

**GEOVANNI DE MORAIS LIMA**

**Influência da obesidade sobre a Na,K-ATPase no cerebelo de camundongos  
fêmeas**

Versão corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Coorientador: Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

SÃO PAULO

2022

## RESUMO

LIMA, G. M. **Influência da obesidade sobre a Na,K-ATPase no cerebelo de camundongos fêmeas**. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A obesidade é uma condição crônica caracterizada pelo excesso de tecido adiposo branco e por uma inflamação sistêmica de baixo grau. A Na,K-ATPase é uma proteína eletrogênica, essencial para a manutenção do potencial elétrico de células excitáveis, e a sua participação na neuroinflamação já foi relatada por diversos autores. O cerebelo, por sua vez, apresenta uma maior susceptibilidade aos danos oxidativos, em virtude do menor conteúdo de compostos antioxidantes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar as consequências da obesidade sobre a atividade da Na,K-ATPase, no cerebelo de camundongos fêmeas. Camundongos Balb/c fêmeas receberam ração convencional ou hiperlipídica, durante 10 semanas. Ao longo deste período, os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso, de massa muscular e massa gorda corporais. Ao fim do período, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e cerebelo foram coletadas. Foram mensuradas em amostras de soro a concentração de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-17). Em amostras de cerebelo, foi mensurada a atividade da Na,K-ATPase (NKA), da Glutathione-S-Transferase (GST), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR). Além disso, foi mensurada a concentração de Glutathione Reduzida (GSH), de fosfolípidios totais (FLT), colesterol total (CT) e glicosíngolipídios (GSLs) de membrana, em homogenatos cerebelares. Ainda, avaliou-se a expressão proteica das isoformas  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3-NKA, da *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), da *phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase* (p-ERK), do *nuclear factor erythroid 2-related factor* (Nrf2), do *4-hidroxynonenal* (4-HNE) e da  *$\alpha$ -tubulin* em homogenatos cerebelares. A análise estatística foi realizada utilizando *Students t-test*. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (5288160218). Ao final do protocolo, observou-se que animais mantidos com dieta hiperlipídica apresentaram ganho significativo de peso e de massa gorda corporais, em relação aos controles, sem diferenças significativas

quanto ao ganho de massa muscular. Quanto aos parâmetros séricos, observou-se aumento significativo nos níveis de TNF- $\alpha$ , sem afetar os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-17, em animais obesos, comparados aos controles. Em homogenatos cerebelares, verificou-se que animais obesos apresentaram redução significativa na atividade  $\alpha$ 2,3-NKA e esta redução de atividade não estava relacionada à uma diminuição na expressão das isoformas  $\alpha$ -2 e  $\alpha$ -3 da NKA, em relação a animais controles. Ainda, observou-se aumento significativo na atividade das enzimas GST, GPx e GR e redução do conteúdo de GSH em animais obesos, em relação aos saudáveis. Verificamos que a ingestão de dieta hiperlipídica promoveu aumento do conteúdo de CT e redução dos FLT, sem afetar o conteúdo de GSLs, em relação aos controles. Identificou-se, ainda, que animais obesos apresentaram uma redução significativa da expressão citosólica de Nrf2 e um aumento da expressão nuclear deste fator, quando comparados aos saudáveis. Além disso, foi observado que animais obesos apresentaram aumento da expressão citosólica do 4-HNE e da p-ERK, sem afetar a expressão da ERK total, comparados aos controles. Os dados sugerem que a obesidade leva a uma inflamação sistêmica e ao estresse oxidativo. Tais resultados podem explicar a redução da atividade da Na,K-ATPase no cerebelo de camundongos fêmeas obesas.

Palavras-chave: Obesidade. Na.K-ATPase. Neuroinflamação. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

LIMA, G. M. **Influence of obesity on Na,K-ATPase in the cerebellum of female mice.**

Thesis (Ph. D. thesis in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Obesity is a chronic condition characterized by excessive white adipose tissue and low-grade systemic inflammation. Na,K-ATPase is an electrogenic protein, essential for maintaining the electric potential of excitable cells, and its role in neuroinflammation has already been reported by several authors. The cerebellum, in turn, is more susceptible to oxidative damage, due to its lower content of antioxidant compounds. This study aimed to evaluate the influence of obesity on Na,K-ATPase activity in the cerebellum of female mice. Female Balb/c mice were given conventional or high-fat chow for 10 weeks. Throughout this period, mice were evaluated for weight gain, muscle mass and fat mass contents. At the end of the 10-week protocol, mice were euthanized and blood and cerebellum samples were collected. The concentration of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-17) were measured in serum samples. In cerebellum samples, Na,K-ATPase (NKA), Glutathione-S-Transferase (GST), Glutathione Peroxidase (GPx) and Glutathione Reductase (GR) activities were measured. In addition, the concentration of Reduced Glutathione (GSH), total phospholipids (PLT), total cholesterol (TC) and membrane glycosphingolipids (GSLs) in cerebellar homogenates were measured. Furthermore, the protein expression of  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3-NKA isoforms, extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and  $\alpha$ -tubulin in cerebellar homogenates were evaluated. Statistical analysis was performed using Students t-test. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. All procedures were previously approved by the Ethics in the Use of Animals Committee (5288160218). At the end of ten weeks, it was observed that mice given a high-fat diet had a significant gain in weight and body fat mass, compared to the control group. On the other hand, there were no significant differences regarding muscle mass gain between the evaluated groups. As for the serum parameters, a significant increase in TNF- $\alpha$  levels was observed, without affecting IL-1 $\beta$  and IL-17

levels, in obese mice, compared to the controls. In cerebellar tissue homogenates, it was verified that obese mice showed a significant reduction in  $\alpha$ 2,3-NKA activity, and this reduction was not related to a decrease in the protein expression of  $\alpha$ -2 and  $\alpha$ -3 NKA isoforms, compared to animals in control group. Furthermore, a significant increase in the activity of GST, GPx and GR and a reduction in the GSH content were observed in animals fed a high-fat diet, in comparison to the healthy group. Next, we found that obese mice have shown an increase in the TC content, accompanied by a reduction in PLT, without affecting the GSLs, compared to the control group. It was also observed that mice receiving the high-fat diet showed a significant reduction in the cytosolic protein expression of Nrf2 and an increase in its nuclear expression, when compared to mice fed control diet. Furthermore, it was observed that obese animals showed increased cytosolic expression of 4-HNE and p-ERK, without affecting total ERK expression, compared to healthy controls. Data suggest that obesity leads to systemic inflammation and oxidative stress. Such results may explain the reduction of Na,K-ATPase activity in the cerebellum of obese female mice.

Keywords: Obesity. Na,K-ATPase. Neuroinflammation. Oxidative stress.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo que pode impactar negativamente sobre a saúde. No mundo, apenas em 2016, mais de 1,6 bilhão de adultos apresentavam-se acima do peso, dentre os quais mais de 650 milhões encontravam-se na faixa considerada obesidade. No Brasil, no mesmo ano, a prevalência de pessoas acima do peso era de 56% dentro da população adulta, enquanto a obesidade atingia um percentual de 22% do mesmo grupo (WHO, 2016a; WHO, 2016b). Por si só, a obesidade representa um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças tais como a diabetes, hipertensão e doenças respiratórias. Além disso, estudos em seres humanos e em animais indicam que a obesidade se associa ao desenvolvimento de declínio cognitivo (Ward et al., 2005; Farr et al., 2008) e à anormalidades estruturais e na morfologia neural (Pannacciulli et al., 2006; Haltia et al., 2007; Papageorgiou et al., 2017; Arnold et al., 2014).

O papel da obesidade sobre a gênese de diversas patologias está provavelmente relacionado ao seu perfil de adaptações imunes e metabólicas. A ingestão calórica excessiva induz aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos, exacerbando a produção de triglicerídeos os quais, posteriormente, serão armazenados no tecido adiposo (Revisão em Ameer et al., 2014). Os ácidos graxos saturados (AGS) sintetizados ou ingeridos em excesso podem induzir, de maneira independente de ligante, a dimerização e a translocação de receptores do tipo Toll (TLR) 2 e 4 para jangadas lipídicas, levando ao recrutamento e desencadeamento da sinalização à jusante pró-inflamatória, por meio de moléculas adaptadoras TRIF e MyD88 (Lee et al., 2001; Wong et al., 2009; Snodgrass et al., 2013). Ao menos em parte, esse processo resulta na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), seguida de modificações pós-traducionais que permitem a sua translocação para o núcleo e a transcrição de enzimas envolvidas na inflamação, entre elas, a COX-2 (Snodgrass et al., 2013; Wong et al., 2009). Outro fator de transcrição envolvido nesse processo é a proteína ativadora 1 (AP-1), que é capaz de aumentar a expressão de fatores pró-inflamatórios, entre eles a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , e algumas

quimiocinas (Revisão em Konner e Bruning, 2011). Além disso, AGS podem ativar cascatas de sinalização envolvendo a *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK), por meio de mecanismo dependente de quinases ativadas por mitógenos MKK4 e MKK7, e, deste modo, desencadear estresse metabólico (Jaeschke e Davis, 2007).

O tecido adiposo, por sua vez, representa um importante órgão na manutenção da homeostase energética e também da imunidade. O papel da lipólise de triglicerídeos e da liberação de ácidos graxos para a produção de energia é conhecido há séculos. Por outro lado, o papel do tecido adiposo na imunidade passou a ser alvo de estudos apenas nas últimas décadas, com a identificação de peptídeos ativos secretados pelos adipócitos, denominados adipocitocinas (Cook et al, 1987; Revisão em Lehr, Hartwig e Sell, 2012). A secreção de adipocitocinas pró ou anti-inflamatórias se dá de forma contínua, a depender do metabolismo tecidual. Dentre as adipocitocinas com atividade pró-inflamatória produzidas pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina, a resistina e o TNF- $\alpha$  pelo seu amplo espectro de ações centrais ou periféricas. No hipotálamo, a leptina se acopla aos seus receptores, modulando a via à jusante JAK2/STAT3, e com isso regula a ingestão e o dispêndio energético (Chan et al., 2003). Em contrapartida, na periferia, a leptina parece induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (Santos-Alvarez e Sánchez-Margalet, 1999; Kiguchi et al., 2009), especialmente em condições em que há resistência a sua atividade, como observado na obesidade.

De maneira semelhante, a resistina exerce atividade pró-inflamatória ao induzir a ativação e translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, contribuindo para a transcrição de genes pró-inflamatórios (Silswal et al., 2005). Além disso, a secreção de resistina pelo tecido adiposo branco tem sido relacionada a uma piora na sensibilidade à insulina (Qi et al., 2006). O TNF- $\alpha$  por sua vez, é secretado pelo tecido adiposo, principalmente em razão da sua produção pelos adipócitos, mas também admite-se a contribuição de macrófagos infiltrados para a secreção desta citocina. Diferentes vias podem ser ativadas pelo TNF- $\alpha$ , a depender das proteínas adaptadoras recrutadas, as quais podem levar à ativação do NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente à transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-6 (Dbaibo et al., 2003; Trindade et al., 2019).

Um aumento de níveis séricos de citocinas e mediadores inflamatórios em modelos experimentais, semelhante ao observado em humanos, caracteriza a obesidade

como uma doença inflamatória sistêmica de baixo grau, e estudos apontam uma potencial contribuição dessas moléculas para a neuroinflamação. Sabe-se que embora o SNC apresente uma importante barreira para a entrada de substâncias advindas da periferia, a permeabilidade desta barreira pode ser afetada (ou alterada) de maneira a manter a homeostase e evidências experimentais revelam que a alteração da homeostasia do SNC pode ser observada na obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Elahy et al, 2014; Jais et al., 2016), o que por sua vez pode ocasionar em prejuízos funcionais no SNC.

Ainda, estudos em nosso laboratório mostraram a ativação máxima do NFkB em várias áreas do SNC, 2 horas após administração de LPS por via sistêmica. Estes estudos também mostraram que essa ativação é mediada pela via NMDA-NO visto que em animais tratados com MK-801 (antagonista de receptor NMDA) e/ou 7-Ni (7-nitroindazol, inibidor da enzima nNOS), observou-se atenuação da ativação induzida pelo LPS (Glezer et al, 2003).

A ingestão de dieta hiperlipídica por 2 semanas em camundongos machos altera de maneira significativa a expressão de moléculas transportadoras na barreira hematoencefálica, incluindo a Glut 1 responsável pelo transporte de glicose (Ogata, Masuda e Ohtsuki, 2019). Esses autores sugeriram que esse processo resultaria em uma menor oferta de nutrientes, diminuindo a produção de energia no parênquima cerebral, e assim, ocasionaria disfunção neuronal. Arnold e colaboradores (2014) demonstraram que após 17 dias ou 8 semanas da ingestão de dieta hiperlipídica, camundongos machos apresentaram prejuízo da memória de trabalho, mensurada por meio de uma reduzida alternância espontânea no labirinto em T (Arnold et al., 2014).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para a compreensão das alterações metabólicas decorrentes da obesidade. Neste contexto, o estresse oxidativo surge como um importante fenômeno, que pode desencadear alterações em diferentes vias de sinalização e até mesmo provocar dano estrutural às células, de maneira que sua presença tem sido relacionada à neuroinflamação; entretanto, nenhum estudo até o momento investigou a possível relação entre a obesidade induzida por dieta, o estresse oxidativo e a atividade da Na,K-ATPase no cerebelo de camundongos fêmeas. A seguir, será feita uma revisão sobre o estresse oxidativo e a sua relação com a obesidade.



## 1.2 Estresse oxidativo

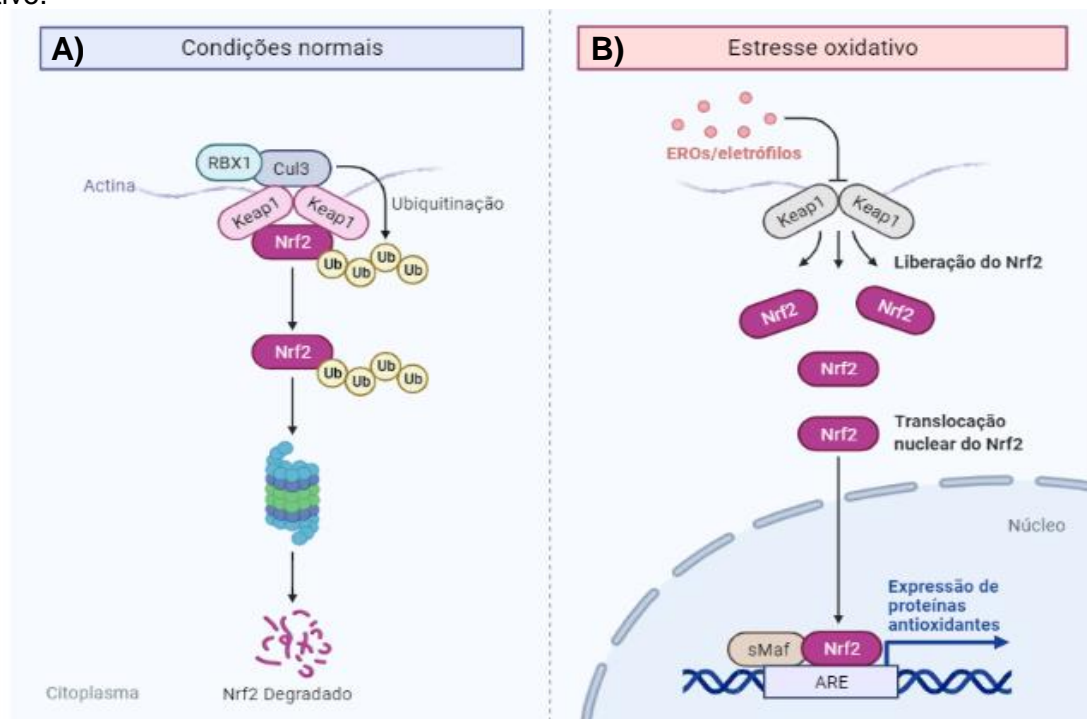
O termo estresse oxidativo foi introduzido por Sies, na década de 1985 (Sies, 1985). No ano seguinte, esse autor conceituou estresse oxidativo como sendo o dano oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem promover um dano estrutural a uma variedade de compostos orgânicos como proteínas, carboidratos, lipídios e o DNA (Sies, 1986). Ainda, o autor conceitua que o estresse oxidativo se dá quando há um desbalanço entre a produção de moléculas pró-oxidantes, decorrentes de processos metabólicos e/ou patológicos, e a geração de compostos antioxidantes, que combatem o excesso de EROs, levando a um aumento da produção do primeiro e prejuízo do segundo (Sies, 1986). Atualmente, o estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de pró-oxidantes/antioxidantes, em favor do primeiro, que leva à interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular (Sies, 2015).

As EROs possuem papel fisiológico como moléculas sinalizadoras durante processos de diferenciação celular, autofagia e imunidade. Na diferenciação celular, alguns trabalhos demonstraram que a redução de radicais livres retarda a diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas multipotentes de *Drosophila* (Owusu-Ansah e Banerjee, 2009) e impedem a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em adipócitos (Tormos et al., 2011). No que se refere a autofagia, estudos demonstraram que baixos níveis de EROs produzidas pelas mitocôndrias são essenciais para iniciar a autofagia durante a inanição (Scherz-Shouval et al., 2007), enquanto altos níveis podem desencadear a “morte celular autofágica” (Yu et al., 2006). Em relação à regulação da imunidade, as EROs participam do combate a patógenos (Arsenijevic et al., 2000) e da jusante de sinalização dos receptores do tipo toll (TLRs) (West et al., 2011), entre outros processos (Revisão em Sena e Chandel, 2012).

O estresse oxidativo pode ainda desencadear a ativação de vias compensatórias, a partir da síntese de enzimas do sistema antioxidante, e tal processo pode ocorrer mediante ativação da via do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Sob condições normais, o Nrf2 encontra-se sequestrado no citosol pelo complexo inibitório formado pelo *Kelch-Like Epichlorohydrin-Associated Protein 1* (Keap1), a *Cullin 3* (Cul3)

e a *RING box protein 1* (RBX1), os quais têm como alvo o Nrf2 para poliubiquitinação e posterior degradação via proteassoma 26S (Revisão em Renaud et al., 2019). Sob condições de estresse, as EROs promovem a liberação do Nrf2 de duas maneiras: a) reagindo com cisteínas presentes no Keap1, induzindo mudança conformacional, e à dissociação do Nrf2 (Figura 01); b) ativando quinases que promovem a fosforilação do Nrf2 e, desta maneira, liberam o Nrf2 do sequestro mediado pelo Keap1. Após a liberação, o Nrf2 acumula-se no citosol e, em seguida, migra para o núcleo e promove a transcrição de genes de enzimas antioxidantes, ao ligar-se aos Elementos de Resposta Antioxidante (AREs), localizados nas regiões reguladoras dos genes, permitindo uma resposta compensatória ao estresse oxidativo (Figura 01) (Revisão em Buendía et al., 2016; Silva et al., 2018).

Figura 01: Representação da via Keap1/Nrf2, sob condições normais e durante o estresse oxidativo.



Em condições normais, o fator de transcrição Nrf2 encontra-se ancorado ao citoplasma da célula por meio da ligação às proteínas *Kelch-Like Epichlorohydrin-Associated Protein 1* (Keap1), a *Cullin 3* (Cul3) e a *RING box protein 1* (RBX1), que formam um complexo inibitório e permitem que o mesmo seja posteriormente poliubiquitinado e degradado via proteassoma 26S (Figura 01A). Durante o estresse oxidativo, as espécies reativas podem promover liberação do Nrf2 do seu complexo inibitório e uma vez livre, ocorre translocação para o núcleo, onde o Nrf2 se ligará às regiões promotoras dos Elementos de Resposta Antioxidante (ARE) e dará início à transcrição

do RNAm de proteínas antioxidantes (Figura 01B). Adaptada de “*Keap1–Nrf2 Pathway*”, por *BioRender.com* (2022).

Dentre os genes ativados pelo Nrf2, estão os envolvidos na expressão de enzimas do sistema antioxidante e do metabolismo de fase 2, com destaque para as enzimas do sistema glutaciona, que participam de ambos os processos. Durante o estresse oxidativo, a glutaciona peroxidase (GPx) converte peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos (ROOH) à água e álcool, respectivamente. Neste processo, a glutaciona reduzida (GSH) sofre oxidação, gerando glutaciona oxidada (GSSG). Esta última pode ser novamente reduzida à GSH, a partir da atividade da enzima glutaciona reductase (GR). Ainda, a GSH pode ser utilizada para a formação de complexos com compostos endógenos ou xenobióticos, através da ação da enzima glutaciona-s-transferase (GST), facilitando a eliminação destes compostos do organismo. Além disso, a GSH pode interagir de maneira não-enzimática com superóxido ( $O_2^-$ ), óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO-), entre outros, diminuindo a quantidade de radicais livres (Revisão em Aoyama e Nakaki, 2012).

Alguns biomarcadores podem ser utilizados para mensurar o estresse oxidativo, sendo importantes para investigar o papel do estresse em diferentes processos patológicos. Dentre os marcadores utilizados, os derivados de radicais livres de oxigênio ou, também denominados, oxiradicais (como, por ex., o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos de lipídios) são estáveis e têm uma longa meia-vida (horas a semanas), o que permite uma mensuração e monitoramento repetidas vezes, enquanto que radicais livres têm meia vida curta (da ordem de poucos segundos) e a sua mensuração *in vivo* é difícil (Revisão em Czerska et al., 2015). Assim, têm-se utilizado alguns marcadores com sucesso, como a mensuração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), de 4-hidroxinonanal (4-HNE) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre outros. O  $H_2O_2$  é um oxiradical, cujo aumento indica estresse oxidativo, e como vimos anteriormente, pode ser convertido à água pela ação da GPx.

Em relação ao 4-HNE, sua produção é resultado da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), em um processo conhecido como peroxidação lipídica. Os fosfolipídios de membrana contendo PUFA ômega-6 são suscetíveis ao ataque de radicais livres, e a decomposição de hidroperóxidos derivados desses ácidos graxos, na

posição sn-2, leva à formação de 4-HNE. Uma vez formado, o 4-HNE é rapidamente metabolizado por uma grande variedade de enzimas metabolizadoras, entre estas, a GST, que pode catalisar a formação de aductos entre o 4-HNE e a glutathiona (GSH) (Revisão em Jaganjac et al., 2020). Ainda, utiliza-se o ensaio de TBARS para mensurar a peroxidação de PUFA, a partir do concentração de malondialdeído (MDA), porém pode ocorrer uma reatividade com substratos não-MDA, como carboidratos, proteínas e outros aldeídos, como o hexanol (Yeo et al., 1994).

Além disso, a mensuração do conteúdo de lipídios de membranas pode auxiliar na detecção de danos resultantes do estresse oxidativo. As membranas biológicas são estruturas dinâmicas que consistem de bicamadas de moléculas anfipáticas, sendo compostas principalmente de fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol (Yeagle, 1993; Vance e Vance, 1996; Revisão em Naudí et al., 2013). Os fosfolipídios são os lipídios predominantes na membrana de células eucarióticas e são formados por uma espinha dorsal de glicerol com um grupo hidrofílico ligado ao carbono 3 e ácidos graxos a C1 e C2, podendo formar cadeias de hidrocarbonetos saturadas (SFA), monoinsaturadas (MUFA) e poliinsaturadas (PUFA). Dentre os principais esfingolipídios em mamíferos, estão a esfingomielina e os glicosfingolipídios (GSLs), e ambos possuem caudas saturadas (ou trans-insaturadas); sendo que os gangliosídeos são esfingolipídios com ácidos siálicos terminais, pertencentes aos GSLs. Ainda em células de mamíferos, o colesterol predomina como o principal lipídio não-polar presente nas membranas celulares (van Meer e Lisman, 2002; Revisão em Van Meer et al., 2008). Como resultado do dano oxidativo, estudos demonstram que as EROs podem provocar alterações na distribuição dos lipídios da membrana: entre elas, foi relatado redução do conteúdo de fosfolipídios (Garcia et al., 2015; Pinheiro et al., 2019), diminuição do colesterol (Garcia et al., 2018) e aumento de gangliosídeos (Garcia et al., 2015), à depender do estímulo utilizado para desencadear o estresse oxidativo e do tecido investigado.

A inflamação de baixo grau e o estresse oxidativo prolongados estão ligados à uma série de doenças, que incluem a aterosclerose e as doenças neurodegenerativas. Na aterosclerose, ocorre o acúmulo de colesterol de baixa densidade (LDL), na parede das artérias, que leva à formação de uma LDL-oxidada, e esta última promove o recrutamento de macrófagos e linfócitos T para o espaço subendotelial. Com a

progressão da lesão aterosclerótica e da produção de citocinas pró-inflamatórias e EROs, pode ocorrer ruptura dos microvasos e hemorragia/trombose (Revisão em Kattoor, 2017; Singh e Jialal, 2006). Em relação as doenças neurodegenerativas, foi demonstrado que especificamente na Doença de Alzheimer (DA), há evidências de injúria mediada por EROs, uma vez que foi observado elevados níveis de malondialdeído e 4-HNE no cérebro de pacientes com DA (Lovell et al., 1995). Além disso, foi observado aumento de proteínas carboniladas em diferentes regiões do cérebro de pacientes com DA, incluindo o córtex frontal e o hipocampo; entretanto, sem afetar o cerebelo (Hensley et al., 1996; Hensley et al., 1995). Ainda, outro estudo observou que o cérebro de pacientes com Doença de Parkinson (DP) apresenta uma aumentada expressão de marcadores do estresse oxidativo, entre eles, o 4-HNE e o malondialdeído, e uma redução do conteúdo de ácidos graxos PUFA, na região da substância negra, no mesencéfalo (Dalfó et al., 2005); também foi observado um aumento de proteínas carboniladas nessa região e em outras regiões cerebrais que aparentemente não seriam afetadas pela DP, entre elas, o cerebelo (Alam et al., 1997).

As evidências da relação entre obesidade e estresse oxidativo em humanos e modelos da doença em animais são inúmeras (Tereshin et al., 2007; Duvnjak et al., 2007; Khan et al., 2006; Wang e Trayhurn, 2006; Hukshorn et al., 2004; Revisão em Nijhawan et al., 2019). Na obesidade, as células inflamatórias ativadas presentes no tecido adiposo podem liberar enzimas (como a elastase, proteases neutras, entre outras), mediadores químicos (eicosanóides, adipocitocinas, óxido nítrico, entre outros) e espécies reativas (peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, superóxidos, entre outros), que podem contribuir para a inflamação e desencadear danos estruturais a componentes celulares, em virtude do estresse oxidativo (Revisão em Biwas, 2016). Além disso, o aumento da produção de TNF- $\alpha$  e de IL-6 leva a um incremento na produção de EROs, que por sua vez participam da liberação de mais citocinas e fator de crescimento, por meio da ativação de fatores de transcrição induzidos pela alteração da sinalização redox (Lavrovsky et al., 2000). Han e colaboradores (2012) observaram que devido ao excesso de nutrientes, como glicose e ácidos graxos livres, ocorre aumento da produção de EROs, resultando em aumento da expressão do gene do fator quimiotático de monócitos, o que pode levar à migração de mais células imunes para o tecido adiposo (Han et al., 2012). Ainda, os autores

observaram que o excesso de glicose e palmitato aumentou a síntese de EROs a partir de NADPH Oxidases (NOX), especificamente da isoforma NOX4 em cultura de adipócitos murinos 3T3-L1, que é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio e, dessa maneira, gera espécies reativas e desequilíbrio da sinalização redox (Han et al., 2012). Tais alterações regulam ainda mais a expressão dos genes de IL-1 e IL-6, que são liberados pela via dependente do fator redox-1 (Revisão em Nijhawan et al., 2019). Em humanos obesos, o acúmulo de ácidos graxos nos tecidos adiposo e hepático também leva a um desbalanço na produção de radicais livres, do metabolismo da glicose, injúria ao DNA mitocondrial e dano à ácidos graxos presentes na estrutura celular (Tereshin et al., 2007; Duvnjak et al., 2007; Khan et al., 2006).

Neste sentido, a relação entre obesidade e estresse oxidativo têm sido demonstrada em vários estudos (Revisão em Dandona et al., 2010; Serra et al., 2013; Furukawa et al., 2017; Lee et al., 2009). Tendo em vista a contribuição desses fenômenos para a neuroinflamação, no próximo tópico discutiremos sobre a Na,K-ATPase, uma importante proteína na regulação do potencial elétrico de células excitáveis, cuja atividade pode ser influenciada por fenômenos inflamatórios e oxidativos, como os envolvidos na patogênese da obesidade.

### 1.3 Na, K-ATPase

A Na,K-ATPase (NKA) é uma proteína de membrana essencial para a manutenção do potencial elétrico de células excitáveis e do equilíbrio osmótico, celular. Sua descrição data de estudos conduzidos por Skou, a partir de extratos de nervos obtidos de pata de caranguejos (Skou, 1957). Vale lembrar que este estudo rendeu o prêmio Nobel de química no ano de 1997. Após este estudo inicial, a NKA foi identificada em eritrócitos humanos (Post et al., 1960), no cérebro (Tanaka e Strickland, 1965) e nos rins (Banerjee et al., 1970; Kyte et al., 1971) de diferentes espécies animais. Funcionalmente, a NKA se caracteriza por ser uma enzima eletrogênica, dependente de ATP, e que tem função moduladora do transporte de três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e a entrada de dois íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular.

A NKA é uma proteína oligomérica constituída de quantidades estequiométricas de dois polipeptídeos, as denominadas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é um polipeptídeo com 10 domínios transmembrânicos, os quais contém os dois sítios para ligação dos íons  $K^+$ , três sítios para os íons  $Na^+$  e um sítio para o ATP na superfície intracelular. Além disso, observa-se um sítio voltado para o meio extracelular para ligação de glicosídeos cardiotônicos (Revisão em Kinoshita et al., 2016). Ainda, a subunidade  $\alpha$  apresenta quatro isoformas caracterizadas ( $\alpha 1$ , 2, 3 e 4). A isoenzima  $\alpha 1$  tem um amplo espectro de expressão, enquanto a isoforma  $\alpha 4$  é restrita aos testículos (Shamraj & Lingrel, 1994; McDermott et al., 2015). Em relação à isoforma  $\alpha 2$ , sua expressão se observa notadamente em adipócitos, músculos, coração e cérebro, enquanto a isoforma  $\alpha 3$  é encontrada no SNC (Lytton, 1985; Sweadner et al., 1987; Urayama et al., 1989; Azuma et al., 1991). Ainda, no SNC, a isoforma  $\alpha 3$  é encontrada predominante em neurônios, e a isoenzima  $\alpha 2$  está principalmente nas células da glia (McGrail et al., 1991). Em relação à subunidade  $\beta$ , são descritas três isoformas ( $\beta 1$ , 2 e 3), com perfil de distribuição também tecido-específica, sua função se relaciona à fixação adequada da subunidade  $\alpha$  à membrana, sendo portanto essencial para a atividade funcional da enzima (Blanco et al., 1994). Um terceiro componente da NKA é a protômero  $\alpha\beta$ , anteriormente denominado subunidade  $\gamma$ , que embora possa reduzir a afinidade desta enzima por cátions, não é essencial para a atividade da NKA (Revisão em Geering, 2008; Kinoshita et al., 2016).

Alterações na atividade da NKA estão relacionadas a diferentes patologias entre elas destacam-se a insuficiência cardíaca, onde ocorre redução de 30 à 40% nos níveis das isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  no ventrículo esquerdo (Schwinger et al., 1999). Além disso, outro estudo demonstrou redução de 50% dos níveis de RNA transcritos que codificam  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  nos ventrículos direito e esquerdo (Borlak e Thum, 2003). Jimenez e colaboradores (2011), observaram que ratos machos nocautes para a isoforma  $\alpha 4$  são estéreis e que seus espermatozoides não fertilizam óvulos *in vitro* (Jimenez et al., 2011). No sistema nervoso central, mutações no gene *ATP1A2*, associado a isoforma  $\alpha 2$ , podem resultar em desenvolvimento de quadros de enxaqueca familiar hemiplégica, enquanto mutações no gene *ATP1A3*, relacionado a  $\alpha 3$ , podem se associar a distonia-parkinsonismo de início rápido e hemiplegia alternante na infância. Ainda pode ocorrer ataxia cerebelar, arreflexia

e síndrome da perda auditiva neurossensorial, entre outras (Revisão em Kinoshita et al., 2016).

A função sinalizadora da NKA está relacionada com a indução da neuroinflamação e tem sido investigada pelo nosso grupo. De fato, Kinoshita e colaboradores (2013) demonstraram que a ouabaína (OUA) (1,8 ug/kg) previne os efeitos inflamatórios decorrentes do LPS (200 µg/kg, i.p.) reduzindo os níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias tais como a iNOS e IL-1β no hipocampo, e mantendo os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro. Os autores sugeriram que este efeito estaria provavelmente associado à cascata de sinalização da NKA, tendo em vista a função moduladora da OUA sobre a atividade da NKA. Em outro estudo também realizado pelo grupo, Vasconcelos e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de LPS (1 mg/kg) reduz a atividade total da NKA no hipocampo de ratos, e que tal redução é modulada especificamente pela redução na atividade das isoformas α2,3. De interesse, esses autores mostraram que a dieta intermitente, ao longo de 30 dias, reverte a redução da atividade das isoenzimas α2,3 da NKA e do GMP cíclico decorrentes do LPS, tendo como consequência a prevenção de danos no hipocampo causados pela neuroinflamação (Vasconcelos et al., 2015). Além disso, em outro estudo, Kinoshita e colaboradores (2017) demonstraram que a OUA (10uM) foi capaz de bloquear a ativação do NF-kB induzida pelo LPS (1 ug/ml) em culturas primárias de células gliais, reforçando assim a percepção do efeito anti-inflamatório da OUA. Ainda, foi demonstrado que o silenciamento da isoforma α2 de astrócitos reduziu a ativação da quinase regulada por estímulo extracelular (ERK) e a liberação de TNF-α, além de modular a translocação de Rel A, e consequentemente reduzindo a atividade do NF-kB (Kinoshita et al., 2017).

No contexto do presente estudo, existem dados indicando que a atividade da NKA parece estar relacionada com a obesidade e com a ingestão de dieta rica em lipídios. De fato, Iannello e colaboradores (2007) investigaram a atividade da NKA em tecidos de camundongos *ob/ob* e de humanos obesos e demonstraram que obesidade promoveu redução da atividade da NKA nos rins e no fígado de camundongos obesos, bem como no tecido adiposo de indivíduos obesos (Iannello et al., 2007). Por outro lado, evidências experimentais indicaram aumento da expressão da isoforma α1 da NKA no córtex renal de ratos Zucker obesos, e do cotransportador sensível das tiazidas e da subunidade β do



canal de Na<sup>+</sup> epitelial. Essas tais alterações aparentemente se relacionam ao aumento na retenção de Na<sup>+</sup> pelos rins tendo como consequência o desenvolvimento da hipertensão associada à obesidade observada nesses animais (Bickel et al., 2001). Outro estudo demonstrou que animais heterozigotos para a isoforma  $\alpha 2$  da NKA desenvolvem obesidade depois da meia idade, em razão de um aumento do consumo alimentar na fase clara do ciclo claro/escuro (Kawakami et al., 2012). Ainda, os autores sugeriram que essas alterações no ganho de peso estavam relacionadas ao baixo nível de RNAm para o neuropeptídeo orexina observado em animais heterozigotos, quando comparados aos animais selvagens.

Além disso, Pratt (2009) observou que a administração de NaKtide, um peptídeo derivado da NKA com atividade inibidora da tirosina quinase Src, reduziu o estresse oxidativo e a adiposidade em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e em frutose, o interessante é que neste estudo a dieta hipercalórica aumentou os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- $\alpha$ , além dos marcadores de neurodegeneração, como a apoptose neuronal, o acúmulo de proteína Tau, enquanto observou-se redução da expressão da proteína pós-sináptica de densidade 95. Sun e colaboradores (2020) investigaram o potencial papel da isoforma  $\alpha 1$  da NKA na glicogênese e gliconeogênese hepática de camundongos obesos e diabéticos e observaram que a administração de glicosamina, um indutor de resistência à insulina, promoveu redução da atividade e da expressão da isoforma  $\alpha 1$  da NKA. Os autores observaram ainda que a perda da atividade da NKA em camundongos NKA $\alpha 1^{+/-}$  submetidos a dieta hiperlipídica se associou a maior susceptibilidade à resistência a insulina (Sun et al., 2020).

Ainda, estudos têm demonstrado uma relação entre a atividade da NKA e o estresse oxidativo, onde tanto a ativação de vias relacionadas a NKA pode ser responsável pelo aumento da produção de EROs, como o aumento de EROs podem resultar em uma modulação da atividade da NKA. A ativação da via NKA/c-Src, promovida pela ligação da OUA à NKA, é responsável pela transativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e leva à consequente ativação da via Ras-Raf-MEK-ERK (Revisão em Srikanthan et al., 2016). A ativação da Ras leva à ativação de MAPK e ao aumento de [Ca<sup>2+</sup>], o que resulta na abertura de canais de K<sup>+</sup> mitocondriais sensíveis ao ATP e geração de EROs mitocondriais. Ainda, ao ativar a c-Src, a NKA

promove a geração de superóxido derivado da NADPH oxidase (NOX) (Revisão em Srikanthan et al., 2016).

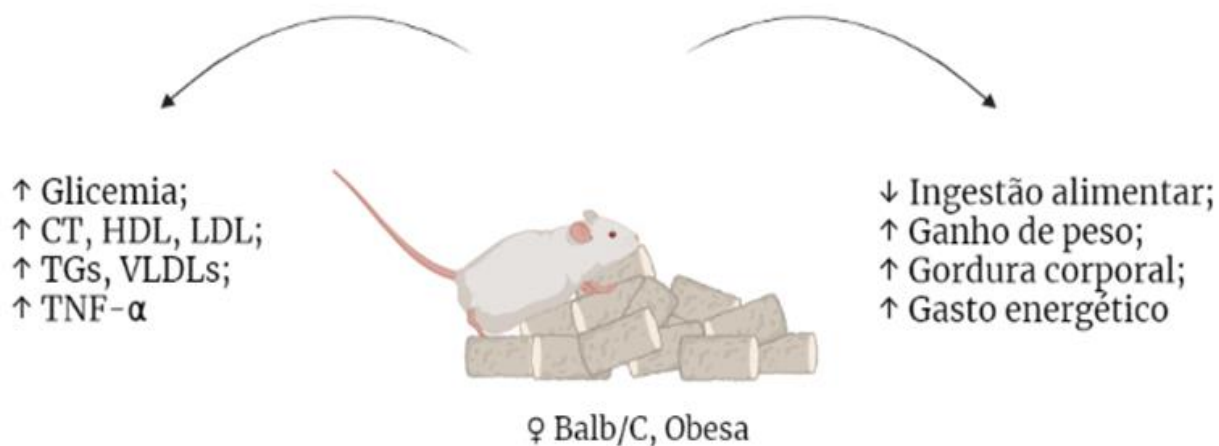
Por outro lado, o aumento da produção de EROs resulta em inibição da NKA, devido a oxidação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , assim como do protômero  $\alpha\beta$ , e aumenta a sua susceptibilidade à degradação por proteassoma e por vias proteolíticas endossomais/lisossomais (Kim e Akera, 1987; Xie et al., 1990; Thévenod e Friedmann, 1999). Ainda, foi demonstrado que o  $H_2O_2$  induzido pela glicose oxidase provoca carbonilação da subunidade  $\alpha_1$ -NKA, podendo resultar em degradação desta última e que a exposição ao 4-HNE, um produto da peroxidação lipídica, promove inibição da NKA por meio de reação irreversível com grupos sulfidril (Yan et al., 2013). Yamaguchi e colaboradores (2014) demonstraram que a exposição ao 4-HNE levou a uma redução da atividade da NKA, resultando em ruptura do sistema de tráfego de íons em fibrócitos do ligamento espiral da cóclea de camundongos.

Até o momento, poucos estudos relacionaram a obesidade em associação ao estresse oxidativo com a neuroinflamação, e em um deles foi observada que a neuroinflamação induzida por dieta estava associada a um aumento de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de ratos obesos, levando a um fenótipo tipo-depressivo (Hersey et al., 2021). Nesse contexto, uma interessante via de sinalização candidata a estudo durante esse processo é a via da  $Na,K$ -ATPase, considerando o seu papel na neuroinflamação e na plasticidade sináptica.

## 6. CONCLUSÃO

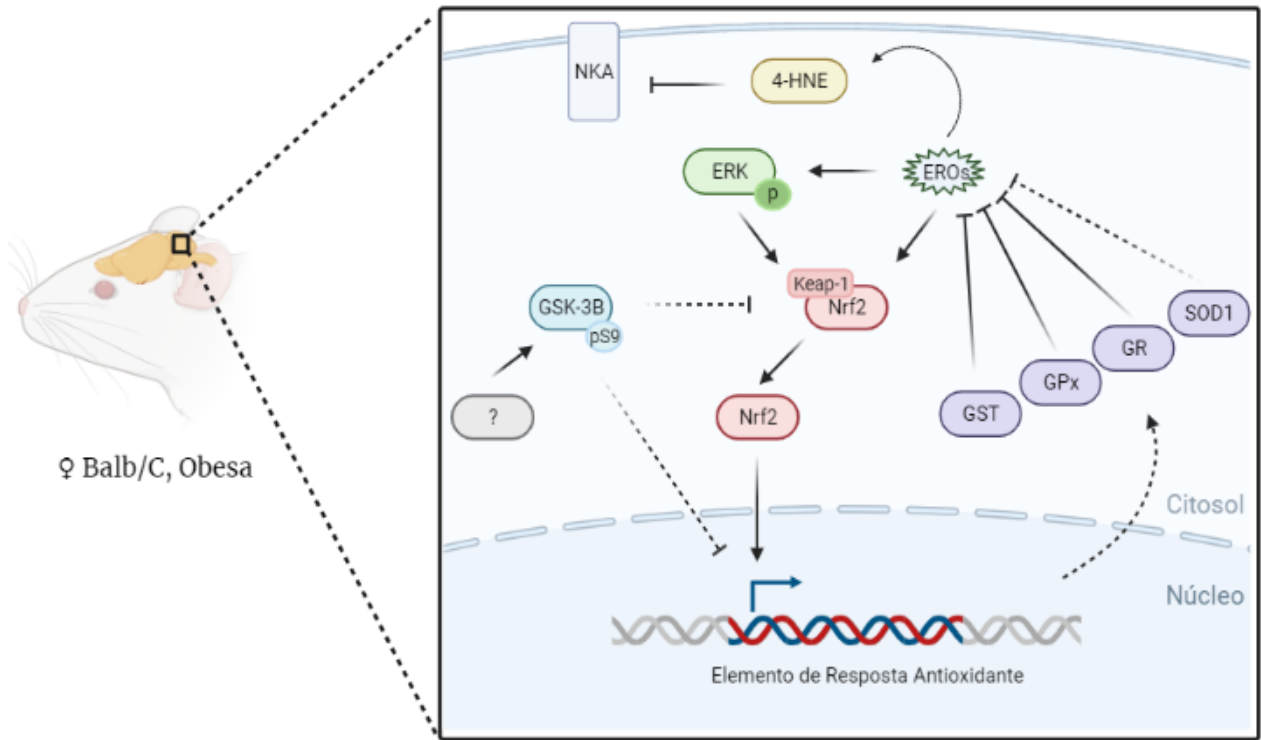
Os dados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que a obesidade leva a uma inflamação sistêmica e ao estresse oxidativo. Tais resultados podem explicar a redução da atividade da Na,K-ATPase no cerebelo de camundongos fêmeas obesas. As figuras 28 e 29 representam um resumo dos achados e o possível mecanismo envolvido na modulação da NKA, durante a obesidade.

Figura 28: Resumo dos efeitos da dieta sobre os parâmetros de análise corporal e bioquímicos séricos do estudo.



Camundongos fêmeas Balb/c, alimentadas com dieta hiperlipídica, após 10 semanas, apresentaram redução da ingestão alimentar, e aumento do ganho de peso corporal, da gordura corporal e do gasto energético. Além disso, observou-se aumento nas dosagens séricas da glicemia de jejum, do colesterol total (CT), da lipoproteína de elevada densidade (HDL), da lipoproteína de baixa densidade (LDL), dos triglicerídeos (TGs), das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Criada com *BioRender.com*.

Figura 29: Resumo dos efeitos da dieta sobre as análises realizadas no cerebelo e possível mecanismo envolvido nos resultados encontrados no estudo.



Camundongos fêmeas Balb/c, alimentadas com dieta hiperlipídica, após 10 semanas, apresentaram redução da atividade da Na,K-ATPase (NKA), especificamente das isoformas  $\alpha 2,3$ -NKA, no cerebelo. Observou-se ainda o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante da glutathiona (GST, GR e GPx) e na fosforilação da ERK 1/2, acompanhado da translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2. Além disso, verificou-se um aumento na expressão de 4-Hidroxinonenal (4-HNE), um marcador de peroxidação lipídica. Este último pode estar relacionado à redução observada na atividade da NKA. Ademais, observou-se um aumento da fosforilação inibitória da GSK-3 $\beta$ , na serina-9, o que sugere uma redução da inibição mediada por esta enzima sobre o Nrf2 citosólico e nuclear. Tais alterações aumentam a susceptibilidade do cerebelo à doenças neurodegenerativas. Criada com *BioRender.com*.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Alam, Z. I., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, D. C., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *Journal of neurochemistry*, 69(3), 1326-1329.
- Alexopoulos, N., Katritsis, D., & Raggi, P. (2014). Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 233(1), 104-112.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., & Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63(7), 895-902.
- Aoyama, K., & Nakaki, T. (2012). Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis. *International journal of molecular sciences*, 13(9), 12017-12035.
- Arnold, S. E., Lucki, I., Brookshire, B. R., Carlson, G. C., Browne, C. A., Kazi, H., ... & Kim, S. F. (2014). High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiology of disease*, 67, 79-87.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., ... & Ricquier, D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature genetics*, 26(4), 435-439.
- Azuma, K. K., Hensley, C. B., Putnam, D. S., & McDonough, A. A. (1991). Hypokalemia decreases Na (+)-K (+)-ATPase alpha 2-but not alpha 1-isoform abundance in heart, muscle, and brain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 260(5), C958-C964.

---

<sup>1</sup> De acordo com o estilo APA (*American Psychological Association*).

Banerjee, S. P., Dwosh, I. L., Khanna, V. K., & Sen, A. K. (1970). Solubilization of guinea pig kidney (Na<sup>++</sup> K<sup>+</sup>)-ATPase with Lubrol W and Triton X-100. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 211(2), 345-355.

Beltowski, J., Górný, D., & Marciniak, A. (2002). Human leptin administered intraperitoneally stimulates natriuresis and decreases renal medullary Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat-impaired effect in dietary-induced obesity. *Medical Science Monitor*, 8(6), BR221-BR229.

Bickel, C. A., Verbalis, J. G., Knepper, M. A., & Ecelbarger, C. A. (2001). Increased renal Na-K-ATPase, NCC, and  $\beta$ -ENaC abundance in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 281(4), F639-F648.

Biswas, S. K. (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Blanco, G., DeTomaso, A. W., Koster, J., Xie, Z. J., & Mercer, R. W. (1994). The alpha-subunit of the Na, K-ATPase has catalytic activity independent of the beta-subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23420-23425.

Borlak, J., & Thum, T. (2003). Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *The FASEB Journal*, 17(12), 1592-1608.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." *Methods Enzymol* 52: 302-310.

Calligaris, S. D., Lecanda, M., Solis, F., Ezquer, M., Gutierrez, J., Brandan, E., ... & Conget, P. (2013). Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PloS one*, 8(4), e60931.

Carlberg, I. N. C. E. R., & Mannervik, B. E. N. G. T. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of biological chemistry*, 250(14), 5475-5480.

Cassol, G., Cipolat, R. P., Papalia, W. L., Godinho, D. B., Quines, C. B., Nogueira, C. W., ... & Royes, L. F. F. (2022). A role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in spatial memory deficits and inflammatory/oxidative stress after recurrent concussion in adolescent rats. *Brain research bulletin*, 180, 1-11.

Cavaliere, G., Trinchese, G., Penna, E., Cimmino, F., Pirozzi, C., Lama, A., ... & Monda, M. (2019). High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13.

Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D., & Mantzoros, C. S. (2003). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1409-1421.

Chaudhary, S., & Parvez, S. (2012). An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. *Neuroscience*, 225, 258-268.

Chen, P. S., T. Y. Toribara and H. Warner (1956). "Microdetermination of Phosphorus." *Analytical Chemistry* 28(11): 1756-1758.

Cook, K. S., Min, H. Y., Johnson, D., Chaplinsky, R. J., Flier, J. S., Hunt, C. R., & Spiegelman, B. M. (1987). Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*, 237(4813), 402-405.

Coralina, C. (1983). Aninha e suas pedras. [In] Coralina, C. (ed.) Vintém de cobre: meias confissões de Aninha. Goiânia, GO: UFG.

Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2015). Today's oxidative stress markers. *Medycyna pracy*, 66(3).

Dalfó, E., Portero-Otín, M., Ayala, V., Martínez, A., Pamplona, R., & Ferrer, I. (2005). Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(9), 816-830.

Dandona, P., Ghanim, H., Chaudhuri, A., Dhindsa, S., & Kim, S. S. (2010). Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Experimental & molecular medicine*, 42(4), 245-253.

Dbaiibo, G. S., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 17762-17766.

de Freitas Silva, M., Pruccoli, L., Morroni, F., Sita, G., Seghetti, F., Viegas Jr, C., & Tarozzi, A. (2018). The Keap1/Nrf2-ARE pathway as a pharmacological target for chalcones. *Molecules*, 23(7), 1803.

Duvnjak, M., Lerotić, I., Baršić, N., Tomašić, V., Jukić, L. V., & Velagić, V. (2007). Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(34), 4539.



Elahy, M., Lam, V., Pallegage-Gamarallage, M. M., Giles, C., Mamo, J. C., & Takechi, R. (2015). Nicotine attenuates disruption of blood–brain barrier induced by saturated-fat feeding in wild-type mice. *Nicotine & Tobacco Research*, 17(12), 1436-1441.

Fagundes, L. S., Fleck, A. D. S., Zanchi, A. C., Saldiva, P. H. N., & Rhoden, C. R. (2015). Direct contact with particulate matter increases oxidative stress in different brain structures. *Inhalation toxicology*, 27(10), 462-467.

Farr, S. A., Yamada, K. A., Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Xu, L., Miller, N. E., ... & Morley, J. E. (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology*, 149(5), 2628-2636.

Feschenko, M. S., & Sweadner, K. J. (1997). Phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C at Ser18 occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17726-17733.

Fleuranceau-Morel, P., Barrier, L., Fauconneau, B., Piriou, A., & Huguet, F. (1999). Origin of 4-hydroxynonenal incubation-induced inhibition of dopamine transporter and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> adenosine triphosphate in rat striatal synaptosomes. *Neuroscience letters*, 277(2), 91-94.

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 105, 114-120.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* 226(1): 497-509.

Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature medicine*, 1(12), 1311.

Freikman, I., Amer, J., Cohen, J. S., Ringel, I., & Fibach, E. (2008). Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes—an NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(10), 2388-2394.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., ... & Shimomura, I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 114(12), 1752-1761.

Gallardo, G., Barowski, J., Ravits, J., Siddique, T., Lingrel, J. B., Robertson, J., ... & Bonni, A. (2014). An  $\alpha$ 2-Na/K ATPase/ $\alpha$ -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. *Nature neuroscience*, 17(12), 1710.

García-García, I., Michaud, A., Dadar, M., Zeighami, Y., Neseliler, S., Collins, D. L., ... & Dagher, A. (2019). Neuroanatomical differences in obesity: meta-analytic findings and their validation in an independent dataset. *International Journal of Obesity*, 43(5), 943-951.

Garcia, I. J. P., Cézar, J. S., Lemos, B. S., Silva, L. N., Ribeiro, R. I. M. D. A., Santana, C. C., ... & Barbosa, L. A. (2018). Effects of high fat diet on kidney lipid content and the Na, K-ATPase activity. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 54.

Garcia, I. J. P., Kinoshita, P. F., de Oliveira Braga, I., Parreira, G. M., Mignaco, J. A., Scavone, C., ... & de Lima Santos, H. (2018). Ouabain attenuates the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in the cerebellum of rats. *Journal of cellular biochemistry*, 119(2), 2156-2167.

Garcia, I. J. P., Kinoshita, P. F., Scavone, C., Mignaco, J. A., de Oliveira Barbosa, L. A., & de Lima Santos, H. (2015). Ouabain modulates the lipid composition of hippocampal plasma membranes from rats with LPS-induced neuroinflammation. *The Journal of Membrane Biology*, 248(6), 1191-1198.

Geering, K. (2008). Functional roles of Na, K-ATPase subunits. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 17(5), 526-532.

Gómez-Ambrosi, J., Silva, C., Galofré, J. C., Escalada, J., Santos, S., Millán, D., ... & Rotellar, F. (2012). Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *International journal of obesity*, 36(2), 286.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Haltia, L. T., Viljanen, A., Parkkola, R., Kemppainen, N., Rinne, J. O., Nuutila, P., & Kaasinen, V. (2007). Brain white matter expansion in human obesity and the recovering effect of dieting. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(8), 3278-3284.

Han, C. Y., Umemoto, T., Omer, M., Den Hartigh, L. J., Chiba, T., LeBoeuf, R., ... & Chait, A. (2012). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species increases expression of monocyte chemotactic factor genes in cultured adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10379-10393.

Hensley, K., Butterfield, D. A., Hall, N., Cole, P., Subramaniam, R., Mark, R., ... & Carney, J. M. (1996). Reactive Oxygen Species as Causal Agents in the Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease-Associated Amyloid Beta Peptide a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 786(1), 120-134.

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., ... & Butterfield, D. A. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of neurochemistry*, 65(5), 2146-2156.

Hersey, M., Woodruff, J. L., Maxwell, N., Sadek, A. T., Bykalo, M. K., Bain, I., ... & Reagan, L. P. (2021). High-fat diet induces neuroinflammation and reduces the serotonergic response to escitalopram in the hippocampus of obese rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 96, 63-72.

Higgins, J. A. and J. K. Fieldsend (1987). "Phosphatidylcholine synthesis for incorporation into membranes or for secretion as plasma lipoproteins by Golgi membranes of rat liver." *J Lipid Res* 28(3): 268-278.

Hukshorn, C. J., Lindeman, J. H., Toet, K. H., Saris, W. H., Eilers, P. H., Westerterp-Plantenga, M. S., & Kooistra, T. (2004). Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(4), 1773-1778.

Iannello, S., Milazzo, P., & Belfiore, F. (2007). Animal and human tissue Na, K-ATPase in obesity and diabetes: a new proposed enzyme regulation. *The American journal of the medical sciences*, 333(1), 1-9.

Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*, 11(1), 11-18.

Jaeschke, A., & Davis, R. J. (2007). Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Molecular cell*, 27(3), 498-508.

Jaganjac, M., Milkovic, L., Gegotek, A., Cindric, M., Zarkovic, K., Skrzydlewska, E., & Zarkovic, N. (2019). The relevance of pathophysiological alterations in redox signaling of 4-hydroxynonenal for pharmacological therapies of major stress-associated diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 157, 128-153.

Jais, A., Solas, M., Backes, H., Chaurasia, B., Kleinridders, A., Theurich, S., ... & Alber, J. (2016). Myeloid-cell-derived VEGF maintains brain glucose uptake and limits cognitive impairment in obesity. *Cell*, 165(4), 882-895.

Jimenez, T., McDermott, J. P., Sánchez, G., & Blanco, G. (2011). Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform is essential for sperm fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 644-649.

Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative stress in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, 19(11), 1-11.

Kawakami, K., Onaka, T., Iwase, M., Homma, I., & Ikeda, K. (2005). Hyperphagia and Obesity in Na, K-ATPase  $\alpha 2$  Subunit-Defective Mice. *Obesity research*, 13(10), 1661-1671.

Kawamoto, E. M., Munhoz, C. D., Lepsch, L. B., de Sá Lima, L., Glezer, I., Markus, R. P., ... & Scavone, C. (2008). Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na, K-ATPase activity. *Neurobiology of aging*, 29(11), 1712-1720.

Khan, N. I., Naz, L., & Yasmeen, G. (2006). Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(1), 62-65.

Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Fukazawa, Y., & Kishioka, S. (2009). Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochemical and biophysical research communications*, 384(3), 311-315.

Kim, M. S., & Akera, T. (1987). O<sub>2</sub> free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 252(2), H252-H257.

Kinoshita, P. F., Leite, J. A., Orellana, A. M. M., Vasconcelos, A. R., Quintas, L. E., Kawamoto, E. M., & Scavone, C. (2016). The influence of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on glutamate signaling in neurodegenerative diseases and senescence. *Frontiers in physiology*, 7, 195.

Kinoshita, P. F., Yshii, L. M., Vasconcelos, A. R., Orellana, A. M. M., de Sá Lima, L., Davel, A. P. C., ... & Scavone, C. (2014). Signaling function of Na, K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. *Journal of neuroinflammation*, 11(1), 218.

Könner, A. C., & Brüning, J. C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(1), 16-23.

Kyte, J. (1971). Purification of the sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *Journal of Biological Chemistry*, 246(13), 4157-4165.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lavrovsky, Y., Chatterjee, B., Clark, R. A., & Roy, A. K. (2000). Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Experimental gerontology*, 35(5), 521-532.

Lee, H., Lee, Y. J., Choi, H., Ko, E. H., & Kim, J. W. (2009). Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10601-10609.

Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H., & Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 16683-16689.

Lehr, S., Hartwig, S., & Sell, H. (2012). Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 6(1-2), 91-101.

Leipnitz, G., Amaral, A. U., Zanatta, Â., Seminotti, B., Fernandes, C. G., Knebel, L. A., ... & Wajner, M. (2010). Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. *Life sciences*, 87(9-10), 275-280.

Liu, J., Tian, J., Chaudhry, M., Maxwell, K., Yan, Y., Wang, X., ... & El-Hamdani, A. (2016). Attenuation of Na/K-ATPase mediated oxidant amplification with pNaKtide ameliorates experimental uremic cardiomyopathy. *Scientific reports*, 6, 34592.

Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., & Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45(8), 1594-1601.

Lytton, J. (1985). Insulin affects the sodium affinity of the rat adipocyte (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 260(18), 10075-10080.

Mao, L., Hochstetter, D., Yao, L., Zhao, Y., Zhou, J., Wang, Y., & Xu, P. (2019). Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) Attenuates Neuroinflammation in Palmitic Acid-Stimulated BV-2 Microglia and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 5081.

Marcaida, G., Kosenko, E., Miñana, M. D., Grisolia, S., & Felipo, V. (1996). Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. *Journal of neurochemistry*, 66(1), 99-104.

McDermott, J., Sánchez, G., Nangia, A. K., & Blanco, G. (2015). Role of human Na, K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. *Molecular reproduction and development*, 82(3), 167-181.

Mcgrail, K. M., Phillips, J. M., & Sweadner, K. J. (1991). Immunofluorescent localization of three Na, K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na, K-ATPase. *Journal of Neuroscience*, 11(2), 381-391.

Mohan, S., Tiwari, M. N., Biala, Y., & Yaari, Y. (2019). Regulation of neuronal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by specific protein kinases and protein phosphatases. *Journal of Neuroscience*, 39(28), 5440-5451.

Montgomery, M. K., Hallahan, N. L., Brown, S. H., Liu, M., Mitchell, T. W., Cooney, G. J., & Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56(5), 1129-1139.

Mueller, K., Sacher, J., Arelin, K., Holiga, Š., Kratzsch, J., Villringer, A., & Schroeter, M. L. (2012). Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Translational psychiatry*, 2(12), e200-e200.

Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Portero-Otín, M., Barja, G., & Pamplona, R. (2013). Membrane lipid unsaturation as physiological adaptation to animal longevity. *Frontiers in physiology*, 4, 372.

Nijhawan, P., Arora, S., & Behl, T. (2019). Intricate role of oxidative stress in the progression of obesity. *Obesity Medicine*, 15, 100125.



- Nishikawa, S., Yasoshima, A., Doi, K., Nakayama, H., & Uetsuka, K. (2007). Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Experimental animals*, 56(4), 263-272.
- Ogata, S., Ito, S., Masuda, T., & Ohtsuki, S. (2019). Changes of Blood-Brain Barrier and Brain Parenchymal Protein Expression Levels of Mice under Different Insulin-Resistance Conditions Induced by High-Fat Diet. *Pharmaceutical research*, 36(10), 141.
- Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 461(7263), 537-541.
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(10), 1249-1262.
- Pan, H., Guo, J., & Su, Z. (2014). Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiology & behavior*, 130, 157-169.
- Panariello, F., Polsinelli, G., Borlido, C., Monda, M., & De Luca, V. (2012). The role of leptin in antipsychotic-induced weight gain: genetic and non-genetic factors. *Journal of obesity*, 2012.
- Pannacciulli, N., Del Parigi, A., Chen, K., Le, D. S. N., Reiman, E. M., & Tataranni, P. A. (2006). Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study. *Neuroimage*, 31(4), 1419-1425.
- Papageorgiou, I., Astrakas, L. G., Xydis, V., Alexiou, G. A., Bargiotas, P., Tzarouchi, L., ... & Argyropoulou, M. I. (2017). Abnormalities of brain neural circuits related to obesity: a diffusion tensor imaging study. *Magnetic resonance imaging*, 37, 116-121.

Pinheiro, I. R. R., Melo, M. F. N., de Sousa, S. V., Cardoso, B. G., da Silva, T. M., Rangel, L. P., ... & Barbosa, L. A. (2019). Evaluation of the effect of cafeteria diet on the kidney Na, K-ATPase activity, and oxidative stress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(11), 19052-19063.

Post, R. L., Merritt, C. R., Kinsolving, C. R., and Albright, C. D. (1960). Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 235, 1796–1802.

Pratt, R. D. (2019). NaKtide Targeted to Adipocytes Ameliorates Western Diet Induced Obesity. *Theses, Dissertations and Capstones*. 1207.

Qi, Y., Nie, Z., Lee, Y. S., Singhal, N. S., Scherer, P. E., Lazar, M. A., & Ahima, R. S. (2006). Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes*, 55(11), 3083-3090.

Rackova L. Cholesterol load of microglia: contribution of membrane architecture changes to neurotoxic power? *Arch Biochem Biophys*. 2013;537(1):91-103.

Renaud, C. O., Ziros, P. G., Chartoumpakis, D. V., Bongiovanni, M., & Sykiotis, G. P. (2019). Keap1/Nrf2 signaling: a new player in thyroid pathophysiology and thyroid cancer. *Frontiers in endocrinology*, 10, 510.

Roberts, N. W., González-Vega, M., Berhanu, T. K., Mull, A., García, J., & Heydemann, A. (2015). Successful metabolic adaptations leading to the prevention of high fat diet-induced murine cardiac remodeling. *Cardiovascular diabetology*, 14(1), 127.

Rong, Y., & Baudry, M. (1996). Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor- $\kappa$ B in adult but not juvenile rat limbic structures. *Journal of neurochemistry*, 67(2), 662-668.

Rothman, Kenneth J. BMI-related errors in the measurement of obesity. *International journal of obesity*, v. 32, n. S3, p. S56, 2008.

Santos-Alvarez, J., Goberna, R., & Sánchez-Margalet, V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cellular immunology*, 194(1), 6-11.

Scavone, C., Munhoz, C. D., Kawamoto, E. M., Glezer, I., de Sá Lima, L., Marcourakis, T., & Markus, R. P. (2005). Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na, K-ATPase activity. *Neurobiology of aging*, 26(6), 907-916.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, 26(7), 1749-1760.

Schwinger, R. H., Wang, J., Frank, K., Müller-Ehmsen, J., Brixius, K., McDonough, A. A., & Erdmann, E. (1999). Reduced sodium pump  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ , and  $\beta 1$ -isoform protein levels and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity but unchanged Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation*, 99(16), 2105-2112.

Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158-167.

Serra, D., Mera, P., Malandrino, M. I., Mir, J. F., & Herrero, L. (2013). Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxidants & redox signaling*, 19(3), 269-284.

Shamraj, O. I., & Lingrel, J. B. (1994). A putative fourth Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12952-12956.

Sies, H (Ed.). Oxidative Stress. *Academic Press*, London, 1985, pp. 1–507.

Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183.

Silswal, N., Singh, A. K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S., & Ehtesham, N. Z. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12 in macrophages by NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1092-1101.

Singh, U., & Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13(3), 129-142.

Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et biophysica acta*, 23, 394-401.

Snodgrass, R. G., Huang, S., Choi, I. W., Rutledge, J. C., & Hwang, D. H. (2013). Inflammasome-mediated secretion of IL-1 $\beta$  in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *The Journal of Immunology*, 191(8), 4337-4347.

Sodhi, K., Maxwell, K., Yan, Y., Liu, J., Chaudhry, M. A., Getty, M., ... & Shapiro, J. I. (2015). pNaKtide inhibits Na/K-ATPase reactive oxygen species amplification and attenuates adipogenesis. *Science advances*, 1(9), e1500781.

Srikanthan, K., Shapiro, J. I., & Sodhi, K. (2016). The role of Na/K-ATPase signaling in oxidative stress related to obesity and cardiovascular disease. *Molecules*, 21(9), 1172.

Sun, H. J., Cao, L., Zhu, M. Y., Wu, Z. Y., Shen, C. Y., Nie, X. W., & Bian, J. S. (2020). DR-region of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a target to ameliorate hepatic insulin resistance in obese diabetic mice. *Theranostics*, 10(14), 6149.

Svennerholm L (1957). Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta* 24:604–611

Sweadner, K. J., & Farshi, S. K. (1987). Rat cardiac ventricle has two Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPases with different affinities for ouabain: developmental changes in immunologically different catalytic subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8404-8407.

Sweeney, G., Niu, W., Kanani, R., & Klip, A. (2000). Regulation of the Na, K-pump by leptin in 3T3-L1 fibroblasts. *Endocrinology*, 141(3), 1277-1280.

Tanaka, R., & Strickland, K. P. (1965). Role of phospholipid in the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase of beef brain. *Archives of biochemistry and biophysics*, 111(3), 583-592.

Tapella, L., Soda, T., Mapelli, L., Bortolotto, V., Bondi, H., Ruffinatti, F. A., ... & Lim, D. (2020). Deletion of calcineurin from GFAP-expressing astrocytes impairs excitability of cerebellar and hippocampal neurons through astroglial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. *Glia*, 68(3), 543-560.

Tereshin, E. V. (2007). A role of fatty acids in the development of oxidative stress in aging. A hypothesis. *Advances in Gerontology= Uspekhi Gerontologii*, 20(1), 59-65.

Thévenod, F., & Friedmann, J. M. (1999). Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *The FASEB Journal*, 13(13), 1751-1761.

Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., & Chandel, N. S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell metabolism*, 14(4), 537-544.

Trindade, P., Loiola, E. C., Gasparotto, J., Ribeiro, C. T., Cardozo, P. L., Devalle, S., ... & Ventura, A. L. M. (2019). Short and long TNF-alpha exposure recapitulates canonical astrogliosis events in human induced pluripotent stem cells-derived astrocytes. *BioRxiv*, 722017.

Urayama, O., Shutt, H., & Sweadner, K. J. (1989). Identification of three isozyme proteins of the catalytic subunit of the Na, K-ATPase in rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 8271-8280.

van Meer, G., & Lisman, Q. (2002). Sphingolipid transport: rafts and translocators. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25855-25858.

Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 112-124.

Vance, D. E., & Vance, J. E. (Eds.). (1996). Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. *Elsevier*.

Vasconcelos, A. R., Kinoshita, P. F., Yshii, L. M., Orellana, A. M. M., Böhmer, A. E., de Sá Lima, L., ... & Kawamoto, E. M. (2015). Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na, K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Neurobiology of aging*, 36(5), 1914-1923.

Wang, B., & Trayhurn, P. (2006). Acute and prolonged effects of TNF- $\alpha$  on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflügers Archiv*, 452(4), 418-427.

Wang, L., Xu, F., Zhang, X. J., Jin, R. M., & Li, X. (2015). Effect of high-fat diet on cholesterol metabolism in rats and its association with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase/Src/pERK signaling pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 35(4), 490-494.

Wang, Y., Ye, Q., Liu, C., Xie, J. X., Yan, Y., Lai, F., ... & Xie, Z. (2014). Involvement of Na/K-ATPase in hydrogen peroxide-induced activation of the Src/ERK pathway in LLC-PK1 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 415-426.

Ward, M. A., Carlsson, C. M., Trivedi, M. A., Sager, M. A., & Johnson, S. C. (2005). The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC neurology*, 5(1), 23.

West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... & Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 472(7344), 476-480.

Xie, Z., JackHays, M., Wang, Y., Periyasamy, S. M., Blanco, G., Huang, W. H., & Askari, A. (1995). Different oxidant sensitivities of the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 isoforms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expressed in baculovirus-infected insect cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 207(1), 155-159.

Yamaguchi, T., Nagashima, R., Yoneyama, M., Shiba, T., & Ogita, K. (2014). Disruption of ion-trafficking system in the cochlear spiral ligament prior to permanent hearing loss induced by exposure to intense noise: possible involvement of 4-hydroxy-2-nonenal as a mediator of oxidative stress. *PLoS One*, 9(7), e102133.

Yan, Y., Shapiro, A. P., Haller, S., Katragadda, V., Liu, L., Tian, J., ... & Shapiro, J. I. (2013). Involvement of reactive oxygen species in a feed-forward mechanism of Na/K-ATPase-mediated signaling transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 34249-34258.

Yeagle, P. (1993). *The membranes of cells*, Academic Press. San Diego, CA.

Yeo, H. C., Helbock, H. J., Chyu, D. W., & Ames, B. N. (1994). Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 220(2), 391-396.

Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., ... & Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 103(13), 4952-4957.

Zaid, M., Ameer, F., Ali, A., Shoukat, Z., Rashid, R., Iqbal, I., & Zaidi, N. (2018). Comparing the metabolic fates of BALB/c mice maintained on cafeteria-style diets with differential nutritive values. *bioRxiv*, 391821.