

**MARINA MINTO CARARO**

**SINALIZAÇÃO VIA RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO E MODULAÇÃO DA  
NA<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPASE EM CAMUNDONGOS HIPOMÓRFICOS PARA *KLOTHO*: EFEITOS  
EM HIPOCAMPO E CEREBELO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2017

## RESUMO

CARARO, M. M. **Sinalização via receptor N-Metil-D-Aspartato e modulação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em camundongos hipomórficos para *klotho***: efeitos em hipocampo e cerebelo. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Alterações na via do receptor N-metil-D-aspartato(NMDAR) marcam o processo de envelhecimento bem como as doenças neurodegenerativas. Um dos efeitos da via do NMDAR é a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e a produção GMP cíclico (GMPc), resultando em diversos efeitos celulares dentre eles a modulação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, a qual também tem sua função alterada durante o envelhecimento e doenças neurodegenerativas. A proteína  $\alpha$ Klotho tem função anti-envelhecimento, e os animais com alelo hipomórfico para *klotho* ( $kl^{-/-}$ ) apresentam uma síndrome de envelhecimento precoce, caracterizada por danos periféricos e no Sistema Nervoso Central (SNC). Logo, camundongos  $kl^{-/-}$  são considerados um modelo de envelhecimento acelerado podendo fornecer informações importantes quanto aos mecanismos de danos no SNC em vigência de baixa expressão de  $\alpha$ Klotho, alteração detectada durante o envelhecimento normal e em diversas doenças neuropsiquiátricas. Tendo esses elementos em vista o objetivo deste trabalho é verificar alterações na função da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e nas vias de sinalização associadas ao glutamato (NMDAR-NOS-GMPc), com a finalidade de verificar se nesse modelo de envelhecimento envolvendo os camundongos  $kl^{-/-}$  essas vias estão modificadas. Os dados obtidos apontam para um aumento da fosforilação do NMDAR a qual é refletida no aumento de atividade da NOS em hipocampo, mas não nos níveis de GMPc, que se encontram reduzidos. Já em cerebelo um padrão diferente é observado, mostrando uma redução na fosforilação do NMDAR e na NOS, sem alterações nos níveis de GMPc. Ambas as alterações são acompanhadas por diferenças da expressão das subunidades GluN2, reforçando a importância da composição do receptor NMDA para sua atividade. Além disso observamos uma redução na atividade da  $\alpha_2/\alpha_3$ - $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cerebelo, e alterações na expressão das subunidades  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  em hipocampo e de  $\alpha_2$  cerebelo. Tais observações reforçam a participação destas vias em processos neurodegenerativos associados ao envelhecimento e a relevância do modelo  $kl^{-/-}$  para estudo de alterações no SNC.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ Klotho. Receptor NMDA. Óxido Nítrico Sintase.  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase. Envelhecimento.

## ABSTRACT

CARARO, M. M. **N-Methyl-D-Aspartate receptor signaling and modulation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in *klotho* hypomorphic mice:** effects in hippocampus and cerebellum. 2016. 75 p. Master's thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Alterations in N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR) signaling are typical features of aging process and neurodegenerative diseases. Nitric oxide synthase (NOS) activation and cyclic GMP (cGMP) generation are key events following NMDAR activation, resulting in several cellular effects, including modulation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity, which is also altered during aging and neurodegenerative diseases.  $\alpha$ Klotho protein has anti-aging function, and mice carrying hypomorph allele for *klotho* gene ( $k1^{-}$ ) display a syndrome resembling aging characterized by systemic and central nervous system (CNS) damage. Therefore,  $k1^{-}$  mice are considered an accelerated aging model, and enable understanding about important damage mechanisms in CNS due to low  $\alpha$ Klotho expression, which it is known to happen during regular aging process and in many neuropsychiatry conditions. The aim of the present work is to verify whether alterations in  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase function and in NMDAR related signaling pathways (NMDAR-NOS-cGMP) occur in the virtual absence of  $\alpha$ Klotho protein. We intend to check the putative changes in these pathways in  $k1^{-}$  mice CNS. Present data point for an increase in NMDAR phosphorylation, reflected in a greater NOS activity, but not in cGMP levels, which in turn, are reduced. Otherwise, in cerebellum, a different situation was observed, with a decrease in NMDAR phosphorylation and NOS activity, with no changes in cGMP levels. In both situations, the alterations are followed by changes in GluN2 subunit expression, reinforcing the relevance of NMDAR composition for its functioning. Furthermore, we saw a reduction in  $\alpha_2/\alpha_3$ - $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in cerebellum, and alterations in  $\alpha_2$  and  $\alpha_3$  catalytic subunits in hippocampus and in cerebellar  $\alpha_2$ . These observations agree with these pathways participation in age related neurodegenerative process, and point out  $k1^{-}$  mice as a relevant model to study CNS damage.

**Keywords:**  $\alpha$ Klotho. NMDA receptor. Nitric Oxide Sintase. Na,K-ATPase. Aging.

## 1 INTRODUÇÃO

A proteína  $\alpha$ Klotho tem despertado crescente interesse devido às suas funções anti-envelhecimento inclusive no sistema nervoso central (SNC) (KUROSU et al., 2005). O envelhecimento pode ser definido como a deterioração das funções fisiológicas necessárias para a sobrevivência e reprodução. Essa deterioração é consequência de uma acumulação progressiva de alterações humorais, endócrinas e neurais relacionadas com a idade e que são responsáveis pelo aumento da susceptibilidade para doenças que atingem o organismo (HARMAN, 1992; YU, 1996). A natureza do envelhecimento é objeto de muita especulação, sendo que existem inúmeras evidências que indicam que a soma dos efeitos deletérios induzidos pelos radicais livres nas células e tecidos criam as condições para o seu desencadeamento, ou são os maiores responsáveis pelo processo de senescência (BALABAN et al., 2005; HARMAN, 1981).

Hoje sabe-se que muitos fatores estão relacionados ao processo de envelhecimento, tais como alterações na sinalização inflamatória (FRANCESCHI et al., 2007), estresse ambiental (CHINTA et al., 2013), estresse crônico (SAPOLSKY et al., 1986), mutações gênicas (ARKING et al., 2002), alterações no processo de síntese e degradação proteica e alterações metabólicas (TAYLOR; DILLIN, 2011). Portanto, sendo o envelhecimento um processo multifatorial, se torna difícil estabelecer uma relação de causa e consequência entre todos esses fatores, e como eles se relacionam com as doenças típicas de indivíduos idosos. Em vista disso, há um grande interesse em compreender as alterações bioquímicas que ocasionam patologias relacionadas ao envelhecimento, e sendo as doenças neurodegenerativas e demências um dos problemas que mais acometem idosos e que ocasionam uma enorme diminuição na qualidade de vida (AGÜERO-TORRES et al., 1998), é de suma importância a caracterização desses fenômenos no SNC.

Uma das vias que frequentemente está alterada em processos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos associados ao envelhecimento, é a sinalização do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) (revisado em MATTSON, 2008)(Quadro 1), que dentre inúmeros efeitos modula a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Figura 1), ponto importante na manutenção do funcionamento adequado do SNC e também para respostas adaptativas frente a estímulos estressores.

### **1.1 A sinalização via NMDAR**

O glutamato tem função de neurotransmissor excitatório, podendo agir em receptores metabotrópicos ou ionotrópicos, que podem ser do tipo AMPAR (Receptor  $\alpha$ -Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiônico), cainato, e NMDAR. Os diferentes receptores, medeiam as ações deste transmissor no SNC que vão desde a participação na sinaptogênese, crescimento de neuritos, neurogênese, sobrevivência neuronal e apoptose (revisado em MATTSON, 2008). O NMDAR, permeável é aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , sendo constituído por duas subunidades GluN1, e duas GluN2 (que podem ser GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D) ou GluN3, podendo formar di-heterodímeros ou tri-heterodímeros. Cada subunidade é composta por: um domínio N-terminal, com sítio de ligação para moduladores alostéricos, como o  $\text{Zn}^{+2}$ , um domínio de ligação de agonista (glicina/serina em GluN1 e glutamato em GluN2) e um domínio C-terminal que interage com mediadores da sinalização intracelular (Figura 1) (revisado em TRAYNELIS et al., 2010).

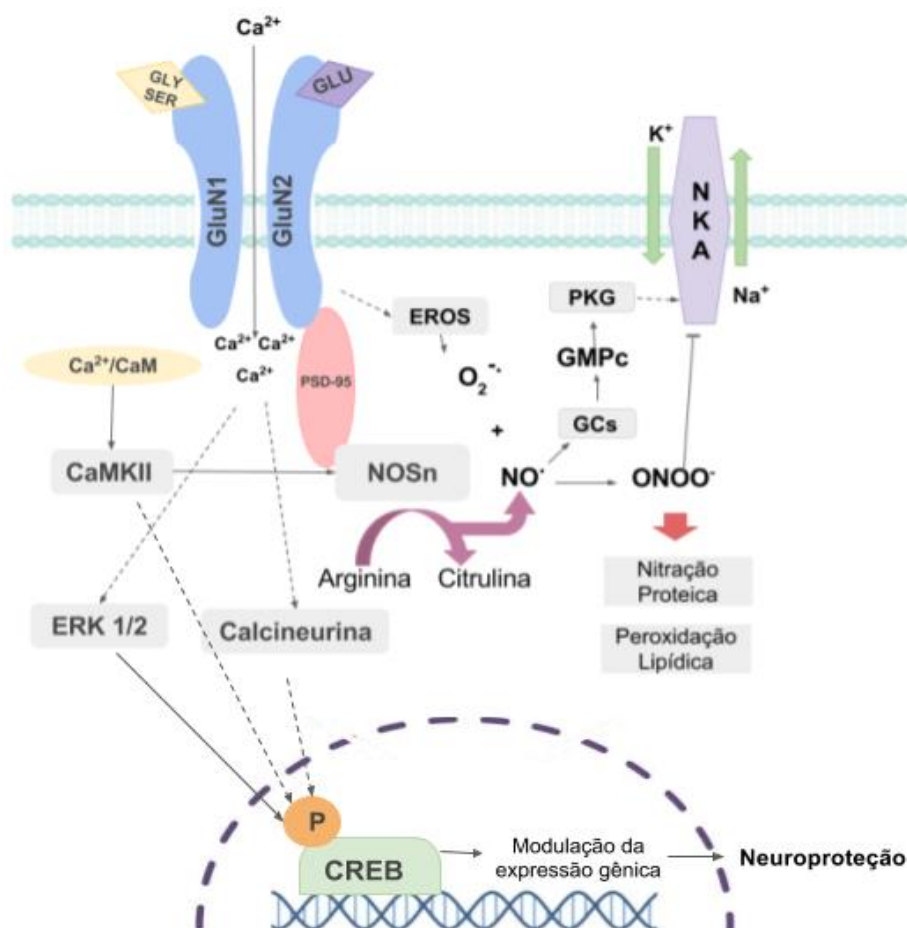
Além da presença de agonista, para que haja ativação dos NMDARs, é necessária a ocorrência de despolarização, eliminando o bloqueio dependente de voltagem ocasionado pelo  $\text{Mg}^{2+}$  (revisado em RAO ; FINKBEINER, 2007). Com a ativação dos NMDAR, vias de sinalização dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  são estimuladas culminando na fosforilação de fatores de transcrição, como CREB (proteína ligante

aos elementos responsivos ao AMPc) e NFκB (fator de transcrição nuclear kappa B), e modulação da expressão gênica (revisado em RAO; FINKBEINER, 2007) (Figura 1), pontos essenciais para ocorrência de fenômenos relacionados à plasticidade sináptica

Um dos pontos centrais da via do NMDAR é a produção de óxido nítrico (NO), cuja síntese é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) a partir da conversão de L-arginina para L-citrulina (revisado em MUNGRUE; BREDT, 2004; NATHAN, 1992). Ocorrem isoenzimas do tipo constitutiva, compreendendo as NOS endotelial (NOSe) e neuronal (NOSn), ativadas pela via  $Ca^{2+}$ -calmodulina e também há a NOS induzível (NOSi), ativada por condições inflamatórias e de estresse celular. Portanto o influxo de  $Ca^{2+}$  na célula por ativação de NMDARs leva a ativação da NOSn, aumentando a produção de NO. Apesar de ser um radical livre, o NO apresenta relativamente pequena reatividade, o que lhe confere uma imprescindível função na sinalização celular participando vários processos como a vasodilatação e a plasticidade neuronal (revisado em CALABRESE et al., 2007; DOMEK-ŁOPACINSKA; STROSZNAJDER, 2010). Tais efeitos se devem a interação com o grupo heme da guanilato ciclase solúvel (GCs, levando a sua ativação e conseqüentemente a produção de GMPc (monofosfato de guanosina cíclico), um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), levando ao relaxamento muscular, e estímulo da neurosecreção, neurotransmissão e plasticidade sináptica (MCKEE et al., 1994) (Figura 1). O NO também regula a AKT (quinase específica de serina/treonina) e o CREB, duas vias que promovem sobrevivência celular e neuroproteção (revisado em CALABRESE et al., 2007).

Contudo, apesar de sua importância fisiológica, um aumento exacerbado na produção de NO pode propiciar a sua reação com outros radicais livres provocando a nitração de proteínas, peroxidação lipídica, e danos oxidativos no DNA (Figura 1) (BROWN, 2010).

**Figura 1-** Sinalização via NMDAR e modulação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase



A ativação do NMDAR promove a modulação de diversas vias de sinalização intracelulares através do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  culminando na ativação de fatores de transcrição como o CREB. Outro efeito é produção de NO, que em situações fisiológicas, aumenta os níveis de GMPc estimulando a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Já em situações de aumento da produção de EROS, a geração de produtos reativos como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) pode reduzir a atividade enzimática da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

Outro produto da ativação dos NMDARs é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs são produzidas em condições normais pelo metabolismo mitocondrial, entretanto na vigência de estímulo da via NMDA, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasiona a ativação da NADPH oxidase (NOX), provocando um aumento na geração de radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (GIROUARD, 2009; REYNOLDS; HASTINGS, 1995). A produção controlada de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é importante na fisiologia celular, entretanto no caso de

um estímulo glutamatérgico excessivo, o aumento desenfreado de  $O_2^-$  e NO, propicia a reação destes gerando o peroxinitrito ( $ONNO^-$ ), que se decompõe rapidamente formando o radical livre hidroxila (OH) de alta toxicidade para a célula (BRENNAN et al., 2009; LIPTON et al., 1993; REGO ; OLIVEIRA, 2003).

Além disso, há dados que mostram uma redução nas enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) com a administração de agonistas de NMDARs (SZAROMA et al., 2014). Esse desequilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e a de antioxidantes implica num aumento do estresse oxidativo. Logo, em células suscetíveis, a hiperativação destes receptores gerando influxo contínuo de  $Ca^{2+}$  e aumento no estresse oxidativo, pode desencadear excitotoxicidade e morte neuronal, processos presentes em quadros neurodegenerativos (KOH et al., 1990; revisado em MATTSON; MAGNUS, 2006).

Esses múltiplos processos celulares observados com a ativação de NMDARs são modulados basicamente por um único segundo mensageiro, o  $Ca^{2+}$ . O que difere nos efeitos funcionais observados depende de fatores espaciais e temporais, os quais determinarão os complexos intracelulares que estarão associados aos receptores NMDA (revisado em HARDINGHAM; BADING, 2010). Nesse caso, um fator determinante no funcionamento do NMDAR são as subunidades que o compõe. As principais subunidades GluN2 presentes no encéfalo adulto são GluN2A e GluN2B. As proporções destas subunidades podem variar ao longo do desenvolvimento: com a maturação das sinapses, ocorre uma inversão na proporção de GluN2A/GluN2B com o aumento da expressão de GluN2A e uma redução de GluN2B (revisado em SANZ-CLEMENTE et al., 2013). Alterações também podem ocorrer durante o envelhecimento e em vigência de quadros neurodegenerativos, promovendo uma sinalização anômala (Quadro 1) (revisado em SANZ-CLEMENTE et al., 2013).



**Quadro 1-** Alterações no NMDAR em condições patológicas, frente ao uso de drogas de abuso e no envelhecimento.

<b>Condição</b>	<b>Alterações no NMDAR</b>	<b>Referências</b>
Doença de Alzheimer	Redução de GluN2B em superfície celular Ativação patológica de NMDAR extra-sinápticos	SNYDER et al., 2005; RONICKE et al., 2010
Doença de Parkinson	Redistribuição de GluN2B de sítios sinápticos para extra-sinápticos Aumento de GluN2A sináptico	DUNAH et al., 2000
Doença de Huntington	Aumento da atividade de NMDAR extra-sinápticos	GLADDING; RAYMOND, 2011
Isquemia	Aumento da atividade de NMDAR extra-sinápticos	HARDINGHAM; BADING, 2010
Esquizofrenia	Diminuição atividade do NMDAR Tráfego de GluN2A alterado	GASPAR et al., 2009
Abuso de Alcool	Redução GluN2A sináptico (exposição aguda) Aumento nas correntes via NMDAR (tratamento crônico)	SUVARNA et al., 2005 CARPENTER-HYLAND et al., 2004
Abuso de Cocaína	Maior inserção de GluN2A na membrana (exposição aguda)	BORGLAND et al., 2006
Dor Crônica	Redução de NMDARs sinápticos contendo GluN2B	VIKMAN et al., 2008
Envelhecimento	Aumento da associação GluN2B com PSD95; aumento da relação GluN2A/GluN2B (córtex frontal) Redução de GluN2B (córtex frontal; hipocampo)	ZAMZOW et al., 2013 KUEHL-KOVARIK et al., 2000; revisado em MAGNUSSON et al., 2010

Adaptado de Sanz-Clemente et al., 2013.

Mas como as diferentes subunidades GluN2 regulam a sinalização via NMDAR? Sabe-se que a via de entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  na célula é crucial para o desencadeamento da modulação de cascatas intracelulares, deste modo, as proteínas intracelulares acopladas às subunidades GluN1 e GluN2 são um ponto chave para indução da expressão gênica a partir da ativação de NMDARs (BRADLEY et al., 2006). Na densidade pós sináptica, as subunidades GluN2 estão acopladas a PSD95 (densidade pós-sináptica 95), uma proteína de ancoragem que permite a interação do receptor com outras proteínas citoplasmáticas, como a NOSn (Figura 1) (SATTLER et al., 1999). Nesse sentido, os diferentes tipos de GluN2 podem ter efeitos diferentes na modulação da sinalização intracelular, visto que as subunidades do tipo GluN2A e GluN2B tem sequências distintas nos domínios de interação com as proteínas de ancoramento (COUSINS et al., 2008; COUSINS et al., 2009). Além disso, sabe-se que a interação da subunidade GluN2B com a quinase dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina tipo II (CaMKII) é um fator fundamental para a plasticidade dependente da ativação de ERK (quinase regulada por sinais extracelulares) (GAAMOUCHE et al., 2012). Adicionalmente, as subunidades GluN2A e GluN2B conferem diferenças cinéticas ao NMDAR. Os receptores que contém GluN2A, possuem uma cinética mais rápida, com maior probabilidade de abertura e também uma desativação mais rápida (ERREGER et al., 2005; VICINI et al., 1998).

Outro ponto de modulação da sinalização do receptor NMDA é a fosforilação. A subunidade GluN1, por exemplo, pode ser fosforilada pela proteína quinase C (PKC) nas serinas 890 e 896 ou pela proteína quinase A (PKA) na serina 897, de modo que a fosforilação pela PKC é importante para a aglomeração dos receptores em regiões específicas da membrana, bem como para o aumento da taxa de abertura dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$ . Já a fosforilação pela PKA aumenta a amplitude das correntes pós sinápticas, a permeabilidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  e também apresenta relação com o

aumento do tráfego do GluN1 do complexo de Golgi para a membrana (CHEN; ROCHE, 2007; TINGLEY, 1997).

Um importante sistema regulador da sinalização glutamatérgica são proteínas transportadoras de aminoácidos excitatórios (EAATs) que captam o glutamato do meio extracelular, finalizando a sua ação sinalizadora. Existem quatro transportadores dependentes de  $\text{Na}^+$  distintos de alta afinidade para glutamato presentes em humanos e murinos: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1) e EAAT4. Os dois primeiros são encontrados em astrócitos; o EAAT3 está presente principalmente em células neuronais, enquanto o EAAT4 é encontrado preferencialmente em células de Purkinje (GEGELASHVILI; SCHOUSBOE, 1997; ROTHSTEIN et al., 1994). Apesar de seu efeito protetor captando o excesso de glutamato do meio, os EAATs podem ter sua função alterada por estímulos nocivos, de modo que as células da glia passam a liberar glutamato por esses transportadores, contribuindo para a ativação dos receptores NMDA extra-sinápticos e piora do quadro excitotóxico (ROTHSTEIN et al., 1996). Nesse quadro o funcionamento adequado da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é de fundamental importância, uma vez que esta mantém o gradiente de  $\text{Na}^+$ , além de estimular o funcionamento dos EAATs via Src quinase. Logo, os EAATs e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase são parte de um complexo macromolecular operando como uma unidade funcional na regulação da transmissão glutamatérgica (ROSE et al., 2009).

## **1.2 A enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é uma proteína de membrana, cuja função consiste em restabelecer o gradiente de  $\text{K}^+$  (aumento da concentração intracelular) e  $\text{Na}^+$  (redução da concentração intracelular), transportando três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e dois íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular. Essa ação é possibilitada pela utilização da energia proveniente da hidrólise de uma molécula de ATP. O gradiente eletroquímico produzido é indispensável para a manutenção do potencial de

membrana de muitas células, permitindo a manutenção da excitabilidade e equilíbrio osmótico celular (GLOOR, 1997). Outros sistemas de transporte ocorrem secundariamente e são dependentes do estabelecimento do gradiente de  $\text{Na}^+$  para ocorrer, como o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (SIBAROV et al., 2012).

Além de sua ação enzimática, a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase também tem participação na modulação da sinalização intracelular. Tal ação é mediada por glicosídeos cardíacos endógenos, como a ouabaína, a qual ao interagir diretamente com a proteína leva a ativação de Src (proteína tirosina quinase) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), causando alterações na transcrição gênica e efeitos tróficos significativos (AIZMAN; APERIA 2003; DESFRERE et al., 2009). Inclusive, estudos recentes no nosso laboratório mostraram que a administração intrahipocampal de ouabaína em ratos causa aumento dos níveis de RNAm de *Bdnf* (fator neurotrófico derivado do cérebro), *NOS1* (óxido nítrico sintase induzida), *Tnf* (fator de necrose tumoral) e *Bcl-2* (célula B de linfoma 2), sugerindo uma modulação de genes envolvidos na sinalização inflamatória e das neurotrofinas no SNC. Ainda, a ouabaína ativa o  $\text{NF}\kappa\text{B}$  e parte desse efeito está associado com uma interação entre a  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase e o NMDAR (KAWAMOTO et al., 2012). Corroborando esses dados, um estudo realizado em cultura de neurônios das células granulares do cerebelo de ratos, evidenciou a participação da cascata NMDAR-Src-Ras-MAPK nesse processo, sugerindo que a ouabaína pode desempenhar uma função importante na modulação de resposta adaptativa associada ao receptor NMDA no SNC (DE SÁ LIMA et al., 2013).

Quanto a estrutura desta enzima, trata-se de uma proteína oligomérica constituída da subunidade catalítica  $\alpha$  de aproximadamente 110kDa e subunidades regulatórias  $\beta$  (31,5 kDa) e  $\gamma$  (LINGREL, 1992). A subunidade  $\alpha$  é constituída por 10 domínios transmembrana, contendo na porção extracelular os sítios de ligação para  $\text{Na}^+$  e glicosídeos cardíacos, enquanto na porção intracelular ocorrem os dois sítios para a ligação dos íons  $\text{K}^+$  e um sítio para o ATP (BLANCO et al., 1994). Já a

subunidade  $\beta$  é uma glicoproteína com um único segmento transmembrana e um sítio de glicosilação o qual controla a atividade da bomba. Por fim a subunidade  $\gamma$  ou FXDY é um polipeptídeo hidrofóbico que está relacionada com a afinidade de íons  $\text{Na}^+$  pela  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e com a redução da afinidade de íons  $\text{K}^+$  extracelular, regulando a atividade enzimática e excitabilidade neuronal (GEERING, 2005).

Existem diferentes isoenzimas de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase que podem ser associadas a diferentes funções fisiológicas. A ocorrência dessas isoenzimas está associada a expressão tecido-específica das isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$  e  $\alpha_4$ ) e  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_2$  e  $\beta_3$ ) (CHOW; FORTE, 1995; JUHASZOVA; BLAUSTEIN, 1997). No SNC estão presentes as isoformas  $\alpha_1, \alpha_2$  e  $\alpha_3$ , e ainda é possível encontrar distinção quanto a expressão em diferentes tipos celulares, sendo que as células neuronais constituem a principal origem da isoforma  $\alpha_3$ , as células da glia apresentam preferencialmente a isoforma  $\alpha_2$  (HIEBER et al., 1991; SHULL et al., 1986).

A possibilidade de formar diversos complexos  $\alpha\beta$ , permite a ocorrência de isoenzima com variações funcionais, inclusive quanto à sensibilidade aos glicosídeos cardíacos (GAO et al., 2002; MOBASHERI, 2000). O tecido nervoso apresenta um padrão bem diversificado das combinações, sendo que uma célula neuronal pode apresentar uma única combinação ou múltiplas isoenzimas com combinações variadas (AZARIAS et al., 2013; MCGRAIL et al., 1991).

### **1.3 Sinalização via NMDAR e a regulação da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase durante o envelhecimento**

Modificações no microambiente celular decorrentes do processo de desenvolvimento ou regulação hormonal podem alterar o padrão de expressão das isoformas da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, bem como a sua atividade. Entre essas alterações podemos citar a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo, ambos presentes durante o envelhecimento (FRASER; ARIEFF, 2001; MAURYA;

PRAKASH, 2013; TANAKA; ANDO, 1990) e em processos patológicos, como por exemplo na Doença de Alzheimer (Quadro 1), situações caracterizadas por uma diminuição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (CHAUHAN et al., 1997; MARK et al., 1995).

O excesso de moléculas oxidantes reativas geram uma série de danos celulares como oxidação lipídica e proteica, ocasionando perda da integridade da membrana (BROWN et al., 2010). Portanto, situações que favorecem o estresse oxidativo (como o envelhecimento normal e doenças neurodegenerativas) ou o baixo suprimento energético (por exemplo, situações de hipoperfusão ou isquemia cerebral) prejudicam a função de transportadores de glicose e glutamato, assim como de transportadores iônicos dependentes de ATP (MATTSON,; MAGNUS, 2006; MARK et al., 1995; RAO et al., 2003; REGO; OLIVEIRA, 2003). Deste modo tais quadros aumentam a susceptibilidade neuronal a excitotoxicidade e morte celular, devido ao comprometimento de fatores de proteção, como o funcionamento adequado da bomba de  $\text{Na}^+$ , a qual ao reestabelecer o gradiente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  favorece a saída de cálcio via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , contrabalanceando o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (BRINES ; ROBBINS 1992; ILLARIONAVA et al., 2014).

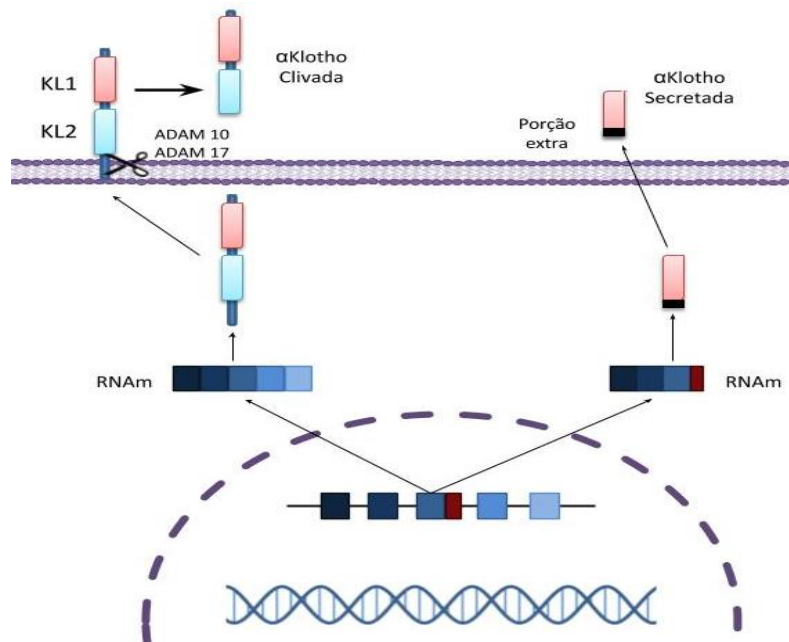
Sabe-se que o padrão de fosforilação da subunidade catalítica da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, modula sua atividade (BERTORELLO et al., 1991). Deste modo, a sinalização glutamatérgica se faz importante, pois ativa a calcineurina promovendo a desfosforilação e ativação da bomba de sódio (MARCAIDA et al., 1996). Além disso, estudos prévios do grupo têm demonstrado a participação da via  $\text{GMPc}$ -PKG, na modulação da atividade da bomba de sódio pelo glutamato (Figura 1) (MUNHOZ et al., 2005). Inicialmente essa modulação foi descrita em células de Purkinje em cerebelo (NATHANSON et al., 1995). Nesse contexto, Scavone et al., (2005) demonstrou a ocorrência de um decréscimo da atividade da isoforma  $\alpha_{2/3}$ - $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cerebelo relacionado à idade, decorrente de detrimento na sinalização da

via GMPc-PKG, implicando na ocorrência outros mecanismos envolvidos na redução do GMPc durante o envelhecimento (SCAVONE et al., 2005). Tais dados foram complementados em um estudo posterior que verificou a participação da enzima fosfatase 1 (PP-1) nesse processo, cuja atividade encontra-se aumentada no envelhecimento, provocando uma diminuição no funcionamento da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (KAWAMOTO et al., 2008).

#### **1.4 Sinalização anti-envelhecimento: a importância da proteína $\alpha$ Klotho**

O gene *klotho* codifica uma proteína transmembrana composta por 1014 aminoácidos que conta com um pequeno domínio intracelular (10 aminoácidos) e com dois domínios extracelulares (KL1 e KL2), cuja sequência apresenta homologia com  $\beta$ -glicosidases (KURO-O et al., 1997). Ocorre também a formação de uma proteína que conta apenas com o domínio KL1, a qual é produto de um *splicing* alternativo (Figura 2) (MATSUMURA et al., 1998; SHIRAKI-IIDA et al., 1998). Além disso, as formas transmembrana podem ser clivadas pelas proteases ADAM10(desintegrina A e metaloproteinase 10) e ADAM17 (desintegrina A e metaloproteinase 17)(Figura 2) e atuar como fator humoral, podendo ser detectadas na corrente sanguínea e em líquido cefalorraquidiano (CHEN et al., 2007; IMURA et al., 2004). Os principais locais de produção de  $\alpha$ Klotho detectados até então são o rim, órgãos reprodutores, e plexo-coróide (KURO-O et al., 1997; LI et al., 2004).

**Figura 2-** Formas da  $\alpha$ Klotho.



Dois tipos de RNAm podem ser obtidos a partir do gene *klotho*. A proteína composta pelas subunidades KL1 e KL2 é transportada até a membrana onde pode ser clivada e liberada no sangue ou líquido. Além disso outra forma obtida por splicing alternativo composta apenas por KL1 e uma porção extra pode ser secretada.

A função de  $\alpha$ Klotho está associada à inibição do aparecimento de fenótipos relativos ao envelhecimento. Tal descoberta foi realizada em camundongos que sofreram uma mutação insercional a qual interrompia uma região promotora, mais tarde associada ao gene da proteína  $\alpha$ Klotho. Essa inserção resulta em um alelo altamente hipomórfico, que em homozigose ( $kl^{-/-}$ ) provoca uma síndrome de envelhecimento precoce. Esses animais têm aspecto normal até 3-4 semanas, após esse período as características de envelhecimento vão surgindo, como a infertilidade, arteriosclerose, enfisema pulmonar, osteoporose, atrofia da pele e músculos, ocorrendo morte prematura em torno de 8 semanas de idade (KURO-O et al., 1997). O restabelecimento da função de  $\alpha$ Klotho nos camundongos  $kl^{-/-}$  leva a reversão do fenótipo observado, assim como a superexpressão do gene em animais normais leva



a um aumento na expectativa de vida (KUROSU et al., 2005). Deste modo, o camundongo *kl<sup>-/-</sup>* é tido como um modelo genético de envelhecimento acelerado.

Além disso, estudos em outros modelos também apontam a relevância da  $\alpha$ Klotho no envelhecimento. Em macaco *rhesus* foi observada uma diminuição da expressão dessa proteína durante o envelhecimento (KING et al., 2012). Em humanos há evidências de que a presença em heterozigose de uma variação alélica (KL-VS), a qual aumenta o índice de  $\alpha$ Klotho circulante, está associada a redução de doenças cardiovasculares, aumento na longevidade e capacidade cognitiva (ARKING et al., 2002; ARKING et al., 2005; DUBAL et al., 2014).

Dentre os principais mecanismos implicados na ação antienvhecimento da proteína  $\alpha$ Klotho estão inclusas a inibição da atividade do receptor de Insulina/IGF-1 (fator de crescimento similar à insulina), bem como a via da proteína Wnt cujas ações estão intimamente relacionadas ao processo de envelhecimento (KUROSU et al., 2005; LIU et al., 2007). Outra importante função da forma transmembrana é a ligação com receptor de FGF (fator de crescimento de fibroblasto), agindo como co-receptor obrigatório para o FGF23 e portanto interferindo negativamente na reabsorção de fosfato e biossíntese de vitamina D (KUROSU et al., 2006).

Funções da  $\alpha$ Klotho no SNC têm sido evidenciadas. Alterações como a diminuição no número de sinapses em camundongos *kl<sup>-/-</sup>* (SHIOZAKI et al., 2008) e na mielinização (CHEN et al., 2013; DUCE et al., 2008), apontam para a relevância da  $\alpha$ Klotho no encéfalo desses animais. Dados recentes mostraram a superexpressão sistêmica de  $\alpha$ Klotho como potencializadora da cognição, melhorando o desempenho de animais em testes de aprendizado e memória, além de estimular a potencialização a longo prazo, bem como aumentar a expressão sináptica da subunidade GluN2B do NMDAR (DUBAL et al., 2014).

O estresse oxidativo parece ser um fator importante nas alterações centrais descritas nos camundongos hipomórficos para *klotho*. Aumento na oxidação do DNA

e peroxidação lipídica ocorrem no hipocampo desses animais, acompanhadas de aumento dos fatores pró-apoptóticos (BAX – proteína X associada ao BCL-2), redução de proteínas anti-apoptóticas (BCL-2 e BCL-X<sub>L</sub>) e danos cognitivos (NAGAI et al., 2003).

Por fim, uma importante função da proteína  $\alpha$ Klotho quanto a homeostase do cálcio vem sendo descrita em células renais e em plexo coróide (IMURA et al., 2007). Nesse contexto, a função da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase tem sido investigada (revisado em RAZZAQUE et al., 2008; SOPJANI et al., 2011) e foi relatada que a forma transmembrana da  $\alpha$ Klotho interage com a subunidade catalítica ( $\alpha_1$ ) aumentando a quantidade desta bomba de sódio na membrana celular em resposta a uma redução na concentração do cálcio extracelular (IMURA et al., 2007).

Considerando os dados existentes quanto aos efeitos da redução drástica da  $\alpha$ Klotho no SNC, torna-se plausível pensar numa possível alteração funcional da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase relacionada a modificações na sinalização via NMDARs nos animais hipomórficos para *klotho*, e o seu papel no detrimento cognitivo observado.

## **1.5 Objetivo**

O presente trabalho tem a finalidade de averiguar se alterações na via do NMDAR e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase estão presentes nos camundongos hipomórficos para o gene *klotho* (*kl*<sup>-/-</sup>), contribuindo para compreensão de como as alterações desse modelo de envelhecimento acelerado se manifestam no SNC.

## 4 DISCUSSÃO

Uma das questões interessantes que os dados apresentados levantam é o fato de que estruturas diferentes do SNC vão responder e se adaptar de formas diferentes. Muito se discute sobre como a sinalização glutamatérgica se comporta no envelhecimento, em doenças neurodegenerativas e em situações que provocam déficits cognitivos. Existem dados que apontam para efeitos deletérios do aumento exacerbado da sinalização via NMDAR, e também de como a redução da dessa sinalização pode ser prejudicial uma vez que tantas funções neuronais dependem do funcionamento adequado desta via (revisado em MAGNUSSON et al 2010; MATTSON 2008). Neste modelo mostramos que essas alterações podem estar relacionadas a fosforilação e composição do NMDAR. Diversos trabalhos apontam para a ocorrência de alterações similares (Quadro 1) em quadros neurodegenerativos (revisado em SANZ-CLEMENTE et al., 2013), e no envelhecimento (revisado em MAGNUSSON et al., 2010).

Além da composição do NMDAR, outro ponto relevante para a sinalização é a localização dos receptores. Tais receptores podem estar presentes em regiões sinápticas (pré ou pós-sinápticas), extra-sinápticas e inclusive em células gliais. Dados apontam que NMDARs que contêm GluN2A são responsáveis por cerca de 68% da corrente sináptica, e 27% da corrente extra-sináptica, sendo que o restante é mediado por receptores com GluN2B (LIU et al., 2007). Existe uma tendência na literatura em dicotomizar os efeitos sinápticos *versus* extra-sinápticos em neuroprotetores e neurotóxicos respectivamente (HARDINGHAM et al., 2002; HARDINGHAM; BADING, 2010; MOLOKANOVA et al.,2014). Como os receptores sinápticos são em maior parte compostos por GluN2A, conseqüentemente tende-se a atribuir a estes receptores os efeitos protetores, enquanto os receptores GluN2B estariam mais associados aos efeitos excitotóxicos. Entretanto, dados mais recentes,

oferecem um cenário mais parcimonioso, no qual esses receptores teriam funções complementares, em vez de opostas (ZHOU et al., 2013; ZHOU et al., 2013a).

Devido a essa multiplicidade de respostas associadas ao NMDAR, este receptor se torna um alvo importante para promoção de neuroproteção. Deste modo várias propostas têm surgido, levando em conta os efeitos benéficos do aumento da sinalização via NMDAR para melhora cognitiva (DUBAL et al., 2014; DUBAL et al., 2015), e também de sua inibição, a fim de evitar os danos associados a excitotoxicidade (LIPTON 2007; YUAN et al., 2015). Portanto, compreender melhor as particularidades dessa sinalização e como ela se altera nas diferentes estruturas do SNC, frente a quadros patológicos, pode levar ao desenvolvimento de estratégias de intervenção cada vez mais específicas e eficazes.

#### **4.1 Sinalização via receptor NMDA em hipocampo**

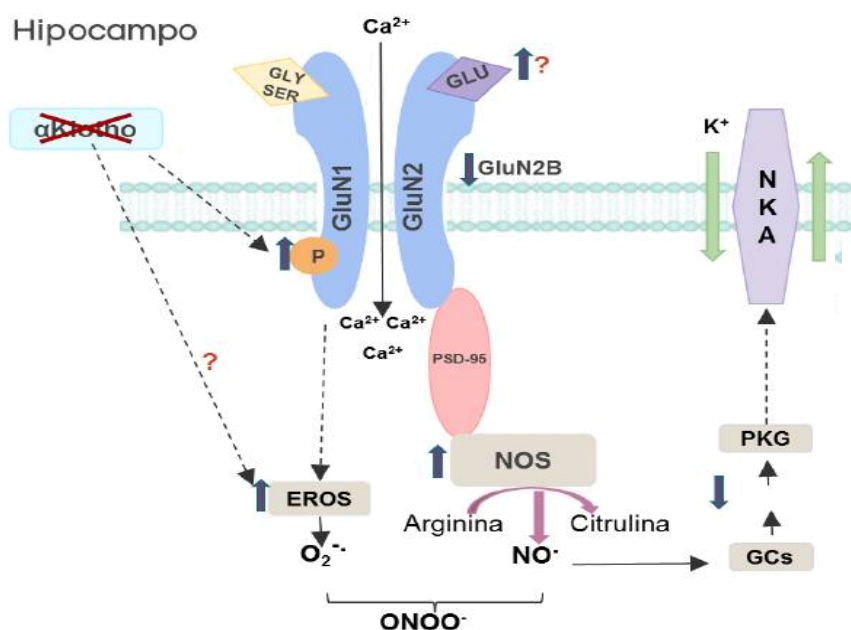
Entre parâmetros relacionados ao NMDAR, em hipocampo, encontramos diferenças significativas em relação a razão pGluN1/GluN1, a qual está aumentada no grupo de animais hipomórficos. A fosforilação na serina 897 promove um aumento na permeabilidade ao  $Ca^{+2}$ , e é realizada pela PKA, a qual é ativada por receptores metabotrópicos de glutamato gerando uma alça retroalimentação positiva na sinalização via NMDAR (AMAN et al., 2014; SKEBERDIS et al., 2006). Em relação a composição do receptor verificamos uma redução da subunidade GluN2B. Esta subunidade é indispensável para sinalização pós-sináptica, uma vez que é responsável pela sinalização via CaMKII. Existem alguns estudos que propõem modulação de vias glutamatérgicas pela proteína  $\alpha$ Klotho em hipocampo. Dubal e colaboradores, (DUBAL et al., 2015) verificaram que ao cruzar animais que expressam hAPP (proteína precursora da amilóide humana), um modelo de DA, com animais que hiperexpressam  $\alpha$ Klotho, o desenvolvimento do déficit cognitivo foi revertido, entretanto sem que ocorresse modificação nas vias relacionadas a clivagem e

acúmulo de  $\beta$ -amilóide. A explicação encontrada foi na modulação da sinalização glutamatérgica, de modo que a subunidade GluN2B e GluN1 estavam aumentadas nos animais com hAPP e que hiperexpressavam  $\alpha$ Klotho em relação ao grupo hAPP, mostrando a importância dessa proteína na sinalização glutamatérgica, seja ela direta ou indireta. Além disso, o mesmo grupo mostrou em outro trabalho uma melhora cognitiva com aumento pós-sináptico de GluN2B mediado pela hiperexpressão de  $\alpha$ Klotho mesmo em animais saudáveis (DUBAL et al., 2014). Nesse caso, o aumento da sinalização via NMDAR foi observada em regiões de densidade pós-sináptica e se mostrou protetora. Esses dados reforçam a ideia de que aumentar a sinalização via NMDAR pode promover efeitos positivos na cognição desde que associados a efeitos intracelulares neuroprotetores, como no caso do GluN2B nas densidades pós-sinápticas.

Por outro lado, quando esse aumento na sinalização via NMDAR se deve a vias excitotóxicas, o aumento da produção de EROS as quais reagem com o NO, formando compostos citotóxicos que promovem perda de função e morte celular (GIROUARD et al., 2009), estando associado a déficits cognitivos e doenças neurodegenerativas. Este é o cenário mais provável para explicar os dados nos camundongos  $kt^{-/-}$ , já que estudos prévios mostram que esses animais apresentam déficits cognitivos associados ao aumento de danos oxidativos, como oxidação lipídica e danos no DNA, além de aumento de BAX e redução de BCL-2 e BCL-X<sub>L</sub>, promovendo um perfil pró-oxidante e pró-apoptótico (NAGAI et al., 2003). Portanto um aumento na sinalização NMDAR não necessariamente implicaria num aumento na produção de GMPc, até porque, a guanilato ciclase solúvel (GCs) apresenta uma dessensibilização após estimulação repetida (BELLAMY et al., 2000). Isso explicaria porque em hipocampo observamos nos animais  $kt^{-/-}$  aumento de fosforilação de GluN1, aumento na atividade da NOS, mas em contrapartida uma redução nos níveis de GMPc (Figura 19).

Outro ponto importante em relação a sinalização glutamatérgica observado em hipocampo, foi o aumento o transportador de glutamato de astrócitos do tipo EAAT2 no animais mutados. Transportadores de glutamato são pontos-chave no controle da sinalização glutamatérgica, pois são responsáveis pela captação de glutamato, impedindo assim a ocorrência do excesso de ativação dos receptores pós-sinápticos e extra-sinápticos. Entretanto em condições de excitotoxicidade, estes transportadores podem contribuir para o agravamento do quadro, uma vez que em ambientes pró-oxidativos podem em vez de captar, promover a liberação de mais glutamato, contribuindo para a ativação de receptores extra-sinápticos e o funcionamento aberrante da via (revisado em PAL et al., 2015). Como a função dos transportadores de glutamato não depende só quantidade da proteína, mas de sua atividade, experimentos que testem a capacidade de captação de glutamato pelo tecido precisam ser realizados para atingir resultados mais conclusivos.

**Figura 19-** Alterações na via NMDAR-NOS-GMPc em hipocampo de camundongos *kl<sup>-/-</sup>*



Em hipocampo dos animais *kl<sup>-/-</sup>* foi possível observar um aumento da fosforilação da

subunidade GluN1, seguida de aumento de atividade da NOS e redução de GMPc, provavelmente devido ao aumento da produção de EROS (descrito por NAGAI et al., 2003), que deslocam a sinalização do NO.

#### **4.2 Atividade e expressão da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em hipocampo**

A modulação da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, seja na sua atividade ou expressão, já foi correlacionada a quadros patológicos, inclusive relacionados ao envelhecimento (CHAUHAN et al., 1997; MARK et al., 1995; TANAKA; ANDO, 1990). Dados de hibridização *in situ* que apontam para a redução de RNAm da subunidade  $\alpha_3$  em hipocampo de ratos de 24 meses (CHAUHAN; SIEGEL, 1996) e em córtex frontal de pacientes com Doença de Alzheimer, se comparados a indivíduos saudáveis, além disso foi observado que mesmo indivíduos idosos sem Alzheimer os níveis de  $\alpha_3$  encontravam-se reduzidos em comparação a indivíduos jovens (CHAUHAN et al., 1997). Os dados obtidos apontam para uma redução da subunidade  $\alpha_3$  em hipocampo dos animais hipomórficos para *klotho*. Deste modo se reafirma a importância da subunidade  $\alpha_3$  no contexto do surgimento das doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

Outro ponto que avaliamos em relação a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, foi a sua atividade, a qual não apresentou diferenças significativas entre os animais *kl<sup>+/+</sup>* e *kl<sup>-/-</sup>*. Como a técnica empregada para análise da atividade não permite diferenciar a atividade  $\alpha_2$  da  $\alpha_3$ , existe a possibilidade que a alteração na expressão dessas proteínas tenha impedido a observação de uma possível alteração na atividade. Dados da literatura corroboram a idéia uma redução de atividade em hipocampo durante o envelhecimento e processos patológicos. Vasconcelos e colaboradores, reportaram uma redução gradual da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em hipocampo de ratos de 18 e 24 meses, e de modo semelhante aos camundongos *kl<sup>-/-</sup>* (Figura 19), acompanhado de aumento da NOS e redução de GMPc (VASCONCELOS et al., 2015). Os efeitos

observados foram revertidos por dieta intermitente, e um dos mecanismos implicados foi a redução do estresse oxidativo. Sabe-se uma das ações importantes dos protocolos é a interferência na sinalização IGF-1 (revisado em MATTSON et al., 2016), um dos alvos reconhecidos da proteína  $\alpha$ Klotho (KUROSU et al., 2005) e ainda dados recentes apontam para a participação da proteína  $\alpha$ Klotho nos efeitos de dietas restritivas (SCHAFER et al., 2015). Tais dados reforçam a importância da investigação da relação da proteína  $\alpha$ Klotho na modulação da via NMDAR-NOS-GMPc e seu impacto na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase durante o processo de envelhecimento, e a relevância da modulação dessa via em estratégias que visem a neuroproteção.

Por fim, outra observação importante descrita na literatura é a participação da  $\alpha$ Klotho na modulação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Aparentemente, de acordo com as flutuações nos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$ , a  $\alpha$ Klotho pode promover o aumento da subunidade  $\alpha_1$  na membrana, bem como o aumento da atividade enzimática (IMURA et al., 2007; SOPJANI et al., 2011). Tais observações foram feitas em rim, paratireóide e plexo-coróide, locais de alta expressão de  $\alpha$ Klotho. Deste modo, seria interessante propor experimentos similares para averiguar se estes mecanismos estão presentes nas demais subunidades  $\alpha$ .

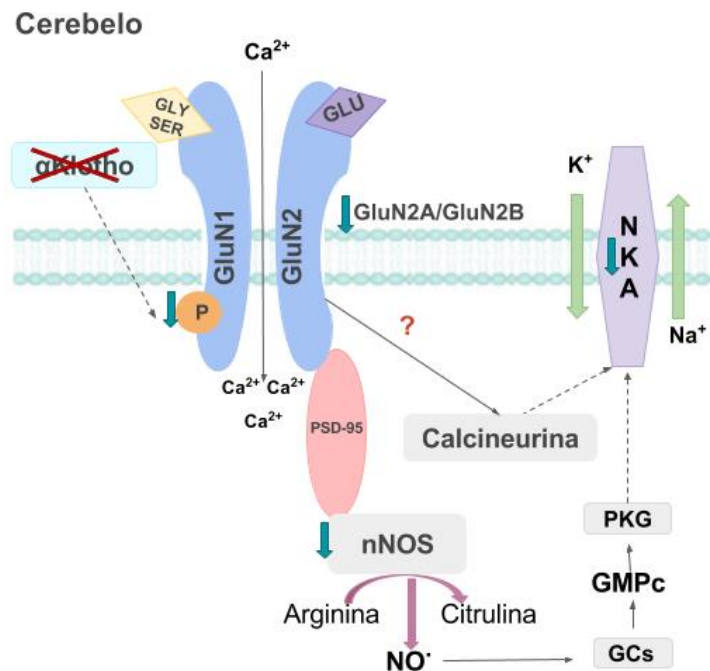
### **4.3 Sinalização via NMDAR em cerebelo**

Em cerebelo as alterações encontradas na via do NMDAR foram acompanhadas por uma redução na proporção GluN2A/GluN2B (Figura 20). Dados apontam para uma maior participação de GluN2A nas correntes sinápticas. Portanto a redução de GluN2A talvez esteja correlacionada com a redução da ativação da NOSn já que esta encontra-se ancorada a PSD-95. Por outro lado, apesar de indispensável para a função sináptica por sua interação com CaMKII (GAAMOUCHE et al., 2012), a subunidade GluN2B parece ter maior participação na sinalização extra-sináptica, e



também um efeito mais intenso na sinalização tanto protetora quanto excitotóxica (ZHOU et al., 2013), podendo estar associada aos sinais de neurodegeneração observados em cerebelo desses animais (SHIOZAKI et al., 2008). Portanto para a compreensão do significado fisiológico dessas alterações seria importante saber qual a localização subcelular desses receptores e quais complexos proteicos estão envolvidos na sinalização desses receptores. Além disso em cerebelo, outras subunidades têm participação importante na composição dos NMDAR, como a GluN2C (ROSSI et al., 2002), altamente expressa em animais adultos. Logo alterações nesta subunidade não podem ser descartadas.

**Figura 20-** Alterações na via NMDAR-NOS-GMPc e atividade da  $\alpha_2/\alpha_3\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cerebelo de camundongos  $kl^{-/-}$ .



Em cerebelo dos animais  $kl^{-/-}$  foi possível observar uma redução da fosforilação da subunidade GluN1, seguida de redução de atividade da NOS, e da  $\alpha_2/\alpha_3\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Como não foram detectadas alterações nos níveis GMPc, provavelmente outros mecanismos associados ao NMDAR, como a calcineurina podem atuar na redução encontrada.

#### 4.4 Atividade e expressão da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cerebelo

Resultados prévios do laboratório já descreveram uma redução na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em cerebelo, relacionada à modulação da via NOS-GMPc-PKG no envelhecimento (SCAVONE et al., 2005). Observamos nesta estrutura uma redução na fosforilação de GluN1 acompanhada por uma redução na NOS, porém isso não se refletiu na redução dos níveis de GMPc. Vários mecanismos adicionais controlam os níveis de GMPc, como atividade das fosfodiesterases responsáveis por sua degradação, e também o monóxido de carbono (CO), o qual também pode ativar a GCs e produzir GMPc, via que parece ser particularmente importante em células de Purkinje (NATHANSON et al., 1995). Além disso devemos considerar que não é apenas o GMPc em si que promove ativação ou inativação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Portanto para obter resultados mais conclusivos quanto a qual fator estaria causando essa redução na atividade, novos experimentos devem ser propostos considerando a atividade da PKG, a qual tem uma relação mais próxima com a fosforilação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, e também de fosfatases como a PP-1, a qual parece estar relacionada a desfosforilação da mesma (KAWAMOTO et al., 2008). Outro ponto de modulação importante da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase via NMDAR é a calcineurina, a qual promove desfosforilação da DARPP-32 que por sua vez atua inibindo a PP-1 levando a aumento de atividade da  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase (MARCAIDA et al., 1996). Deste modo vários pontos adicionais na via NMDAR poderiam justificar os dados encontrados.

#### **4.5 Expressão da subunidade $\alpha_2$ da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

Tanto em hipocampo como em cerebelo, foi observado um aumento na expressão da subunidade  $\alpha_2$ , a qual é expressa em astrócitos. Cada vez mais células da glia vem sendo implicadas em processos neurodegenerativos (revisado em HAIM et al., 2015). Alguns estudos mostram a participação da subunidade  $\alpha_2$  na resposta inflamatória em células da glia (KINOSHITA et al., no prelo), e em doenças neurodegenerativas (GALLARDO et al., 2014).

Gallardo e colaboradores, viram que em modelo de camundongos que expressam SOD1 mutante (modelo de esclerose lateral amiotrófica-ELA) e também em medula espinhal de pacientes com ELA esporádica ou familiar (com SOD1 mutada) ocorre um aumento de expressão da subunidade  $\alpha_2$ . No modelo animal foi possível constatar a associação do aumento de expressão da subunidade  $\alpha_2$  com aumento de citocinas pró-inflamatórias e a degeneração de neurônios motores, e a redução na expressão dessa proteína levando a proteção dos neurônios motores e aumento da expectativa de vida (GALLARDO et al., 2014). De modo similar, Kinoshita e colaboradores, mostraram que o silenciamento da  $\alpha_2$  reduz os efeitos pró-inflamatórios do LPS em cultura de glia, reforçando a ideia de que essa proteína participa de mecanismos pró-inflamatórios no SNC (KINOSHITA et al., no prelo).

Tendo em vista a importância da  $\alpha$ Klotho na regulação da inflamação (LIU et al., 2011) e considerando que haja um perfil pró-inflamatório em vigência da redução da proteína, a observação do aumento da subunidade  $\alpha_2$  torna-se plausível. Inclusive quando observamos um aumento no transportador de glutamato do tipo EAAT2 em hipocampo. Sabe-se que estes transportadores tendem a formar complexos multi-proteicos com a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, pois dependem da formação de gradientes de  $\text{Na}^+$  para seu funcionamento adequado (ROSE et al., 2009).

Além disso, apesar de não termos encontrado alterações nos níveis de GFAP por western blotting, não podemos descartar a possibilidade de ocorrência de aumento de reatividade dos astrócitos nesses animais, já que se trata uma alteração recorrente no envelhecimento normal, em doenças neurodegenerativas (BERNAL; PETERSON, 2011; revisado em HAIM et al., 2015), e ainda não foi descrita nos animais hipomórficos para *klotho*.

Outra possível explicação seria o fato de haver modulação diferencial das subunidades  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  já que até o momento não foi detectada a expressão de  $\alpha$ Klotho em astrócitos, onde a  $\alpha_2$  é expressa. Por outro lado neurônios expressam  $\alpha$ Klotho, o

que resultaria em respostas diferentes frente a redução dessa proteína no animal hipomórfico.

## 5 CONCLUSÕES

Em resumo, os dados obtidos mostram pela primeira vez alterações na modulação da  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, seja em sua atividade ou expressão, que poderiam estar associadas às mudanças na sinalização glutamatérgica em cerebelo e hipocampo de camundongos  $kl^{-/-}$ , reforçando a importância da proteína  $\alpha\text{Klotho}$  na modulação das vias de neuroproteção associadas a sinalização do receptor NMDA.

Além disso, temos indícios da presença de uma modulação diferencial nas estruturas analisadas, o que pode indicar respostas diferentes ao longo do envelhecimento, que podem ser determinantes para definir a susceptibilidade destas áreas para iniciar os processos neurodegenerativos ao mesmo tempo que podem exigir ações diferentes para atuar em estratégias de neuroproteção.

Por fim, o fato da proteína  $\alpha\text{Klotho}$  interferir em diversas funções fisiológicas, faz com que os camundongos  $kl^{-/-}$  apresentem danos característicos de processos multifatoriais, assim como no processo de envelhecimento normal. Por um lado essa característica do modelo dificulta a compreensão dos mecanismos descritos, tornando-se difícil inferir se as alterações observadas estão diretamente relacionadas à redução da proteína  $\alpha\text{Klotho}$  no SNC, ou se são consequência do acúmulo de danos sistêmicos. Por outro lado o modelo se mostra interessante para a observação de mecanismos de resposta frente a alterações fisiológicas complexas.

## REFERÊNCIAS\*

AGÜERO-TORRES, H. et al. Dementia is the major cause of functional dependence in the elderly: 3-year follow-up data from a population-based study. **American Journal of Public Health**, v. 88, n. 10, p. 1452-1456, 1998. ISSN 0090-0036.

AIZMAN, O.; APERIA, A. Na, K-ATPase as a Signal Transducer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, n. 1, p. 489-496, 2003. ISSN 1749-6632.

AMAN, T. K. et al. Separate intramolecular targets for protein kinase A control N-methyl-D-aspartate receptor gating and Ca<sup>2+</sup> permeability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 18805-18817, 2014. ISSN 0021-9258.

ARKING, D. E. et al. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation research**, v. 96, n. 4, p. 412-418, 2005. ISSN 0009-7330.

\_\_\_\_\_. Association of human aging with a functional variant of klotho. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 856-861, 2002. ISSN 0027-8424.

AZARIAS, G. et al. A specific and essential role for Na, K-ATPase  $\alpha 3$  in neurons co-expressing  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2734-2743, 2013. ISSN 0021-9258.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-495, 2005. ISSN 0092-8674.

BELLAMY, T. C.; GARTHWAITE, J. Pharmacology of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in cerebellar cells. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 95-103, 2002. ISSN 1476-5381.

BERNAL, G. M.; PETERSON, D. A. Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. **Aging cell**, v. 10, n. 3, p. 466-482, 2011. ISSN 1474-9726.

BERTORELLO, A. M. et al. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> (+)-

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATPase inhibits the activity of the enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 24, p. 11359-11362, 1991. ISSN 0027-8424.

BLANCO, G.; KOSTER, J. C.; MERCER, R. W. The alpha subunit of the Na, K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 18, p. 8542-8546, 1994. ISSN 0027-8424.

BORGLAND, S. L. et al. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. **Neuron**, v. 49, n. 4, p. 589-601, 2006. ISSN 0896-6273.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BRADLEY, J. et al. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. **The Journal of neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 1065-1076, 2006. ISSN 0270-6474.

BRENNAN, A. M. et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 857-863, 2009. ISSN 1097-6256.

BRINES, M. L.; ROBBINS, R. J. Inhibition of  $\alpha 2/\alpha 3$  sodium pump isoforms potentiates glutamate neurotoxicity. **Brain research**, v. 591, n. 1, p. 94-102, 1992. ISSN 0006-8993.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric oxide**, v. 23, n. 3, p. 153-165, 2010. ISSN 1089-8603.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 766-775, 2007. ISSN 1471-003X.

CARPENTER-HYLAND, E. P.; WOODWARD, J. J.; CHANDLER, L. J. Chronic ethanol induces synaptic but not extrasynaptic targeting of NMDA receptors. **The Journal of neuroscience**, v. 24, n. 36, p. 7859-7868, 2004. ISSN 0270-6474.

CHAUHAN, N.; SIEGEL, G. In Situ Analysis of Na, K-ATPase  $\alpha 1$ -and  $\alpha 3$ -Isoform mRNAs in Aging Rat Hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 4, p. 1742-1751, 1996. ISSN 1471-4159.

CHAUHAN, N. B.; LEE, J. M.; SIEGEL, G. J. Na, K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 151-166, 1997. ISSN 0895-8696.

CHEN, B.-S.; ROCHE, K. W. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 3, p. 362-368, 2007. ISSN 0028-3908.

CHEN, C.-D. et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19796-19801, 2007. ISSN 0027-8424.

\_\_\_\_\_. The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 1927-1939, 2013. ISSN 0270-6474.

CHINTA, S. J. et al. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? **Journal of internal medicine**, v. 273, n. 5, p. 429-436, 2013. ISSN 1365-2796.

CHOW, D. C.; FORTE, J. G. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, n. 1, p. 1-17, 1995. ISSN 0022-0949.

COUSINS, S.; KENNY, A.; STEPHENSON, F. Delineation of additional PSD-95 binding domains within NMDA receptor NR2 subunits reveals differences between NR2A/PSD-95 and NR2B/PSD-95 association. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 89-95, 2009. ISSN 0306-4522.

COUSINS, S. L. et al. Differential interaction of NMDA receptor subtypes with the post-synaptic density-95 family of membrane associated guanylate kinase proteins. **Journal of neurochemistry**, v. 104, n. 4, p. 903-913, 2008. ISSN 1471-4159.

DE SÁ LIMA, L. et al. Ouabain activates NFκB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 327-336, 2013. ISSN 0028-3908.

DEFRERE, L. et al. Na, K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 7, p. 2212-2217, 2009. ISSN 0027-8424.

DOMEK-ŁOPACIŃSKA, K. U.; STROSZNAJDER, J. B. Cyclic GMP and nitric oxide synthase in aging and Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 41, n. 2-3, p. 129-137, 2010. ISSN 0893-7648.

DUBAL, D. B. et al. Life extension factor klotho enhances cognition. **Cell reports**, v. 7, n. 4, p. 1065-1076, 2014. ISSN 2211-1247.

\_\_\_\_\_. Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 6, p. 2358-2371, 2015. ISSN 0270-6474.

DUCE, J. A. et al. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. **Glia**, v. 56, n. 1, p. 106-117, 2008. ISSN 1098-1136.

DUNAH, A. W. et al. Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal n-methyl-d-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 342-352, 2000. ISSN 1521-0111.

EL GAAMOUCHE, F. et al. Interaction between  $\alpha$ CaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 31, p. 10767-10779, 2012. ISSN 0270-6474.

ERREGER, K. et al. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. **The Journal of physiology**, v. 563, n. 2, p. 345-358, 2005. ISSN 1469-7793.

ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: molar and specific activity, protein determination. **Methods in enzymology**, 1988. ISSN 1079-2376.

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of ageing and development**, v. 128, n. 1, p. 92-105, 2007. ISSN 0047-6374.

FRASER, C. L.; ARIEFF, A. I. Na-K-ATPase activity decreases with aging in female rat brain synaptosomes. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 281, n. 4, p. F674-F678, 2001. ISSN 1931-857X.

GALLARDO, G. et al. An  $\alpha$ 2-Na/K ATPase/ $\alpha$ -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 12,



p. 1710-1719, 2014. ISSN 1097-6256.

GAO, J. et al. Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. **The Journal of general physiology**, v. 119, n. 4, p. 297-312, 2002. ISSN 0022-1295.

GASPAR, P. A. et al. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. **Journal of neurochemistry**, v. 111, n. 4, p. 891-900, 2009. ISSN 1471-4159.

GEERING, K. Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 37, n. 6, p. 387-392, 2005. ISSN 0145-479X.

GEGELASHVILI, G.; SCHOUSBOE, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. **Molecular Pharmacology**, v. 52, n. 1, p. 6-15, 1997. ISSN 1521-0111.

GIROUARD, H. et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 2545-2552, 2009. ISSN 0270-6474.

GLADDING, C. M.; RAYMOND, L. A. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 48, n. 4, p. 308-320, 2011. ISSN 1044-7431.

GLOOR, S. M. Relevance of Na, K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. **FEBS letters**, v. 412, n. 1, p. 1-4, 1997. ISSN 1873-3468.

HAIM, L. B. et al. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, 2015.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 682-696, 2010. ISSN 1471-003X.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 405-414, 2002.

HARMAN, D. The aging process. **Proceedings of the National Academy of**

**Sciences**, v. 78, n. 11, p. 7124-7128, 1981. ISSN 0027-8424.

\_\_\_\_\_. Free radical theory of aging. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3-6, p. 257-266, 1992. ISSN 0921-8734.

HIEBER, V. et al. Differential distribution of (Na, K)-ATPase $\alpha$  isoforms in the central nervous system. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 253-262, 1991. ISSN 0272-4340.

ILLARIONAVA, N. B. et al. Role of Na, K-ATPase  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 isoforms in the support of astrocyte glutamate uptake. **PLoS one**, v. 9, n. 6, p. e98469, 2014. ISSN 1932-6203.

IMURA, A. et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS letters**, v. 565, n. 1-3, p. 143-147, 2004. ISSN 1873-3468.

\_\_\_\_\_.  $\alpha$ -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1615-1618, 2007. ISSN 0036-8075.

JUHASZOVA, M.; BLAUSTEIN, M. P. Distinct distribution of different Na<sup>+</sup> pump  $\alpha$  subunit isoforms in plasmalemma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 834, n. 1, p. 524-536, 1997. ISSN 1749-6632.

KAWAMOTO, E. M. et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the rat hippocampus. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 1, p. 213-228, 2012. ISSN 1097-4547.

\_\_\_\_\_. Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na, K-ATPase activity. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 11, p. 1712-1720, 2008. ISSN 0197-4580.

KING, G. D.; ROSENE, D. L.; ABRAHAM, C. R. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. **Age**, v. 34, n. 6, p. 1405-1419, 2012. ISSN 0161-9152.

KINOSHITA, P.F. et al. Alpha 2 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. **Scientific Reports**. No prelo.

KOH, J.-Y.; YANG, L. L.; COTMAN, C. W.  $\beta$ -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. **Brain research**, v. 533, n. 2, p. 315-320, 1990. ISSN 0006-8993.

KUEHL-KOVARIK, M. C. et al. Electrophysiological analysis of NMDA receptor subunit changes in the aging mouse cortex. **Mechanisms of ageing and development**, v. 115, n. 1, p. 39-59, 2000. ISSN 0047-6374.

KURO-O, M. et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **nature**, v. 390, n. 6655, p. 45-51, 1997. ISSN 0028-0836.

KUROSU, H. et al. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6120-6123, 2006. ISSN 0021-9258.

\_\_\_\_\_. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829-1833, 2005. ISSN 0036-8075.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.

LI, S.-A. et al. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. **Cell structure and function**, v. 29, n. 4, p. 91-99, 2004. ISSN 0386-7196.

LINGREL, J. B. Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 24, n. 3, p. 263-270, 1992. ISSN 0145-479X.

LIPTON, S. A. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. **Current drug targets**, v. 8, n. 5, p. 621-632, 2007. ISSN 1389-4501.

LIPTON, S. A. et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. 1993.

LIU, F. et al. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. **Nature cell biology**, v. 13, n. 3, p. 254-262, 2011. ISSN 1465-7392.

LIU, H. et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803-806, 2007. ISSN 0036-8075.

LIU, Y. et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2846-2857, 2007. ISSN 0270-6474.

MAGNUSSON, K. R.; BRIM, B. L.; DAS, S. R. Selective vulnerabilities of N-methyl-D-

aspartate (NMDA) receptors during brain aging. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 2, p. 11, 2010. ISSN 1663-4365.

MARCAIDA, G. et al. 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**, v. 66, n. 1, p. 99-104, 1996. ISSN 1471-4159.

MARK, R. J. et al. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. **The Journal of neuroscience**, v. 15, n. 9, p. 6239-6249, 1995. ISSN 0270-6474.

MATSUMURA, Y. et al. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 242, n. 3, p. 626-630, 1998. ISSN 0006-291X.

MATTSON, M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, n. 1, p. 97-112, 2008. ISSN 1749-6632.

MATTSON, M. P.; LONGO, V. D.; HARVIE, M. Impact of Intermittent Fasting on Health and Disease Processes. **Ageing Research Reviews**, 2016. ISSN 1568-1637.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278-294, 2006. ISSN 1471-003X.

MAURYA, P. K.; PRAKASH, S. Decreased activity of Ca<sup>++</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase during aging in humans. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 131-137, 2013. ISSN 0273-2289.

MCGRAIL, K. M.; PHILLIPS, J. M.; SWEADNER, K. 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. **The Journal of neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 381-391, 1991. ISSN 0270-6474.

MCKEE, M.; SCAVONE, C.; NATHANSON, J. A. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 25, p. 12056-12060, 1994. ISSN 0027-8424.

MOBASHERI, A. et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience reports**, v.

20, n. 2, p. 51-91, 2000. ISSN 0144-8463.

MOLOKANOVA, E. et al. Differential effects of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors on A $\beta$ -induced nitric oxide production in cerebrocortical neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 14, p. 5023-5028, 2014. ISSN 0270-6474.

MUNGRUE, I. N.; BREDT, D. S. nNOS at a glance: implications for brain and brawn. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 13, p. 2627-2629, 2004. ISSN 0021-9533.

MUNHOZ, C. D. et al. Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. **Cell biochemistry and function**, v. 23, n. 2, p. 115-123, 2005. ISSN 1099-0844.

NAGAI, T. et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 50-52, 2003. ISSN 0892-6638.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **The FASEB journal**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992. ISSN 0892-6638.

NATHANSON, J. et al. The cellular Na<sup>+</sup> pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron**, v. 14, n. 4, p. 781-794, 1995. ISSN 0896-6273.

PÁL, B. Astrocytic actions on extrasynaptic neuronal currents. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, 2015.

RAO, S. D.; YIN, H. Z.; WEISS, J. H. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2627-2633, 2003. ISSN 0270-6474.

RAO, V. R.; FINKBEINER, S. NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 6, p. 284-291, 2007. ISSN 0166-2236.

RAZZAQUE, M. S. Klotho and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity: solving the calcium metabolism dilemma? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 2, p. 459-461, 2008. ISSN 0931-0509.

REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Neurochemical research**, v. 28, n. 10, p. 1563-1574, 2003. ISSN 0364-3190.

REYNOLDS, I. J.; HASTINGS, T. G. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 3318-3327, 1995. ISSN 0270-6474.

RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure Activity Results in a Rapid Induction of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Adult but Not Juvenile Rat Limbic Structures. **Journal of neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 662-668, 1996. ISSN 1471-4159.

ROSE, E. M. et al. Glutamate transporter coupling to Na, K-ATPase. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8143-8155, 2009. ISSN 0270-6474.

ROSSI, P. et al. NMDA receptor 2 (NR2) C-terminal control of NR open probability regulates synaptic transmission and plasticity at a cerebellar synapse. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 22, p. 9687-9697, 2002. ISSN 0270-6474.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**, v. 16, n. 3, p. 675-686, 1996. ISSN 0896-6273.

\_\_\_\_\_. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron**, v. 13, n. 3, p. 713-725, 1994. ISSN 0896-6273.

RÖNICKE, R. et al. Early neuronal dysfunction by amyloid  $\beta$  oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 12, p. 2219-2228, 2011. ISSN 0197-4580.

SANZ-CLEMENTE, A.; NICOLL, R. A.; ROCHE, K. W. Diversity in NMDA Receptor Composition Many Regulators, Many Consequences. **The Neuroscientist**, v. 19, n. 1, p. 62-75, 2013. ISSN 1073-8584.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis\*. **Endocrine reviews**, v. 7, n. 3, p. 284-301, 1986. ISSN 0163-769X.

SATTLER, R. et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science**, v. 284, n. 5421, p. 1845-1848, 1999. ISSN 0036-8075.

SCAVONE, C. et al. Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na, K-ATPase activity. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 6, p. 907-916, 2005. ISSN

0197-4580.

SCHAFER, M. J. et al. Calorie restriction suppresses age-dependent hippocampal transcriptional signatures. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0133923, 2015. ISSN 1932-6203.

SHIOZAKI, M. et al. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 924-941, 2008. ISSN 0306-4522.

SHIRAKI-IIDA, T. et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. **FEBS letters**, v. 424, n. 1-2, p. 6-10, 1998. ISSN 1873-3468.

SHULL, G. E.; GREEB, J.; LINGREL, J. B. Molecular cloning of three distinct forms of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. alpha.-subunit from rat brain. **Biochemistry**, v. 25, n. 25, p. 8125-8132, 1986. ISSN 0006-2960.

SIBAROV, D. A. et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> exchanger to prevent Ca<sup>2+</sup> overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 3, p. 596-607, 2012. ISSN 1521-0103.

SKEBERDIS, V. A. et al. Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 501-510, 2006. ISSN 1097-6256.

SNYDER, E. M. et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . **Nature neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 1051-1058, 2005. ISSN 1097-6256.

SOPJANI, M. et al. Regulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase by Klotho. **FEBS letters**, v. 585, n. 12, p. 1759-1764, 2011. ISSN 1873-3468.

SUVARNA, N. et al. Ethanol alters trafficking and functional N-methyl-D-aspartate receptor NR2 subunit ratio via H-Ras. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31450-31459, 2005. ISSN 0021-9258.

SZAROMA, W.; DZIUBEK, K.; KAPUSTA, E. Effect of N-methyl-D-aspartic acid on activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and reduced glutathione level in selected organs of the mouse. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 101, n. 3, p. 377-387, 2014. ISSN 0231-424X.

TANAKA, Y.; ANDO, S. Synaptic aging as revealed by changes in membrane potential

and decreased activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. **Brain research**, v. 506, n. 1, p. 46-52, 1990. ISSN 0006-8993.

TAYLOR, R. C.; DILLIN, A. Aging as an event of proteostasis collapse. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 5, p. a004440, 2011. ISSN 1943-0264.

TINGLEY, W. G. et al. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 5157-5166, 1997. ISSN 0021-9258.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010. ISSN 1521-0081.

VASCONCELOS, A. R. et al. 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**, v. 36, n. 5, p. 1914-1923, 2015. ISSN 0197-4580.

VICINI, S. et al. Functional and Pharmacological Differences Between Recombinant N-Methyl-d-Aspartate Receptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 79, n. 2, p. 555-566, 1998. ISSN 0022-3077.

VIKMAN, K. S.; RYCROFT, B. K.; CHRISTIE, M. J. Switch to Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 2, p. 515-527, 2008. ISSN 1469-7793.

YU, B. P. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. **Free radical biology and medicine**, v. 21, n. 5, p. 651-668, 1996. ISSN 0891-5849.

YUAN, H. et al. Context-dependent GluN2B-selective inhibitors of NMDA receptor function are neuroprotective with minimal side effects. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1305-1318, 2015. ISSN 0896-6273.

ZAMZOW, D. R. et al. An increase in the association of GluN2B containing NMDA receptors with membrane scaffolding proteins was related to memory declines during aging. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 30, p. 12300-12305, 2013. ISSN 0270-6474.

ZHOU, T. B. T. et al. Biochemical and functional characterization of the klotho-VS



polymorphism implicated in aging and disease risk. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36302-36311, 2013. ISSN 0021-9258.

ZHOU, X. et al. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 33, p. 24151-24159, 2013. ISSN 0021-9258.

\_\_\_\_\_. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. **Cell death & disease**, v. 4, n. 3, p. e560, 2013.