane differentiation and de Nova synthesis of the (Na²⁺ k⁺)-activated adenosine triphosphatase during development of *Artemia salina* nauplii. *Dev Biol*. 1978;67(1):90-8.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000;407(6803):535-8.

Pressley TA. Structure and Function of the Na, K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metabol*. 1996;22:264.

Riegel RE, Valvassori SS, Elias G, Réus GZ, Steckert AV, de Souza B, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Animal model of mania induced by ouabain: Evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain. *Neurochem Int*. 2009;55(7):491-5.

Rodrigues A, Queiróz DBC, Honda L, Silva EJ, Hall SH, Avellar MCW. Activation of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) by In Vivo and In Vitro Exposure of Rat Epididymis to Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli* 1. *Biol Reprod*. 2008;79(6):1135-47.

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor- κ B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem*. 1996;67:662-8.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. 2000;403(6767):316-21.

Ruktanonchal DJ, El-Mallakh RS, Li R, Levy RS. Persistent Hyperactivity Following a Single Intracerebroventricular Dose of Ouabain. *Physiol Behav*. 1998;63(3):403-6.

Sá-Lima L, Kawamoto EM, Lepsch LB, Munhoz CD, Curi R, Scavone C. Ouabain activates NF- κ B through Src-MAP kinase pathway in cerebellar primary cell culture. *J Neurosci*. 2012. In press.

Schatzmann HJ. Herzglykoside als hemmstoffe für den aktiven kalium- und natriumtransport durch die erythrocytenmembran. *Helv Physiol Pharmacol Acta*. 1953;11:346-54.

Schmidt-Ullrich R, Mémet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphaël M, Israel A. NF- κ B activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development*. 1996;122(7):2117-28.

Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, Schoner W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem*. 1998;273:784-92.

Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem*. 2002;269:2440-8.

Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(2):C509-C36.

Schuetz F, Kumar S, Poronnik P, Adams DJ. Regulation of the voltage-gated K⁺ channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295:C73-C80.

Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*. 1998;254:439-59.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46:705-16.

Shamraj OI, Lingrel JB. A putative fourth Na⁺,K(+) -ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *PNAS*. 1994;91(26):12952-6.

Siebenlist U. NF- κ B/I κ B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1332:7-13.

Simons K, Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature*. 2010;11:688-99.

Singh H, Sen R, Baltimore D, Sharp PA. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*. 1986;319:154-8.

Sopjani M, Alesutan I, Wilmes J, Sopjani MD, Lam RS, Koutsouki E, Jakupi M, Föller M, Lang F. Stimulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity and Na⁺ coupled glucose transport by β -catenin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;402:467-70.

Srinivasan D, Yen JH, Joseph DJ, Friedman W. Cell type-specific interleukin-1 β signaling in the CNS. *J Neurosci*. 2004;24:6482-8.

Sung MH, Salvatore L, De Lorenzi R, Indrawan A, Pasparakis M, Hager GL, Bianchi ME, Agresti A. Sustained oscillations of NF- κ B produce distinct genome scanning and gene expression profiles. *PLoS One*. 2009;4(9): e7163.

Sweadner KJ. Two molecular forms of (Na⁺K⁺)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J Biol Chem*. 1979;254:6060-7.

Tai DJC, Su CC, Ma YL, Lee EHY. SGK1 phosphorylation of I κ B kinase α and p300 up-regulates NF- κ B activity and increases N-methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *J Biol Chem*. 2009;284:4073-89.

Tang RH, Zheng XL, Callis TE, Stansfield WE, He J, Baldwin AS, Wang DZ, Selzman CH. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF- κ B(p65)-dependent cell cycle progression. *PNAS*. 2008;105(9):3362-7.

Terstappen GC, Gaviraghi G, Caricasole A. The Wnt signaling pathway as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *IDrugs*. 2006;9(1):35-8.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999;398:422-6.

Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, Maksimova E, Huang XY, Xie ZJ. Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):317-26.

- Tian J, Gong X, Xie Z. Signal-transducing function of Na⁺-K⁺-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca²⁺]_i in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 2001;281:J1899-J907.
- Verkaar F, van der Stelt M, Blankesteyn WM, van der Doelen AA, Zaman GJR. Discovery of Novel Small Molecule Activators of b-Catenin Signaling. *PLoS One*. 2011;6(4):1-7.
- Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(12):965-74.
- Vlantis K, Wullaert A, Sasaki Y, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K, Roskams T, Pasparakis M. Constitutive IKK2 activation in intestinal epithelial cells induces intestinal tumors in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2781-93.
- Waterfield M, Jin W, Reiley W, Zhang M, Sun SC. IκB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2004;24:6040-8.
- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*. 2001;407(6803):527-30.
- Werner SL, Barken D, Hoffmann A. Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science*. 2005;309:1857-61.
- Wexler EM, Paucer A, Kornblum HI, Palmer TD, Geschwind DH. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem Cells*. 2009;27(5):1130-41.
- Widera D, Mikenberg I, Elvers M, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. Tumor necrosis factor α triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-κB signaling. *BMC Neurosci*. 2006;7(64).
- Withering W. An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. London: G.G .J . E. J.Robinson; 1785.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139:1281-92.
- Wu JP, Kuo JS, Liu YL, Tzeng SF. Tumor necrosis factor-α modulates the proliferation of neural progenitors in the subventricular/ventricular zone of adult rat brain. *Neurosci Lett*. 2000;292(3):203-6.
- Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem*. 2002;269:2434-9.
- Yu HS, Kim SH, Park HG, Kim YS, Ahn YM. Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: a rat model for mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(6):888-94.
- Yuan J. Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death. *Mol Cell*. 2006;23:1-12.

- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407:802-9.
- Yuan Z, Cai T, Tian J, Ivanov AV, Giovannucci DR, Xie Z. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol Biol Cell*. 2005;16(9):4034-45.
- Zhang L, Zhang Z, Guo H, Wang Y. Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22(6):615-21.
- Zhang S, Malmersjö S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlén P, Mikoshiba K, Aperia A. Distinct Role of the N-Terminal Tail of the Na, K-ATPase Catalytic Subunit as a Signal Transducer. *J Biol Chem*. 2006;281:21954-62. .
- Zhang X, Poo MM. Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron*. 2002;36(4):675-88.
- Zhong HH, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NFκB p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1998;1:661-71.
- Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006;13:1351-9.

Anexo A - Sequência do RNAm do gene *Nos2*

NM_012611.3 *Rattus norvegicus* nitric oxide synthase 2, inducible (*Nos2*), RNAm

CCTCTACCCACGACTGTGGCCATGACAAGCGAAGCCAAGTGCCCACTGCTTGTGACTGATGTGGGGCCCA
 GGAAGCACTAGCCTTGGTGGGATGGACCTCCATGAGTCCAGTAGAGGGTCCCTCCGTCTCTTCAGCATTCC
 CCTACCCAAGCCCAGCCAGAACCCACCCCTCAACTCTCCTTCTTTTCTGCAGATCGAGCCCTGGAAGACC
 CACATCTGGCAGGATGAGAAGCTGAGGCCCAGGAGGAGAGAGATCCGGTTCACAGTCTTGGTGAAGTACG
 TGAAAGTGGGCATGTCCCTCTGTCCCTGCTGTGTCCCTTTTACTGAGGCAGCCTTCCTGACTCCACCATG
 AGGGGCAAGGCATACGGAGAGTGGCCTTTATGGTGTGGCTACCAGAACTCTAGACACCAATTCTGAGAC
 TGGTGTCTCTGTAGTTCCGAACCTTGCCAAAGAGACCGAGTCAGGATGCACAGGGGCTGCCAGGCCAGTGCT
 CCATCTCTTCTGGAGGCTAACTCAGCTGGCCCTGTGTCTGTTTATTCCACAGAGCGGTGTTCTTTGCTT
 CT**GTGCTAATGCGGAAGGTCAT**GGCTTCCCGCGTCAGAGCCACAGTCTCTTTGCTACTGAGACAGGAAA
 GTCGGAAGCGCTAGCCAGGGACCTGGCTGCCTTGTTCAGCTACGCCTTCAACACCAAGGTACCCCTCTTAG
 GTGGAAGGAGCTTGGGGTGAGTGTAAGGGACCCCTGGGAGCTGAGGGCTGACATCCATGGTGTGCCACA
 CAGGTTGTCTGCATGGAACAGTATAAGGCAAAACACCTTGGAAGAGGAACAACACTACTGCTGGTGGTGACAA
 GCACATTTGGCAATGGAGACTGCCCCAGCAATGGGCAGGTAGGTAGCAGGGACACTGCTCATCTGGGGGC
 AGAGGGGCTTAGGAGGACCAAGAAAAGGGCCAGGGGACTCGGTGTGACCTGGAATTACTCGGGCCACTC
 TGGGTCCTTAAGCCATTTCCCATTTGGCACACAGGGCTTTTCTGTGACTTGACCAACTCTTCTTTATATA
 TGTCAGATTACTTGAGGTGATTAATTACATTTATTTATTTATGTTTCTTTGTGTGCATACACACGCCCC
 ACAGCTTGCATGTGGAGGTTAGAGGACAACCTGTAGGAGACAATTCTTACCTTCCATAATGTGAGTCCCT
 GAGGTTTTTCAGGCTTGGTGGCACTTTTACGTCTCTGAGCCATCACTGCAGCCAAAACCTACTTTAAATAA
 AATTCAAAAATTCTTATTTAACTGGGTATAGTGATGTGCACCTTGTAAATCCCAGCACTTGGCAGCAGAGGC
 AGGAGGATCCCAATGTGGGGCCAGCCTGGACTCCATAGGAAATCTTGTCTCAAAT'TCCCTTCAACAGG
 GATTCATATTTAGGGGCTGGAGAGATGGCTCAGCAGTTAAGATGGGTGCTTACATCCAAAAGACCACA
 GTTCAGCCCCAGCACCCACATCAGATGGTTCTCAGTCTCCTGTAACTTCAGCTCCAGGGACTCCAACATT
 GTCTCCTGGCCTCCCTGGGCACCCCACTCCCTGCATAGACGCACCTCTCTGACACAAATCTTTTGTAA
 GGAATTTATATTTTAAAAAATGTATTGAGGCTGAACAGAGGGCTCAGCAGTTAAGATCAGGTGCTGC
 TCTTCCAGAGGTCTGAGTTCAATTTCCAGCAACCACATGGTGGCTCACAACATATCTGTAATGGGATCTG
 ATGCTCTCTTCTGGTGTGTTGAAGACAGCTACAGTGTACATACATATGTAAAATAATAAATCTTTAAACA
 ACAGCAACACAAAAAGAAACAAAACAAACAAAGCATTTCATTCAAGGAAACAAACATTTTATTCAAA
 CAAAACAAACATTTTATTCAACAAAGGAAAAAGGGACAAACATAAGAATTTTACCTAGCTGGCCTCACACA
 GGCTACTTAGCCTTGTGCTTTGAACAGAGGCAAGTATGAGCAAGATGTTAAGGCTTGGTTTGCACCAAT
 TTGAGTTCGACTCCCTACTGTTGGAGGGATGAAAAGGCCATCAAAAGAAAGACCATGAGAAGAGATTACA
 CAAGGCTTAGCTTCTACAGTGTGATGGGGCCACGCTGCCTGAGACAGTTTCTGGAAAACCAACGTTA
 TTTTAGAGAATCTGTTGTTTCTAGCAACTTCCAAGCAAGAAGCAAGGGTCATATTTCTTTTGGAGAACCT
 TGTGTTCTTCCAGAGCTAAGTGGGAACACCAGGGTCTTCCACTGAGGGGCAGGGCCTCCGTGAGCTGGTT
 CAGCCGGAGTGAGGGGCGATCTGGACTTGCCAGCGGCTTTCTCCCTGGGATCTGGATTCTTTGCCTGCT
 CAGTGAGGCCAGTATTTAGACACACCACCACAGTAAAGGAAAACCTGTGGTTTTATGGTTCTTGGCCTGAG
 AACTCTGGTTCTTTGTCTTTTGTAGACTCTGAAGAAATCTCTGTTTATGATGAAAGAACTCGGGCATAC
 CTTTCAAGGTAAGGCACTCTCCCTATCCCTGCCTCCTGGGTGAGCCTGGGATCAGACCAAGGAAC'TGGGTA
 TGCACAGGATGTCTCCTCAGAGATGTCCAGGGGCAGACAGAGTCTTGGTCTGAGGTTTGTCTTCTGAGAG
 GGTGAGGATCAAGACATAGAAACCGAGTCCCTCCTGCGGGTTTGGGGCCTAGAGTCCATTGTTTACACC
 ATGGGCACGGCTGCCAGGTGTCTGAGCCTCTGTGTGTGTCTCCTTGGCAGGTATGCGGTATTTGGCCT
 GGGCTCCAGCATGTACCCTCAGTTCTGTGCCTTTGTCTCATGACATCGACCAGAAACTGTCTCACCTGGGA
 GCCTCCCAAGCTTGCCCCAACCGGAGAAGGGGACGAACCTCAGCGGGCAGGAGGACGCCCTCCGCAGCTGGG
 CTGTGCAAACCTTCCGGGTGAGTTCTAGTCAGACAGGCCGTAGTGCAC'TCATGCCAAACTTGTGTGGGTC
 CAGTGTCCCGGTGTCATGACCTCTGTCTAGGTGTAGGGTGGGGGATGGGCCCAGAACACAGATCAAAGC
 TGCTTCCCCAACCCCCACCCCCACCCAAGAAGAAGGTCACCTCCAGTGTATTGCTTTCATGTGGGAG
 AGAGTAGTGATCAGTCCCTTGGCATGACCTTATGACCCAGGGCTCTTCTTAGTGATAGACTTGTCCAC
 CTCACAACAGTGAGGTAGATCTTC

Em negrito o oligonucleotídeo iniciador direto, e sublinhado a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Nos2*.

Anexo B - Sequência do RNAm do gene *I κ B α*

NM_001105720.2 *Rattus norvegicus* nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (Nfkbia), mRNA

```

AGTCCCTGGGCGGCTGCCAGGAACACTCAGCTCATAATAACCTCGCGGAAAACACCGCGGCCGCGGCCTC
CAGAAACCCCGGCCTTGCGCAATCCCCCGCAGCCCGCCCTCTCGGGGGCCCCACGCAGTGCCTCACCA
CCCCGGGGGGTTTCCCTGTCATCCCGCAGGTTCCCTGCACCTTGGAATCATCCCATGAAGAGAAGACACTG
ACCATGGAAGTGATTGGTCAGGTGAAGGGAGACCTGGCCTTCCCTCAACTTCCAGAACAACCTGCAGCAGG
TGCGGGCTTGCCAGCTGTGCCCTCTTTGACCCCGTGGTGGAGTTAGATGAAGCTCAGTCGCCCCCAAAG
CGTTTCTAAATTAACAGTACAGGTCCCTTATCTGCCCTGGCCTTTTACATTCAAATTAGCCAAAGTCTTAG
AGCAAGAAGGAAAAATCCCAAGGGTTGGTTGAGGTCTTTATGACCCACGTAGGGCCTCCTGTTTGCCTGAT
CTCCTGTAGACAAATGGGAGGAGGGGATTCTGTAATAGGAGGTGTCTGGGGTTTCAGGAACTCAAGACTA
TGGGTTTGCTCCATGGCTTAGGCTCTTTCTGTTTCCCTCTTCCATTCGTAGACTCCACTCCACTTGGCTGT
GATCACCAACCAGCCAGGAATTGCTGAGGCACCTCTGAAAGCTGGCTGTGATCCTGAGCTCCGAGACTTT
CGAGGAAATACCCCTCTCCATCTTGCCTGTGAGCAGGGCTGCCTGGCCAGTGTAGCAGTCTTGACTCAGA
CCTGTACGCCCCAGCATCTCCACTCCGTCTTGCAGGCCACCAACTACAACGGTAGGTCTGCCAGTCCATC
CAGGGACGCAGAGAAGGGAGAGACGGGTCCCTTGTAGTCTAGCCTGGAGCTAAAACGCCTCAACGTATAA
GAAGTTCAGGCAGTGTGGACTTTTAAAAAGTCTTCTCCATGATTCCCTACATGACGTTCACTGAGAACCCA
GACTTTTGAGTTCCTTCAAAATTTAGAGTTGTTTGTGGTTGTCCCCAAGAAAGGAGACGTGACTTGTGTGAG
GATTGAAACAAGTGTTACAGTTCCGTCTTATATCCTGCAGGCCACACGTGTCTACACTTAGCCTCTATC
CATGGCTACCTGGGCATCGTGGAGCACTTGGTGACTTTGGGTGCTGATGTCAACGCTCAGGTGAGTACTT
CCCTTCTCTCTAACTCTGCTGGGCTGGCTCTTACTGTGAGCAGATTTCCAGATAAACACTTCTGATTG
CCTTTGGTTTCAGGAGCCCTGTAATGGCCGGACAGCCCTCCACCTTGCAAGTGGACCTGCAGAATCCTGAC
CTGGTCTCGCTCCTGTTGAAGTGTGGGGCTGATGTCAACAGAGTAACCTACCAGGGCTACTCCCCCTACC
AGCTTACGTGGGGCCGCCAAGTACCCGGATACAGCAGCAGCTGGGCCAGCTGACCCCTGGAAAAATCTTCA
GACGCTGCCCCGAGAGTGAGGATGAGGAGAGCTATGACACGGAGTCAGAATTCACGGAAGATGAGGTGCGT
GTTTCATTACTGCCAGAGTGGTCCATTCTCCCTCACCACACCTAGGTCTGTTCTAGAGCTGTTCTGTATCA
TAGGGACCTGAGTTATTCAACTTCTCAGTCTCAGCTTGCAAAGCCAGGATCCCAAGAAGTGTCTCTGGT
TTGCTTTAATAGCTTACCCTTGTGGGTTTCGGAATGGGGCAGTAAGAGGGAGTTGTGGGAATTGAACCCA
GGCTTTAACACGTGGTAATAGGCACATGTTCTACCATTGAGCTATGTCCCTGCAATAGCTTAGACTTTT
GAAAGGAGAGAATTGGTGAAGGGAACCTCCTGCAGCCCGCGCCTGCGTTCTGTTTAGGCTGAGGAGGAGA
GAGTCCAGGAATGGGAGTTATTTGTAGAAGCAGCTCTCCCGCCATCCCAATGGCTTGGCGAAGTTCTAGG
AATCTAATGTGCCTTTTTCCCTCTCTTGTTCAGTTGCCCTACGATGACTGTGTGTTTGGAGGCCAGCGT
CTGACGTTATAAGAGGAAAGTGGCCAAAGGAACGTGGACTTGTATATTTGTACAAATAGAGTTTTATTTT
TCTAAAAAAAAAAAAAGAAAAAGAAAAAAATAAGAAAGGTATACCTTAGCACCACAGCACACAGCGCCT
AGCCCCGAGCATTCTATTGTGGTGATTTCAGCTGTTGTTCTTGTGAAATTTGGGGAAACAGATCATTTGAAA
TTCAAAGGAAATGTCTCCTAAGGTTTCATGTTTGTGGGATTTTTTTTTTTTTTTTGGAGTGATTTTCCAGA
ATCTGATAAAAGGACCACATTTTATTTATTGTGCTTTTGGTTGAACCGCCATAGACTGTAGCTGACCCCA
GTGTGCCCTCTCACGTAAGAACCAGGTGTTCACTGGTATGTGCTTAAGTCATCCCCAGCTGAGATTTGTA
CCACTTTCTTGTAATGTTGTATATGGTGTATTTTGTGGTAATTTATTTTGGTACTTCTAAGATGTATAT
TTATTAAACAGATTTTACAGACA

```

Em negrito o oligonucleotídeo iniciador direto, e sublinhado a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *I κ B α* .

Anexo C - Sequência do RNAm do gene *Tnf*

NM_012675.3 *Rattus norvegicus* tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
(*Tnf*), mRNA

CACCAAGGGACCAGCCAGGAGGGAGAAACAGCAACTCCAGAACACCCTGGTACTAACTCCCAGAAAAGCAA
GCAACCAGCCAGGCAGGTTCCGTCCCTCTCATACACTGGCCCGAGGCAACACATCTCCCTCCGGAAAGGA
CACCATGAGCACGGAAGCATGATCCGAGATGTGGAACGGCAGAGG**AGGCGCTCCCCAAAAAGATGGGG**
GGCCTCCAGAACTCCAGGCGGTGTCTGTGCCTCAGCCTCTTCTCATTCCTGCTCGTGGCGGGGGCCACCA
CGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCCCAACAAGGAGGAGGTGAGTGCCTGGGCAGCGTT
TATTCTCACTACAAGCAAAGTAGGGTGGGAGGGCAAGAAAGGCAGGAGGGTAAGGGAAAAGAGGTCCGGT
GGTGGGCACAGTAATGTGGAGGAGAGTTGGGGAGGGAGACCTCGGACCCGTGCAGCCAGTTGTCTAAACA
TCCTTGGGTGGATGCACGGAGGGGCGAATGAACGAACAAGCGTGCGTACACGTGCAGAGATGTGCAGAGA
CGTGGCCAGGGGAACAGGGAAGAAGCAAGAGATAAAAAATTTCGAGACGGAGATGGGAGACGAGGGAGATAA
GGAGATATGAGAGATAAGGAGGGAGATGGAGGGGAAACAACAGATCAAGCACAGAGGGTACCACAGAAAG
ATGCTGAGGTTGGACGGATAAAATGAATGAGGAGGAAAAGCACTGACTGGGGGGGGGGGGCTGGCAAAGAG
CGGGGAGGCTTCTCCTTTGTGGTGAGTCTGTCTACTAACCTACTTCTTTCCCTACACAGAAGTTCCCAAA
TGGGCTCCCTCTCATCAGTTCCATGGCCCAGACCCTCACACTCAGTAAGTGTTCCTCAAGCCTCTCTCTTA
ATTTAGGATGGGGGGCGGGGACTTAAAGCTTTGGTTTGGGAGGAAAGGGAATAGGGGTCTAACTACACA
GATGCTTGCTGGGAAACCTAAGGGTCTCATCTCCGCCTTTGTCCCCTTCCAGGATCATCTTCTCAAACT
CGAGTGACAAGCCCGTAGCCACGTCGTAGGTAAGTTTCTTCGCATGTGCCTTGGGGGGGGGGGTGTGAC
AGGGCAGGATTTTGGGGTCGTGCCAGGCTGAGAGAAGACAAGGGCTCTCAGAGACAGCAGGTGAGAGAGT
CAGAGCGGTGATTCAAAGGCAAGGCATTAGGAGGCCACCCCGGACCTCGTAGCCAATGGGACGTGGAAAG
ACCAGAGGGCGCAGGAACCGGAAGTGAAGTGTGGGTAGAAGTTGAGGTTTCAGGATGTGGAGTGTGAACCTA
AGAGGGTGACACTGACTCAATTCTCCCTCCCTCAGCAAACCACCAAGCGGAGGAGCAGCTGGAGTGGCTG
AGCCAGCGTGCCAACGCCCTCCTGGCCAATGGCATGGATCTCAAAGACAACCAACTGGTGGTACCAGCAG
ATGGGCTGTACCTTATCTACTCCCAGGTTCTCTTCAAGGGACAAGGCTGCCCCGACTACGTGCTCCTCAC
CCACACCGTCAGCCGATTTGCCATTTTCATACCAGGAGAAAAGTCAGCCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCT
TGCCCTAAGGACACCCCTGAGGGAGCTGAGCTCAAGCCCTGGTATGAGCCCATGTACCTGGGAGGAGTCT
TCCAGCTGGAGAAGGGGACCTGCTCAGCGCTGAGGTCAACCTGCCCAAGTACTTAGACATCAGCGAGTCT
CGGGCAGGTCTACTTTTGGAGTCATTGCTCTGTGAGGCGACTGGCGTGTTCATCCGTTCTCTACCCAGCCC
CTGTCCCCGACTCTGACCCCCATTACTCTGACCCCTTTATCGTCTACTCCTCAGAGCCCCCAATCTGTGT
CCTTCTAACTTAGAAAAGGAATTGTGGCTCTGGGTCCAACCTCCGGGCTCAGAATTTCCAACAACCTACGAT
GCTCAGAAACACACGAGACGCTGAAGTAGTGGCCTGGATTGCGGGCTGCTCATGAGCCGCCACCGGCAAG
GATTCCAATGGGCTTTCGGAACCTCACTGGATCCCGGAATGTCGATGCCGTGAGTGGATCGGGGGAGTGGAG
GGGGGAGTGGATCAGGCTGCCTCTGGCTCACAAGGCTGCTGAAGATGTCTCAGGCCTCCCTTCCTTCCTT
CCTTCCCTCCCTCAGAGCTTCCCAGACTGTTCCCTGAGGCACAGCGCCAGCCTTCCTTACGGAACCCCC
TCTATTTATAATTGCACCTGTGACTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTGCTTATGAATGTATT
TATTTGGAAGGCCGGGGCGTCTTGGAGGACCCAGCGTTGGGAAGCTGTCTTCAGGCCAACATGTTTTCTG
TGAAAACGGAGCTAAACTACCAGCTATCCCCATCTGGTCCCCCACCCCTGCCCTCGTTGCCCTCCCCCTTT
TCTTTTGCTTATGTTTAAAAACAAGATATTTATCTAACCAGTTGTCTTAATAATGCTGATTTGGTGACCA
GGCTGTGCTACATCACTGAACCTCTGCTCCCCACGGGAGCCGTGACTGTAATCGCCCTACGGGTCAATTG
AGAGAAAATAAAGTTTCGCTTGAAAAAGAAA

Em negrito o oligonucleotídeo iniciador direto, e sublinhado a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Tnf*.

Anexo D - Sequência do RNAm do gene *Bax*

NM_017059.1 *Rattus norvegicus* Bcl2-associated X protein (Bax), mRNA

GTGCTCCTATCCCCGTGTCCATTACATCTAGTTTCATCCAGGATCGAGCAGAGAGGATGGCTGGGGAGA
CACCTGAGCTGACCTTGGAGCAGCCGCCCCAGGACGCATCCACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTCAGGCG
AATTGGCGAT**TGAACTGGACAACAACATGGAGC**TGCAGAGGTGTGGTTCCCTGGGACCTGGGGTACATCCAG
GGGTTTCCTGTACCTCAAGAACTCAGGCACTGGGCTAGCACTCTTGTCCCTCCCAAGGGACTAGGTGTCC
TCCACTCAACTCAGATAGTCTGTGCTGGGAATAGAACCCAGGGCCTGTTTACATGGTAGGCCAGCCCTTT
ACCCCTTGAGCTGCACTCCTAGCCCCGTGCTTAGTGGTGTAAAGAAAGTTTTGTCTTCTGAGCCGTGCCTT
CGGCCTCTTGCTGGTGGATGTTCCGGCAGGTGCTCTGCAGTTCAGCCATACCTCCAAGCTGTGCTCACAGC
CCCTCACTGGGGACGGCTAGGTGAAGCTCTACCTTTGAGCCACTCACTAGTAGATGCTGTGCAAAATACT
GTACCATAAAAGCCATGTCTCCAGCCCCCTCGCTGGTGCCCTGCAGGTGCTCTACCACTGAGCCATGCCTTTG
GTACCCCAACATAGTCAGGAGCTTGACCATGAAGTCATACCTCAAGCCCCCTCAGAGTAGGTTTTCCATTG
CTGAGCCATGACCCGGGCGTGATACTTAGGAAAGCACGTTTCTGCGAAGTTAAGCCCCCTAGTCCACACA
GTCCCC

CCTTTTTGTTACAGGGTTTCATCCAGGATCGAGCAGAGAGGATGGCTGGGGAGACACCTGAGCTGACCTT
GGAGCAGCCGCCCCAGGATGCATCCACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCGAATTGGAGATGAACTG
GACAATAATATGGAGCTGCAGAGGATGATTGCTGACGTGGACACGGACTCCCCCGAGAGGTCTTCTTCC
GGGTGGCAGCTGACATGTTTGCTGATGGCAACTTCAACTGGGGCCGCGTGGTTGCCCTCTTCTACTTTGC
TAGCAAACCTGGTGCTCAAGGCCCTGTGCACTAAAGTGCCCGAGCTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACA
CTGGACTTCCTCCGTGAGCGGCTGCTTGTCTGGATCCAAGACCAGGGTGGCTGGGAAGGCCCTCCTCTCCT
ACTTCGGGACCCCCACATGGCAGACAGTGACCATCTTTGTGGCTGGAGTCCTCACCGCCTCGCTCACCAT
CTGGAAGAAGATGGGCTGA

Em negrito o oligonucleotídeo iniciador direto, e sublinhado a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Bax*.

Anexo F - Sequência do RNAm do gene *Bdnf*

NM_ 02513.3 *Rattus norvegicus* Brain-derived neurotrophic factor, mRNA

AGCTCTCCTGCTCAGAGCTGCAGCCAGCCGGCCCTCTAGCCACTACTGTTTCCACCACACATTCTACCA
 AGGACTGTGCTGCTGACTTGAAAGGAAGATTACTATTCCACTTGTCAGTTGTTGCTTAGTAACATGTGTGA
 TTGTGTTTCTGGTGACGGCGTGAACAGAGATCATTAAAAATTAAACCCCCAGAGCTGCTAAAGTGGGAGG
 AAGTGGGAGCGGGGAAGCCACAGTGCCGTCACTTGCTTAGAAACCGTTTACTCTCAGGCTTACATGTAAA
 TCTTGAGGAAAACTGCATGTCTCTGGTTTATATTAAGCTACATACAGCACGGTAACTGACATTGATTT
 GTGTCCCCTGCAGCTGGAGTGGATCAGTAAGACATTAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAA
 AGGTCTGAAATTACAAGCAGATGGGCCACATGGTGTCCCCAAGAAAGTAAGGTCTAACCTGTTCTGTGTC
 TGTCTCTGCTTCCTTCCCACAGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTCTTACTATGGTT
 ATTTTCATACTTCGGTTGCATGAAGGCTGCGCCCATGAAAGAAGCAAACGTCCACGGACAAGGCAACTTGG
 CCTACCCAGCTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCCAGGGCAGGTTTCGAGAGGTCT
 GACGACGACGTCCCTGGCTGACACTTTTGAGCACGTGATCGAAGAGCTGCTGGATGAGGACCAGAAGGTT
 CGGCCAACGAAGAAAAACCATAAGGACGCGGACTTGTAACCTTCCCGGT**GATGCTCAGCAGTCAAGTGC**
CTTTGGAGCCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGAGGAATACAAAAATTACCTGGATGCCGCAAACATGTCTAT
GAGGGTTTCGGCGCCACTCCGACCCCGCCCGCGTGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGCGAGTGG
GTCACAGCGGCAGATAAAAAAGACTGCAGTGGACATGTCCGGTGGGACGGTCACAGTCCCTGGAGAAAGTCC
CGGTATCAAAAGGCCAACTGAAGCAATATTTCTACGAGACCAAGTGTAATCCCATGGGTTACACGAAGGA
AGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAAGGCACTGGAACTCGCAATGCCGAACTACCCAATCGTATGTTTCGGGCC
CTTACTATGGATAGCAAAAAAGAGAATTGGCTGGCGGTTCATAAGGATAGACACTTCCTGTGTATGTACAC
TGACCATTAAGGGGAAGATAGTGGATTTATGTTGTATAGATTATATTGAGACAAAAATTATCTATTTG
TATATATACATAACAGGGTAAATTATTCAGTTAAGAAAAAGATAATTTTATGAACTGCATGTATAAATGA
AGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTATTTGGACATATCCATGACCAGAAAGAAACAGTCATT
TGCGCACAACTTTAAAAGTCTGCATTACATTCCTCGATAATGTTGTGGTTTGTGGCCGTTGCCAAGAATT
GAAAACAAAAAGTTAAAAAAATAATAAATTGCATGCTGCTTTAATTGTGAATTGATAATAAACTGTCCC
TCTTTCAGAAAACAGACAAAAAAACAAAAACAAAAAAAGCAAAAACAAAAA

Em negrito o oligonucleotídeo iniciador direto, e sublinhado a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Bdnf*.

Anexo G - *Gapdh*

NM_ 0.17008.3 *Rattus norvegicus* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), mRNA

GACAAGATGGTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGCCGTATCGGACGCC'TGGTTACCAGGGCTGCCTTCT
 CTTGTGACAAAGTGGACATTGTTGCCATCAACGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTCTACATGTT
 CCAGTATGACTCTACCCACGGCAAGTTCAACGGCACAGTCAAGGCTGAGAATGGGAAGCTGGTCATCAAC
 GGGAAACCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCGCTAACATCAAATGGGGTGATGCTGGTGCTGAGT
 ATGTCGTGGAGTCTACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGGGCTCACCTGAAGGGTGGGGCCAA
 AAGGGTCATCATCTCCGCCCTTCCGCTGATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGTGAACCACGAGAAATAT
 GACAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCCTGGCCAAGGTCA
 TCCATGACAACTTTGGCATCGTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACTCAGAAGAC
 TGTGGATGGCCCCCTCTGAAAAGCTGTGGCGTGATGGCCGTGGGGCAGCCAGAACATCATCCCTGCATCC
 ACTGGTGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCAGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCC
 GTGTTCTTACCCCCAATGTATCCGTTGTGGATCTGACATGCCGCCTGGAGAAACCT**GCCAAGTATGATGA**
CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGGCCGAGGGCCCACTAAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGGACCAG
 GTTGTCTCCTGTGACTTCAACAGCAACTCCCATTTCTTCCACCTTTGATGCTGGGGCTGGCAT'TGCTCTCA
 ATGACAACTTTGTGAAGCTCATTTCTTGGTATGACAATGAATATGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCT
 CATGGCCTACATGGCCTCCAAGGAGTAAGAAACCTGGACCACCCAGCCAGCAAGGATACTGAGAGCAA
 GAGAGAGGCCCTCAGTTGCTGAGGAGTCCCCATCCCAACTCAGCCCCAACACTGAGCATCTCCCTCACA
 ATTCCATCCCAGACCCATAACAACAGGAGGGGCTGGGGAGCCCTCCCTTCTCTCGAATACCATCAATA
 AAGTTCGCTGCACCCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Em negrito o oligonucleotídeo iniciador direto, e sublinhado a sequência complementar inversa do oligonucleotídeo iniciador reverso do *Gapdh*.