PAULA FERNANDA KINOSHITA

Participação do TNFR1 nos efeitos da ouabaína na sinalização inflamatória no hipocampo de camundongos

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

São Paulo 2018

PAULA FERNANDA KINOSHITA

Participação do TNFR1 nos efeitos da ouabaína na sinalização inflamatória no hipocampo de camundongos

Tese apresentada ao Programa de 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. Tit. Cristoforo Scavone

Coorientador: Profa Dra. Elisa Mitiko Kawamoto

Versão original.

São Paulo 2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kinoshita, Paula Fernanda Participação do TNFR1 nos efeitos da ouabaína na sinalização inflamatória no hipocampo de camundongos / Paula Fernanda Kinoshita; orientador Cristoforo Scavone; coorientadora Elisa Mitiko Kawamato . --São Paulo, 2018. 117 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. TNFR1. 2. ouabaína. 3. LPS. 4. comportamento. 5. neuroinflamação. I. Scavone, Cristoforo , orientador. II. Kawamato , Elisa Mitiko, coorientador. III. Título. Candidata: Paula Fernanda Kinoshita

Título da Tese: Participação do TNFR1 nos efeitos da ouabaína na sinalização inflamatória no hipocampo de camundongos.

Orientador: Prof.Tit. Cristoforo Scavone

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a dia / mês / ano, considerou a candidata

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

Examinado(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinado(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinado(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinado(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente: As	ssinatura:
	Nome:
	Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 37 nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Cristoforo Scavone**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Participação do receptor de TNFR1 nos efeitos da ouabaína na vigência e ausência de um estímulo inflamatório*" do qual participaim o(s) aluno(s) **Paula Fernanda Kinoshita**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **09.04.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 10 de abril de 2014.

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

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



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

Of.CEUA.006.2018

São Paulo, 02 de abril de 2018.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Participação do receptor de TNFR1 nos efeitos da ouabaína na vigência e ausência de um estímulo inflamatório*", registrado sob o protocolo nº *37/2014* e aprovado em 09/04/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi prorrogado até 09/04/2022.

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

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por
				ano
Camundongo	C57Bl/6 KO	Macho	2-4 meses	1º: 34
	TNFR1			2º: 08
				3º: 65
				4º: 20
Camundongo	C57Bl/6	Macho	2-4 meses	1º: 32
				2º: 60
				3º: 32
				4º: 49

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

Cordialmente,

Luciare varebra Sita Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Coordenadora CEUA-ICB/USP

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

DATA REL. N.º

Aos meus pais por sempre me incentivarem a estudar e acreditarem em mim e ao meu marido, por ter me apoiado durante todo doutorado.

AGRADECIMENTOS

Antes de começar a escrever qualquer coisa da tese, resolvi escrever esta parte que é uma das mais importantes. Nada nessa vida é feito de forma isolada e as pessoas que estiveram ao meu lado me ajudaram e me fizeram crescer muito como cientista e como pessoa.

Ao Prof. Cristoforo Scavone pela oportunidade de trabalhar no laboratório desde a iniciação científica e principalmente por me incentivar quando eu achava que estava tudo errado. Ele sempre me mostrou o lado bom de trabalhar com ciência e a paixão que ele tem por ela é inspiradora. O Cris é uma pessoa que eu espero ter como colaborador pelo resto da minha carreira científica que está só no começo.

À Profa. Elisa Mitiko Kawamoto por estar no meu lado nesta longa jornada e me ajudar a ter foco quando necessário e me incentivar a ser uma cientista melhor.

À Profa. Anita Aperia e ao Prof. Hjalmar Brismar por terem me dado a oportunidade de trabalhar durante 2 anos em seus laboratórios onde pude aprender muito sobre assuntos novos como microscopia e cálcio. Aprendi a ser muito mais rigorosa em alguns aspectos e ao mesmo tempo me perdoar em alguns. Foi uma jornada de muito autoconhecimento e desenvolvimento que vou sempre lembrar com muito carinho.

Ao Dr. Nicolas Fritz por ter sido meu mentor durante o primeiro ano no Instituto Karolinska e por ter me ensinado a trabalhar com cálcio e a importância do equilíbrio entre vida pessoal e profissional.

A Dra. Minttu De Marothy por ter me ensinado como a forma de falar pode resultar em respostas muito diferentes e por ter me acompanhado durante o segundo ano de Instituto Karolinska.

Ao Dr. Evgeny Akkuratov pela amizade, pelas conversas e pelo companheirismo no projeto da mutação da ATP1A1.

A Dra. Ana Maria Marques Orellana pela amizade e companheirismo durante esta jornada. O seu alto astral contagia as pessoas em sua volta e isso faz muito bem ao laboratório.

À Diana Zukas Andreotti Viana, por me ajudar sempre que precisei, por ser uma pessoa do bem que se preocupa com os outros e pela amizade.

À Jacqueline Alves Leite pela amizade e pela parceria nos papers e no laboratório principalmente nos kits.

À Larissa de Sá Lima pela ajuda técnica, por estar sempre disposta a ajudar e pela amizade.

À Natália Mello por ter cuidado dos meus animais durante 2017 e pela amizade.

Ao João Victor Costa pelas conversas sempre inspiradoras que tivemos.

À Amanda Galvão pela ajuda e dedicação num momento crucial para uma publicação e por ter feito tudo com tanto zelo e cuidado.

Ás Dra. Lidia Yshii e Dra. Andrea Vasconcelos por revisarem a tese e pela amizade que começou dentro do laboratório e continuou mesmo com a distância física.

À Amanda Matumoto pela ajuda na compreensão dos dados de comportamento.

Às pessoas do laboratório de Neurofarmacologia Molecular e do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional pelo bom ambiente de trabalho e pela amizade: Marina Cararo, Caio, Beatriz, Marina Saade, Geovanni, Vinicius e Paloma.

Ao Dr. Fabio Takeo por ter me fornecido e ajudado com os animais TNFR1 KO.

Ao Liang Zhang pela amizade, parceria e pelo ensinamento nas culturas de células renais.

À Dra. Nina Illarionova por ter me ensinado muito na semana "teste" que eu passei no laboratório da Profa. Anita Aperia.

Às pessoas dos laboratórios do Instituto Karolinska e KTH: Linda, Lena, Daniel, Miroslav, Steven, Hans, Linnèa, Jacopo, Kalai, Quentin, David, Giovanna, Hanna, Nestana e Aizat.

Às queridas Victoria, Silke e Lora pela amizade e discussões sobre ciência e carreira.

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

À Regina Bennati por me acompanhar nesta jornada e muitas vezes me dar forças para continuar.

Ao programa CAPES/STINT (88887.123907/2016-00) por me dar a oportunidade de fazer parte do doutorado no Instituto Karolinska.

À CAPES (001) pela bolsa de doutorado durante 8 meses.

Ao processo nº 2014/01435-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Hermano Y. Nakata por sempre me apoiar nas minhas decisões mesmo quando isso significava ficarmos longe e por reconhecer e respeitar a importância do doutorado para mim.

Aos meus pais, Meire de Cássia I. Kinoshita e Paulo R.Y. Kinoshita, que são as pessoas que me trouxeram para este momento e que nunca duvidaram da minha capacidade.

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

À Deus por sempre me proteger e me proporcionar esse momento.

And here's to the fools Who dream Crazy, as they may seem Here's to the hearts that break Here's to the mess we make

I trace it all back To then Her, and the snow, and the Seine Smiling through it She said She'd do it, again

Audition (The Fools Who Dream) - Lalaland

RESUMO

Kinoshita PF. Participação do TNFR1 nos efeitos da ouabaína na sinalização inflamatória no hipocampo de camundongos.[tese (Doutorado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

O efeito anti-inflamatório da ouabaína tem sido demonstrado no sistema nervoso central. Baixas doses de ouabaína se ligam à Na⁺,K⁺-ATPase e ativam vias de sinalização relacionadas a crescimento, apoptose e inflamação. Nosso grupo mostrou que a ouabaína modula a expressão de BDNF, TNF e IL-1β. TNF tem um papel importante na inflamação e possui uma resposta complexa; e pode ser encontrado em duas formas: TNFtm (transmembrana) e TNFsol (solúvel). TNFsol é resultante da clivagem de TNFtm pela enzima TACE/ADAM 17. As duas formas de TNF interagem de forma diferente com os receptores de TNF: TNFR1 e TNFR2. TNFR1 possui um domínio de morte e é relacionado à via clássica de TNF com um perfil pró-inflamatório e pró-apoptótico. O objetivo do presente trabalho foi elucidar o papel do TNFR1 frente a estímulos com ouabaína e LPS. Foram utilizados camundongos TNFR1 KO para estudar o receptor. Os animais foram tratados com ouabaína ou salina seguido de uma segunda injeção de LPS ou salina. Depois de 2 horas da segunda injeção, hipocampo e córtex foram dissecados para os ensaios bioquímicos. Para os testes de comportamento, os animais foram avaliados no teste de campo aberto 1 dia após o tratamento; e no ensaio de esquiva inibitória 3 dias após o desafio. Os resultados mostraram que o LPS aumenta os níveis de TNF no soro dos animais WT e TNFR1 KO, mas a guantidade de TNF liberado no animal TNFR1 KO era superior ao no animal WT. A liberação de TNF é aumentada e a expressão de TNFR2 é diminuída no hipocampo somente nos animais TNFR1 KO tratados com LPS. IL-1ß é aumentado apenas no grupo WT tratado com LPS, mostrando que o TNFR1 modula a expressão de IL-1ß no hipocampo. O BDNF é aumentado no grupo TNFR1 KO tratado com LPS, mas ao mesmo tempo, a expressão de TrkB não é modulada pelo LPS como no grupo WT. Isto causa mudanças importantes no comportamento como os animais TNFR1 KO tratados com LPS apresentam diminuição na velocidade média e no tempo no centro. Estes dados demonstram que a resposta ao tratamento com LPS é mais severa nestes animais, refletindo maior comportamento ansioso. A ouabaína também aumenta a distância percorrida durante todos os experimentos nos animais WT, o que não foi encontrado nos animais TNFR1 KO, mostrando que o aumento de locomoção e exploração são dependentes de TNFR1. No ensaio de esquiva inibitória, o tratamento com ouabaína no grupo WT levou a um aumento no tempo de latência no dia 2, enquanto que no grupo TNFR1 KO este efeito foi perdido. Entretanto, nos animais TNFR1 KO, houve um aumento no tempo de latência no dia 2 no grupo controle e ouabaína+LPS, mostrando que a ouabaína de alguma forma depende de vias inflamatórias para ser protetora. Logo, nosso estudo mostrou a relevância da

sinalização do TNFR1 no hipocampo e como isso pode ser um alvo importante para a neuroinflamação.

Palavras-chave: TNFR1, ouabaína, LPS, comportamento, neuroinflamação

ABSTRACT

Kinoshita PF. TNFR1 role in ouabain effects in inflammatory pathway in mice hippocampus. Ph.D thesis [(Pharmacology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

The anti-inflammatory role of ouabain in central nervous system has been demonstrated. Low doses of ouabain binds to Na⁺,K⁺-ATPase and activate signaling pathways related to growth, apoptosis and also inflammation. Our group has shown that ouabain modulates BDNF, TNF and IL-1β expression. TNF has a major role in inflammation and also has a very complex response. TNF can be found in two forms: tmTNF (transmembrane) and solTNF (soluble). SolTNF is a result of tmTNF cleavage by TACE/ADAM 17. Those two forms interact differently between the two TNF receptors: TNFR1 and TNFR2. TNFR1 has a death domain and is related to a canonical TNF pathway with a pro-inflammatory and pro-apoptotic profile. Thus, the objective of our work is to understand the role of TNFR1 in ouabain and as well as in LPS stimulus. To study the receptor, we used TNFR1 KO mice. The animals were treated with ouabain or saline followed by a second injection of LPS or saline. After 2 hours of the second injection, the hippocampus and cortex were dissected for the biochemical assays. For the behavior tests, the animals were evaluated in open field 24 hours after the treatment and after 3 days in passive avoidance. The results showed that LPS increased TNF levels in serum in WT and TNFR1 KO mice, but the amount of TNF released in TNFR1 KO mice was higher than in WT. TNF release was also increased and TNFR2 expression was decreased in hippocampus only in TNFR1 KO mice treated with LPS. IL-1ß is increased only in WT group with LPS treatment showing that TNFR1 modulates IL-1ß expression in hippocampus. BDNF is increased in TNFR1 KO group treated with LPS but at the same time, TrkB expression is not modulated by LPS as in WT group. This causes important modifications in behavior as TNFR1 KO mice presented in open field test a decrease in mean speed and in time in the center in LPS treated groups. These data demonstrate that LPS treatment is more severe in those animals and that also reflect in more anxious animals. Ouabain also increased distance travelled in the whole experiment in WT mice, which was not found in TNFR1 KO mice, demonstrating the increase in locomotion and exploration are TNFR1 dependent. In

passive avoidance, ouabain in WT mice had a higher latency time in day 2 while in TNFR1 KO mice this effect was lost. However, in TNFR1 KO mice there was an increase in latency time in day 2 for control and ouabain+LPS groups showing that ouabain somehow needs inflammatory pathways to be protective. Thus, our study showed the relevance of TNFR1 signaling in the hippocampus and how this could be an important target for neuroprotection.

Keywords: TNF, TNFR1, ouabain, LPS, behavior, neuroinflammation

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	.16
1.1 Ouabaína e Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	.16
1.2 O papel dual da ouabaína e seus efeitos na inflamação	.18
1.3 LPS e sua interferência na função cognitiva	.21
1.4 Receptores de TNF	.24
1.5 Justificativa	. 27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Animais WT e TNFR1 KO	.29
4.2 Genotipagem dos camundongos transgênicos para TNFR1 (Tnfr1 ^{tm1Mak})	.30
4.3 Tratamentos dos animais com Ouabaína e LPS	.30
4.4 Extração de proteínas citosólicas e amostras para Na ⁺ .K ⁺ -ATPase	.31
4.5 Determinação da concentração de proteínas	.31
4.6 Determinação da atividade da Na ⁺ .K ⁺ -ATPase	.32
4.7 Ensaio de Western Blotting para a expressão de proteínas	.33
4.8 Medida da concentração de TNF-α , IL-1β, IL-6, IL-10 e BDNF	.35
4.9 Análise comportamental	. 36
4.9.1 Teste de atividade locomotora: Campo Aberto	. 36
4.9.2 Teste comportamental: Reconhecimento do local do objeto	. 37
4.9.3 Teste comportamental: Esquiva Inibitória	. 37
4.10 Análise dos resultados	. 38
5 RESULTADOS	38
5 1Padronização da genotinagem e neso dos animais	. 38
5 2Ffeitos na atividade da NKA e na expressão de isoformas	40
5.3 Alterações na via do TNF	43
5 4 Alterações em outras citocinas pró-inflamatórias	46
5 5 Resposta dos astrócitos e ativação do NF-κB	49
5.6 Envolvimento da via TrkB/BDNE	.50
5.7 Vias de sobrevivência celular	. 53
5.8 Estresse oxidativo	. 56
5.9 Autofagia	. 57
5.10 Citocinas e BDNF no córtex	. 58
5.11 Testes comportamentais	.61
	70
	۲U. ۵E
REFERÊNCIAS	20.
	00. 00
	. 33

1.INTRODUÇÃO

1.1 Ouabaína e Na⁺, K⁺-ATPase

A ouabaína é um glicosídeo cardiotônico que é encontrado nas plantas *Strophantus gratus* e *Acokanthera ouabaio* sendo descrito como um novo hormônio, embora haja muitas discussões na literatura a esse respeito (1–4). A ouabaína apresenta um grupo funcional de açúcar chamado de ramnose ligado a um núcleo esteroide que também está ligado a um anel de lactona (5).

Evidências demonstram imunorreatividade para ouabaína em quase todos os tecidos, incluindo o plasma, mas os níveis mais elevados foram encontrados na glândula adrenal, pituitária e hipotálamo (6,7). Porém, ainda pouco se sabe a respeito de sua função fisiológica no organismo. Na terapêutica, os glicosídeos cardiotônicos são utilizados em casos de insuficiência cardíaca congestiva, pois são capazes de inibir a Na⁺,K⁺-ATPase (NKA), o que gera um aumento nos níveis de Na⁺ e Ca²⁺ intracelulares e consequentemente há um aumento da contractilidade cardíaca (8).

A NKA foi descoberta pelo pesquisador dinamarquês Jens Skou em 1957 (9). É uma proteína presente na membrana plasmática e importante para a manutenção do equilíbrio osmótico celular. Isto a torna essencial para a sobrevivência e por essa razão a NKA é expressa em todas as células e altamente conservada entre as espécies (10,11). Além disso, esta enzima é responsável por quase 50% de toda a energia utilizada pelo cérebro (12).

Suas funções principais são: manter o equilíbrio osmótico e volume celular, o pH e o potencial de membrana. Isso ocorre por meio da hidrólise de uma molécula de ATP, que mantém as concentrações do meio intracelular de K⁺ elevadas e as de Na⁺ baixas, função essencial para excitabilidade neuronal e a manutenção da celular (13,14).

A NKA é formada por duas subunidades: $\alpha \in \beta$ (15,16). A presença de diversas isoformas possibilita versatilidade funcional para as células, o que gera condições para que estas enzimas realizem as suas várias funções no organismo (17–20).

A subunidade α , ou subunidade catalítica, é responsável pela troca de íons Na⁺ e K⁺ e é onde se encontra o sítio de ligação dos glicosídeos cardiotônicos como a ouabaína (21,22). Esse sítio de ligação é altamente conservado em diversos organismos, incluindo humanos (23), revelando um importante papel fisiológico desse sítio. A NKA apresenta 10 domínios transmembrana sendo que a ouabaína se liga nas alças extracelulares desses domínios (1-2, 5-6 e 7-8), sendo a alça entre os domínios transmembrana 1 e 2 a parte mais importante do sítio de ligação (Figura 1) (14).



Figura 1: Estrutura da ouabaína e seu sítio de ligação.

A ouabaína apresenta um núcleo esteroide ligado à um anel de lactona e a um grupo de açúcar denominado ramnose. A subunidade α é o sítio catalítico da NKA e também o local onde ocorre a interação com a ouabaína. A ouabaína se liga em 3 alças extracelulares sendo que a alça entre os domínios transmembrana 1 e 2 é a mais importante no sítio de ligação. Adaptado de Bagrov et al., 2009 (14).

A subunidade α possui quatro isoformas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$. A isoforma $\alpha 1$ -NKA está presente em todos os tipos celulares enquanto a $\alpha 4$ -NKA está presente apenas em espermatozoides e coexiste com a isoforma $\alpha 1$ -NKA (24,25). No sistema nervoso central (SNC), a isoforma $\alpha 2$ -NKA está presente em astrócitos e $\alpha 3$ -NKA em neurônios (26,27).

A partir dos anos 2000, diversas doenças relacionadas às mutações nas isoformas da NKA foram descritas como a distonia-parkinsoniana de início rápido

(RDP), CAPOS e hemiplegia alternada da infância (AHC) relacionadas a mutação na isoforma α 3-NKA e a enxaqueca familiar do tipo II (FHMII) relacionada a mutação na isoforma α 2-NKA (28–31). Camundongos heterozigotos das isoformas α 2 e α 3-NKA apresentam déficit de memória e aprendizado em ensaios comportamentais, mostrando a importância destas isoformas no funcionamento das vias associadas à memória espacial (32).

Além disso, a α -sinucleína, proteína importante na doença de Parkinson, interage com a isoforma α 3-NKA,onde ocorre a formação de aglomerados que impedem a mobilidade da proteína no neurônio, comprometendo sua distribuição (33). A atividade da NKA é diminuída na doença de Alzheimer, pois há uma interação entre a mesma isoforma e a proteína β -amilóide que é uma proteína presente em excesso na doença (34).

Acredita-se que a NKA apresenta dois *pools* distintos. Um destes *pools* está associado ao transporte de íons Na⁺ e K⁺ (*pumping*), enquanto que o outro altera a interação proteína-proteína, levando à ativação de vias independentes dos íons Na⁺ e K ⁺(*non-pumping*) (35). Há duas vias de sinalização que foram descritas para a função de receptor da NKA e de certa forma existem pontos em comum para as duas vias (36,37).

Xie e Askari (38) descobriram que a NKA ativa a cascata de sinalização Src-Ras-Raf-MAPK (Src: proto-oncogene tirosina quinase, Ras: tipo de proteína G de baixo peso molecular e MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno) através do receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, como consequência, à ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) e do fator nuclear associado a cadeia leve kappa do linfócito B (NF-κB), que estão envolvidos em diversos processos celulares como crescimento, apoptose, motilidade e adesão (39). A outra via da NKA é mediada pela ativação do receptor de trifosfato de inositol (IP3R), que gera oscilações de cálcio que podem ativar fatores de transcrição como o NF-κB que é indispensável para o desenvolvimento celular (40).

1.2 O papel dual da ouabaína e seus efeitos na inflamação

Estudos do nosso laboratório mostraram que a administração intrahipocampal de ouabaína aumentou dos níveis de RNAm de *Bdnf* (fator neurotrófico derivado do cérebro), *NOSi* (óxido nítrico sintase induzida), *Tnf* (fator de necrose tumoral) *e Bcl-2* (*B-celllymphoma* 2), sugerindo que este hormônio possamodular genes envolvidos na sinalização inflamatória e das neurotrofinas no SNC (41). Outro estudo confirma estas evidências *in vitro* e demostrou em cultura primária de neurônios cerebelares de ratos que a ouabaína ativa o NF-kB e aumenta os níveis de RNAm de *Tnf, IL-1β* (interleucina 1 *β*) *e Bdnf* devido à cascata NMDA (N-Metil-D-Aspartato)-Src-Ras-MAPK (Figura 2), postulando que este agente endógeno pode induzir resposta adaptativa do SNC (42). O mesmo resultado foi observado em células ganglionares da retina onde a ouabaína é capaz de aumentar a sobrevivência celular via TNF e IL-1β (43,44).



Figura 2: As duas principais vias de sinalização da ouabaína em baixas concentrações.

A ouabaína se liga à enzima Na⁺,K⁺-ATPase ativando duas principais vias: a via da Src-Ras-MAPK e a ativação do receptor de IP3 levando à oscilações de cálcio. As duas vias levam à ativação do NF- κ B. Como consequência há o aumento dos níveis de mRNA de *IL-1* β , *TNF*, *Bcl-2* e *BDNF* (38,39,41,42,45).

A ouabaína tem um papel dual e apresenta uma resposta dose-dependente. Uma dose alta de ouabaína é capaz de levar à morte celular, devido à inibição da NKA que leva a uma depleção de íons K⁺ culminando em desenvolvimento de apoptose celular e também a um aumento de íons Na⁺ e Ca⁺² intracelular que origina necrose em neurônios (46). No SNC, a injeção intracerebroventricular de ouabaína em altas concentrações é utilizada como modelo de mania por inibir a NKA, diminuir os níveis de BDNF no córtex e aumentar os níveis de estresse oxidativo (47–49). Enquanto que outro estudo demonstra que a ouabaína tem um efeito anti-oxidante em animais tratados com LPS (50).

O papel protetor da ouabaína em baixas concentrações foi estudado em lesões de ácido caínico no estriado de ratos onde houve redução da apoptose pelo aumento de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (51). Semelhante aumento de Bcl-2 foi observado em cultura primária de rim de ratos, onde ouabaína exerceu um efeito protetor frente à toxina shiga, responsável pela síndrome hemolítico-urêmica (52).

Foi demonstrado que a ativação da via do BDNF e NF-κB pela ouabaína contribui para mudanças no microambiente hipocampal, o que resulta no aumento de arborização dendrítica (53). Estas mudanças ocasionam melhoras na memória espacial e inibem a extinção da memória de longo prazo, mostrando a importância da NKA e da ouabaína na modulação de vias de sinalização que acarretam em alterações funcionais (45). Além disso, foi descrito que a ouabaína e a NKA têm um papel essencial na inflamação através da inibição de prostaglandina E2, bradicinina e degranulação de mastócitos (54).

A ouabaína também tem um efeito anti-inflamatório no SNC (55). Baixas doses de ouabaína inibem as mudanças induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) em astrócitos, reduzindo a citocina IL-1β liberada e previne a diminuição da expressão ou atividade funcional da NKA (56). O LPS é um lipopolissacarídeo presente na membrana de bactérias gram negativas que leva à ativação do fator de transcrição NF-κB que estimula a transcrição diversos genes pró-inflamatórios. A injeção de LPS é um modelo

20

de inflamação e sepse muito utilizado na literatura (57,58).

Outros mecanismos envolvidos nesse potencial anti-inflamatório dos glicosídeos cardiotônicos foram observados, como a diminuição da expressão de IL-6 (59) ou o bloqueio da ativação da via TNF/NF-κB através da inibição da interação entre o receptor de TNF do tipo 1 (TNFR1) e o TNFR1 *associated death domain protein* (TRADD) em cultura de células HeLa (60), além da inibição da expressão de genes ativados por TNF (61).

Dados publicados pelo nosso laboratório mostraram uma diminuição nos níveis de RNAm de *IL1-* β e *NOSi* e da relação de *Bax/Bcl2* no hipocampo pela ouabaína em ratos Wistar desafiados com LPS. O tratamento de ouabaína e LPS não alterou a atividade da NKA e diminuiu a ativação do NF- κ B e de astrócitos (62).

Outro estudo mostrou, mais uma vez, que a ouabaína possui um efeito antiinflamatório em cultura primária de células da glia e que a isoforma α 2-NKA é essencial para a resposta inflamatória desencadeada pelo LPS (63). Além disso, os níveis de glicosídeos cardiotônicos estão elevados em condições inflamatórias crônicas. A ouabaína ativa o NF- κ B levando à liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos de humanos e de camundongos e esta ativação é dependente de NKA, CD36 e o *Toll-like* receptor 4 (TLR4) que é o receptor do LPS (64). Isso demonstra a importância da NKA na inflamação.

1.3LPS e sua interferência na função cognitiva

Como já dito anteriormente, o LPS é um lipopolissacarídeo de membrana de bactéria gram negativa liberado de forma livre ou em agregados (65,66). O TLR4 é o receptor responsável pelo efeito do LPS e é considerado a molécula de reconhecimento do sistema imune inato. A sinalização pelo TLR4 ocorre pelo recrutamento sequencial de uma molécula adaptativa MyD88 e a quinase do receptor associado a IL-1 (IRAK), que após algumas etapas ativa o NF-κB que neste caso ativa diversos genes pró-inflamatórios (67). O NF-κB tem uma particularidade muito importante no SNC, pois o NF-κB nos astrócitos e neurônios respondem de forma diferenciada. Enquanto que no neurônio, a translocação do NF-κB para o núcleo é

constitutiva, nos astrócitos, a translocação é geralmente induzida por estímulos relacionados com inflamação (68).





O LPS se liga à proteína LPB que interage com o CD14. O CD14 interage com o TLR4 o que recruta o MyD88 e ativa IRAK e TRAF6 que leva à ativação e translocação nuclear do NF-κB. Como consequência, há o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF e IL6 (69).

As principais citocinas consideradas pró-inflamatórias são IL-1, TNF e IL-6, que são responsáveis pela resposta chamada de comportamento doentio (*sickness behavior*) que consiste num conjunto de sintomas como fraqueza, letargia, depressão e febre. Embora os sintomas sejam considerados ruins, eles são uma estratégia do organismo de lutar contra a infecção (70). O comportamento doentio é desencadeada pelas citocinas pró-inflamatórias produzidas por células do sistema imune inato ativadas em contato com padrões moleculares associados a patógenos específicos (PAMPs). Essas citocinas, principalmente IL-1 α , IL1- β , IL- β e TNF, alteram a atividade

locomotora e a cognição, pois as citocinas pró-inflamatórias modulam o aprendizado e a memória (71). Tem sido demonstrado que a ativação do TLR4 em pacientes, geralmente idosos, também causa delírio (72,73).

O receptor TLR4 tem um papel muito importante na neurogênese, pois na ausência deste receptor há um aumento da proliferação celular e da diferenciação neuronal de células progenitoras neuronais. Isso mostra que a ativação deste receptor, leva à diminuição de neurogênese, o que é um mau prognóstico para a plasticidade neuronal e consequentemente para a memória (74).

A neurogênese é essencial para a consolidação e recuperação de novas memórias. O hipocampo é uma estrutura cerebral relacionada com a memória declarativa e espacial e também é responsável pelo aprendizado, emoções e plasticidade neuronal. As regiões do hipocampo onde ocorre neurogênese é a zona subventricular e o giro denteado em adultos. O mais interessante é que o hipocampo é uma região extremamente vulnerável a insultos inflamatórios devido a sua grande quantidade de receptores de mediadores inflamatórios (75).

A produção de mediadores inflamatórios interrompe o delicado equilíbrio que é necessário para ações neurofisiológicas de processos imunes e isso produz alterações importantes como danos à memória (diminuição da potenciação de longa duração, LTP) e à plasticidade neuronal e diminuição da neurogênese. Isso ocorre principalmente pelo aumento da produção de IL-1β, ativação de micróglia (76) e NF-κB juntamente com a diminuição de BDNF no hipocampo. Esses mecanismos são homeostáticos, pois este aumento de mediadores inflamatórios pode levar a uma hiperexcitabilidade neuronal e isso impede suas consequências devastadoras como danos ao aprendizado e memória (77).

O BDNF é importante para a plasticidade sináptica por atuar na LTP, principalmente no hipocampo, em nível pós- e pré-sináptico. Isso ocorre devido ao controle do transporte de RNAm e de sua tradução nas sinapses sendo controlada pelo BDNF através de miRNAs (78). Como consequência, o BDNF é importante na aquisição e consolidação da memória e esse efeito é associado com o aumento nos níveis de RNAm do *Bdnf* e na ativação do receptor quinase B de tropomiosina (TrkB) (79).

23

1.4 Receptores de TNF

O TNF foi descoberto nos anos 80 como um fator capaz de atuar em alguns tumores levando à necrose, o que foi explorado pela indústria farmacêutica em um primeiro momento, mas foi visto que o TNF apresentava toxicidade como hipertensão e febre (80–82). O TNF é considerado uma citocina pleiotrópica (83) e praticamente todas as células respondem ao TNF.O TNF é benéfico principalmente na resposta imune inata contra patógenos e pode também ser deletério, promovendo lesão tecidual.

Os ligantes e receptores da família do TNF são formados por proteínas que regulam uma enorme variedade de processos imunológicos, e que também estão envolvidas na regulação do desenvolvimento e na manutenção da homeostase de diversos sistemas, incluindo o SNC.

A superfamília de TNF (TNFSF) é composta por 19 ligantes diferentes que se ligam aos receptores desta família (TNFSF, 29 receptores estruturalmente similares). Os receptores podem ser classificados em 3 subgrupos: a) os que possuem o chamado domínio de morte, b) os que interagem com o fator associado ao receptor de TNF (TRAF), e c) receptores sem capacidade de sinalização própria que controlam a atividade de outros receptores TNFRSF (84,85). Os receptores de TNFSF possuem um padrão de expressão diferenciado como na distribuição celular, mostrando sua importância no desenvolvimento de doenças, como artrite, psoríase, câncer, doença de Crohn e osteoporose (86–89).

O TNF é uma das principais ferramentas de controle da inflamação, pois no SNC, ele induz a ativação de microglia e astrócitos. Além disso, atua em neurônios, inibindo o transporte de glutamato em astrócitos e aumentando a expressão de receptores de glutamato como AMPA e NMDA, o que resulta em um aumento da sinapses excitatórias que é agravada pela diminuição da expressão do receptor GABA_A (90). A inflamação é um fator predominante na maioria das doenças neurodegenerativas. Na doença de Parkinson, há níveis elevados de TNF no estriado, que é uma das regiões mais afetadas na doença, além disso, os mesmos níveis elevados também foram encontrados em pacientes com doença de Alzheimer (91).

Porém, no tratamento de doenças relacionadas ao aumento de TNF, 30% dos pacientes não respondem ao uso de anti-TNF. Ainda, o uso deste mesmo anticorpo é contraindicado em pacientes com esclerose múltipla, porque há diversos casos de desmielinização associados ao uso de anti-TNF (92), mostrando como os mecanismos do TNF devem ser melhor elucidados para entender porque o tratamento com anticorpo não é efetivo (86).

A função do TNF no SNC ainda não é bem compreendida. O TNF é sintetizado como uma proteína transmembrana (TNFtm) com 26kDa que é inserida na membrana como um homotrímero que é convertida em TNF solúvel (solTNF) com 17kDa pela ação de uma metaloproteinase chamada enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa (TACE) ou ADAM17. As duas formas de TNF são biologicamente ativas e são produzidas por microglia, astrócitos e alguns tipos de neurônios. A produção de ambas as formas depende do tipo celular, da ativação da célula, da atividade da TACE/ADAM17 e da expressão de inibidores endógenos da TACE/ADAM17 (93,94).

A TACE/ADAM17 também tem um papel regulador na resposta do TNF, pois esta enzima cliva os próprios receptores de TNF o que libera os chamados receptores solúveis (sTNFR) que conseguem sequestrar o TNF circulante e também diminui a disponibilidade de receptores na membrana celular (95–97). A importância do sTNFR aparece na síndrome periódica febril, onde os pacientes possuem mutações no receptor TNFR1 o que acarreta na diminuição pela metade dos níveis de sTNFR1 no plasma e aumento na expressão de TNFR1 na membrana (98).

O TNF se liga a dois tipos de receptores: TNFR1 e TNFR2 (receptor de TNF do tipo 1 e 2). O TNFR1 é expresso na maior parte das células e pode ser ativado pelas duas formas de TNF, com preferência por solTNF. O TNFR2 é presente principalmente em células do sistema imune (microglia), células endoteliais e algumas populações neuronais e é ativado somente por TNFm (99). Têm sido demonstrados efeitos antagônicos e sinérgicos dos dois receptores (85).

O TNFR1 contém um domínio chamado domínio de morte que se liga ao TRADD, oque permite o recrutamento de RIP (proteína que interage com o receptor) e TRAF2 (receptor de TNF associado ao fator 2). Esta via de sinalização leva à ativação do NF-κB que inicia uma sinalização pró-sobrevivência, proliferação, produção de

25

citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias de apoptose (pró-caspase 8). O TNFR2, diferentemente do TNFR1, não possui domínio de morte e com isso, gera uma resposta diferenciada. O TNFR2 ativa vias de sinalização relacionadas com inflamação e pró-sobrevivência. Há o recrutamento de proteínas adaptadoras de recrutamento em TRAF1 e TRAF2, o que leva à ativação do NF-κB que é demonstrado na figura 1 (99).



Figura 4: Vias de sinalização ativadas pelo TNFR1 e TNFR2.

O TNFR1 pode ser ativado pelo TNF solúvel ou de membrana (com pouca afinidade) e o TNFR2 tem muito mais afinidade pelo TNF de membrana. A transformação do TNF de membrana em TNF solúvel depende da enzima TACE/ADAM17. O TNFR1, por ter o domínio de morte (DD), ativa a via de apoptose através da ativação da caspase-8 e FADD e também da ativação de TRADD que recruta as proteínas RIP e TRAF2.Há também a ativação do NF-κB, que ativa tanto a pró- sobrevivência e proliferação celular quanto a produção de citocinas. A mesma ativação do NF-κB ocorre na ativação do TNFR2, porém, não há apoptose (99).

O TNF em concentrações fisiológicas tem um papel importante na plasticidade sináptica através da sinapse *scaling*, que é um fenômeno que permite a manutenção da homeostase da atividade neuronal independente de alterações na atividade, o que

garante a propagação normal da rede neuronal (100). Este fenômeno ocorre em resposta à altos níveis crônicos de atividade neuronal através de um feedback negativo, o que permite uma diminuição geral na taxa de disparo dos potenciais de ação (101). Este controle parece ser feito pelos astrócitos e não dependente da ação de TNF em neurônios através da alteração da expressão de receptor AMPA e alterações na amplitude de correntes pós-sinápticas excitatórias em miniatura (mEPSCs) (102).

O TNF também está relacionado com o aumento de espinhas dendríticas em neurônios que tiveram perdas recentes de espinhas dendríticas. Além disso, o TNF pode estar envolvido na LTP e sua ação é dependente de TNFR1 e TNFR2. Porém, os efeitos do TNF podem ter resultados específicos em diferentes áreas cerebrais (103,104). Como exemplo, o TNFR1 é essencial para a resolução da infecção viral no estriado enquanto que o TNFR2 é responsável pelo efeito protetor no hipocampo (105).

O TNFR1 é presente em *lipid rafts* e sinaliza para a ativação do NF-κB. Depois da formação do complexo de sinalização, TNFR1 é degradado via proteassoma. Se há uma desorganização nos *lipid rafts*, o TNFR1 não é degradado e sinaliza mais para as vias de apoptose (106).O TNFR1 é importante para a encefalopatia associada à sepse onde a permeabilidade da barreira hemato-encefálica é menos comprometida nos animais TNFR1 KO no modelo de sepse (107,108).

É interessante observar que o pré-condicionamento com LPS pode melhorar a lesão isquêmica cerebral e que esse fenômeno é dependente de aumento nos níveis de TNF pelo LPS. Entretanto, após a lesão isquêmica, os níveis de TNF diminuem e há um aumento no sTNFR1. Isso demonstra que o condicionamento é dependente de TNF, porém, para que a proteção contra o dano isquêmico aconteça, os níveis de TNF devem ser mais baixos (109). Isso demonstra a complexidade e especificidade da sinalização de TNF e seus receptores.

1.5 Justificativa

A ouabaína é considerada um hormônio endógeno que é capaz de inibir a NKA e ativar cascatas de sinalização como a Src-Ras-MAPK que podem gerar um efeito protetor. Diversos relatos na literatura mostram que a ouabaína possui um efeito

27

protetor e anti-inflamatório em diferentes tecidos e modelos de lesão. Estudos recentes no nosso grupo mostraram a importância da isoforma α2-NKA na resposta inflamatória causada por LPS e ainda o aumento da expressão de TNF após o tratamento com ouabaína, mostrando um papel relevante desta proteína na resposta inflamatória. Como existem diversas lacunas na literatura com relação ao papel fisiológico da ouabaína e qual a relevância do TNF neste papel, é necessário e relevante observar como as alterações na modulação do TNFR1 podem influenciar os efeitos da ouabaína na vigência do estimulo inflamatório (LPS).

3.OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo avaliar a participação do TNFR1 na sinalização celular e nos efeitos na cognição, especificamente, aprendizado e memória, desencadeados pela presença de ouabaína frente a um estímulo inflamatório como o LPS (Figura 5).

Figura 5: Hipótese simplificada do projeto.



A hipótese contempla se o efeito protetor da ouabaína seria também observado neste modelo, se esta possível proteção seria mantida na ausência do receptor TNFR1 e se haveria alterações comportamentais com ou sem o TNFR1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais WT e TNFR1 KO

Foram utilizados para obtenção dos animais selvagens (WT) e homozigoto nocaute *Tnfr1*^{tm1Mak} (TNFR1 KO), camundongos C57BL/6J machos adultos heterozigotos *Tnfr1*^{tm1Mak} provenientes do Biotério da Universidade Cruzeiro do Sul. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Farmacologia –ICB, USP/SP e foram mantidos em casais para a criação dos animais WT e TNFR1 KO que foram identificados por genotipagem.

Os animais foram mantidos em grupos de 5 animais em gaiolas plásticas, por um período mínimo de 1 mês antes do início dos experimentos, para adaptação dos animais ao novo ambiente. Os animais foram mantidos sob temperatura ambiente constante (22 ~ 2°C), ciclo de iluminação controlado, sendo o período de claro entre 7 – 19h, e receberam água e comida *ad libitum* durante todo o período do tratamento. Foram utilizados animais com dois a quatro meses de idade para a realização dos experimentos. O protocolo de ética foi registrado sob nº 37 nas fls.15 do livro 03 e foi aprovado pelo CEUA 09/04/2014.

4.2 Genotipagem dos camundongos transgênicos para TNFR1 (Tnfr1^{tm1Mak})

A genotipagem foi realizada a partir de uma pequena parte da cauda dos animais de acordo com protocolo da empresa The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA). A cauda foi digerida com 75µL de tampão de lise (25mM NaOH/0,2mM EDTA) por 1 hora a 98 °C, que foi posteriormente reduzida a 15°C. Foram adicionados 15µL da solução de 40 mM Tris HCI (pH 5,5) no tubo e o mesmo foi centrifugado por 3 minutos a 4000 rpm. Uma alíquota foi utilizada para a realização do PCR com os primers específicos:

oIMR04485'

TGT GAA AAG GGC ACC TTT ACG GC 3' selvagem

oIMR04495'

GGC TGC AGT CCA CGC ACT GG 3' comum aos dois genótipos

oIMR04505'

ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG 3' mutante

4.3 Tratamentos dos animais com Ouabaína e LPS

Os animais (WT, TNFR1KO) foram divididos em quatro grupos que receberam uma administração intraperitoneal de salina estéril livre de pirógenos ou ouabaína (30µg/kg) 20 minutos antes da administração de uma segunda injeção intraperitoneal de salina estéril livre de pirógenos ou de LPS (*Escherichia Coli* O111:B4 Sigma) dissolvido em salina, correspondendo a uma dose de 250µg/kg. Os grupos foram denominados: controle (salina+salina), ouabaína (ouabaína+salina), LPS (salina+LPS) e ouabaína+LPS (O+L).

Todas as administrações foram feitas no período da manhã. Decorridos 2h após a administração do LPS, baseado em Kawamoto*et al.* (110), os animais foram sacrificados por decapitação, e o cérebro foi rapidamente retirado em solução fria de tampão salina-fosfato. As estruturas cerebrais (estriado, córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo) foram dissecadas sobre uma placa gelada e estocadas a –80°C até a preparação dos extratos citosólicos e para a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase.

4.4 Extração de proteínas citosólicas e amostras para Na⁺, K⁺-ATPase

As preparações de hipocampo e córtex foram homogeneizadas em Tampão de Homogeneização (20 mM de HEPES pH 7,4; 320 mM de Sacarose; 1 mM de EDTA; 1,0 mM de DTT e 1,0 mM de PMSF) e foram centrifugadas por 30 segundos a 12.000g. O sobrenadante foi centrifugado por 20 minutos a 12.000g e o *pellet* foi ressuspendido no tampão de homogeneização para ser utilizado no ensaio da determinação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e fração de membrana para *Western Blotting*. O *pellet* resultante da primeira centrifugação foi ressuspendido em tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA) e incubado em gelo durante 10 minutos. Foram adicionados 17,5µl de NP-40 10% para cada 700µl de tampão de lise. As amostras foram submetidas a uma agitação com o vórtex por 30 segundos e depois centrifugadas à 12.000g 30 segundos à 4°C. O sobrenadante (extrato citosólico) foi recolhido para o ensaio de *Western Blotting*.

4.5 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem foi realizada através do reagente de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas (111). A comparação com uma curva padrão forneceu a concentração de proteínas presentes nas amostras.

4.6 Determinação da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase

Depois da extração, cada amostra foi utilizada em 3 diferentes grupos. Um dos grupos foi adicionado em tampão contendo Na⁺ (Tampão Histidina ATPase: NaCl 140 mM; KCl 20 mM; MgCl₂ 3 mM; Histidina 30 mM + NaOH 20,6 mM - pH = 7,2 – 37°C) e Tris-ATP (3 mM), sendo utilizado para a determinação da ATPase total. Os outros grupos foram adicionados nas mesmas condições anteriores, sendo ouabaína 3 μ M e 3 mM acrescentada ao tampão Na⁺ para a determinação da atividade das isoformas α_2 e α_3 e atividade insensível à ouabaína (Mg-ATPase), respectivamente.

O método utilizado na determinação da atividade da enzima Na⁺K⁺-ATPase consiste na determinação da quantidade de fosfato (Pi) liberado pela formação do complexo fosfomolibdato, o qual é detectado através da leitura em comprimento de onda de 700 nm (112,113).

Todas as amostras foram mantidas no gelo (tempo de reação 0). O meio de reação continha 400 µl do tampão Na⁺ + Tris-ATP (3 mM) em cada um dos tubos de ensaio dos dois grupos (Total e Mg- ATPase), e também uma alíquota de 40 µl de uma solução de ouabaína (concentração de acordo com o grupo). Os tubos foram transferidos para um banho à 37°C e a reação se inicia através da adição das amostras de tecidos.

Quando cada um dos tubos atingiu o tempo de reação requerido (30 minutos), a reação foi interrompida através da adição de 600µl do tampão término de reação (molibdato de amônio e ácido sulfúrico 10 N). Ao final deste processo, foram adicionados 10 µl da solução redutora Fiske–Subbarow para a determinação de fósforo nas amostras (114). Os tubos foram submetidos à agitação vigorosa após cada uma das etapas, garantindo com isso uma menor variabilidade dos resultados. Alíquotas de 200 µl foram transferidas dos tubos de ensaio para uma placa de 96 poços trinta minutos após a adição da solução redutora, e a leitura foi realizada em um leitor de microplaca na absorbância de 700 nm.

A concentração de Pi nas amostras foi determinada através da curva obtida pela incubação de soluções com crescentes concentrações de Pi, provenientes de uma solução de KH₂PO₄ (10 mM), as quais foram submetidas às mesmas condições das amostras. O ensaio permitiu a determinação da concentração de Pi.

32

A atividade da ATPase sensível à ouabaína (Na⁺K⁺-ATPase) foi obtida através da diferença entre as atividades obtidas no grupo Mg-ATPase (atividade insensível à ouabaína/mg/min) e as obtidas no grupo sem a ouabaína (ATPase Total/mg/min). A atividade da isoforma α_1 foi calculada através da diferença entre as amostras com ouabaína 3 µM e 3 mM, enquanto que a atividade das isoformas α_2 e α_3 foram determinadas através da diferença entre a atividade da isoforma α_1 .Devido ao grande número de amostras, as atividades foram normalizadas pela média do controle.

4.7 Ensaio de Western Blotting para a expressão de proteínas

Para esse ensaio, foram utilizados os sobrenadantes recolhidos durante a preparação do extrato citosólico. O ensaio de *Western blotting* que foi usado é baseado no descrito por Laemmli (115). As proteínas foram ajustadas na concentração apropriada para cada uma das proteínas que foram analisadas com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCI; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromophenol blue; pH 6,8) e foram fervidos por 5 minutos a 95°C.

O conteúdo total do meio de reação (20 a 30µL) foi aplicado no gel de SDSpoliacrilamida 10% {acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS} para que houvesse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 25mM de tris-base; 0,192M de glicina e 0,1% de SDS.

O gel foi corrido por 2 horas a 90V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas no tampão de transferência (25 mM tris- base, 192 mM glicina, 20% metanol, água bidestilada) eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose por aproximadamente 90 minutos a 400 mA. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada) para observar se a transferência ocorreu de forma satisfatória.

As membranas foram deixadas 1 hora à temperatura ambiente numa solução contendo TTBS (100mM tris-base; 0,9% NaCl; 0,05% Tween 20 e água) e 5% de BSA

para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em TTBS (TBS; 0,1% Tween 20) *overnight*. As membranas foram então novamente lavadas 3 vezes com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário de acordo com o anticorpo primário. Após 2 horas, as membranas foram lavadas 3 vezes com TTBS novamente. As membranas foram reveladas através do kit de quimioluminescência Immobilon (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA).

Para verificar se não houve variação na quantidade de proteína aplicada no gel e como controle negativo do ensaio, após a revelação com ECL, as membranas foram lavadas e incubadas por 30 minutos a 50°C com uma solução (*stripping buffer*) contendo 62,5mM Tris-HCl pH 6,7 e 2% SDS. Em seguida, foram lavadas com PBS (NaCl 136,89mM; KCl 2,86mM;KH₂PO₄ 1,47mM e Na₂HPO₄ 8,06mM) 2 vezes por 10 minutos e 2 vezes com TTBS. As membranas foram bloqueadas com 5% de BSA em TTBS como descrito anteriormente e incubadas com anticorpo contra β-actina ou αtubulina por 2h. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário por 2 horas e, após a lavagem com TTBS, foram reveladas. Novamente, a revelação foi feita através do kit de quimioluminescência Immobilon.

Proteínas-alvo	Anticorpo primário	Concentração
α 2-Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	Merck (AB9094)	1:1000
α3-Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	Santa Cruz (sc16052)	1:1000
TNFR2	Santa Cruz (sc7862)	1:500
p65	Santa Cruz (sc372)	1:1000
GFAP	Cell Signaling (D1F4Q)	1:1000
TrkB	Cell Signaling (80E3)	1:500
pERK	Merck (05-797R)	1:1000
tERK	Merck (05-1152)	1:1000
Вах	Cell Signaling (27725)	1:500
Bcl-2	Cell Signaling (2876S)	1:500
SOD-1	Santa Cruz (sc8637)	1:1000
рАМРК	Cell Signaling (T172)	1:1000
tAMPK	NovusBiologicals (NBP2-32746)	1:1000
β-actina	Sigma (A5441)	1:5000
α-tubulina	Santa Cruz (sc5286)	1:5000

Tabela 1: Informações sobre os anticorpos utilizados no Western Blotting.

4.8 Medida da concentração de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e BDNF

As concentrações de TNF (soro e hipocampo), IL-1 β (soro e hipocampo) e IL-6 (soro) foram medidas por meio do ensaio de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN,EUA). O kit de BNDF (soro, hipocampo e córtex) também foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Promega, Madison, WI, EUA).O kit de Multiplex (Merck Millipore) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante em amostras de córtex onde as citocinas analisadas foram: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10.

As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as respectivas proteínas recombinantes. No caso de proteínas no tecido, o
valor encontrado após o cálculo a partir da curva-padrão foi dividido pela concentração de proteína de cada amostra.

4.9 Análise comportamental

Figura 6: Delineamento experimental dos testes comportamentais.



Um dia após a injeção de LPS ou salina, os animais foram submetidos ao ensaio de campo aberto e no dia seguinte ao reconhecimento do local do objeto. A esquiva inibitória ocorreu 72 horas depois do tratamento e foi realizada durante dois dias onde foram avaliados os tempos de latência para cada grupo. Depois de 24 horas após a esquiva inibitória, os animais foram eutanasiados. Os animais utilizados para o comportamento são diferentes dos animais utilizados para os ensaios bioquímicos.

4.9.1 Teste de atividade locomotora: Campo Aberto

O campo aberto consiste em uma arena com parede de polipropileno de formato retangular, com 35 x 40 x 15. A atividade geral dos camundongos foi avaliada por meio do sistema de captação de imagens Anymaze (Stoelting, IL, EUA).

O usuário do sistema delimita de forma virtual uma área central e outra periférica da arena. O Anymaze é capaz de captar a imagem, monitorar os movimentos e a localização do animal através um sistema de subtração, que consiste na geração de contraste entre a cor da pelagem do animal (preta) e o interior do campo aberto. Esse contraste permite distinguir o animal do aparato e, portanto, visualizá-lo como um objeto em movimento.

Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e observados durante o período de 10 min. Foram registrados diversos parâmetros como a distância percorrida (total, na periferia e no centro), velocidade média, tempo em cada região da arena (no centro e na periferia), tempo de *freezing* e episódios de *freezing*. Após a captura da imagem, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool 5%, antes do próximo animal a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo animal anterior. O campo aberto foi realizado 24 horas depois do tratamento com salina ou LPS que correspondem a segunda injeção.

4.9.2 Teste comportamental: Reconhecimento do local do objeto

Esse ensaio tem como objetivo avaliar a memória espacial dependente do hipocampo. O ensaio foi baseado no artigo de Fergunson e Sapolski (116) e avalia o quanto animal explora o objeto que mudou de lugar. Na sala de experimentação existem pistas ambientais para que o animal perceba com mais facilidade que o objeto foi trocado de lugar. Um dia depois do ensaio de campo aberto, os animais foram colocados na mesma arena do campo aberto e expostos a dois objetos por 5 minutos. Depois de 15 minutos, os animais foram colocados novamente na arena por 5 minutos, porém, um dos objetos foi colocado em um novo local. O tempo em que os objetos foram explorados foi observado entre o objeto fixo e o que foi movido.

4.9.3 Teste comportamental: Esquiva Inibitória

Para avaliação da memória gerada por estímulo aversivo foi utilizado o método de esquiva inibitória. O equipamento de esquiva inibitória (Insight, São Paulo, Brasil) consiste numa arena fechada que apresenta dois compartimentos de mesmo tamanho que são divididos por uma porta-guilhotina. Um dos compartimentos é iluminado (claro) e o outro é escuro. Os animais foram colocados individualmente na parte iluminada da gaiola e como os animais possuem uma aversão ao ambiente claro, após a abertura da porta, eles migram para o compartimento escuro. Estando completamente do lado escuro, o animal recebeu um choque de 0,5 mA por 2 segundos, deflagrado pelas

barras metálicas localizadas no chão desse compartimento. Foi medido o tempo de latência, em segundos, para que os mesmos passassem para o compartimento escuro.

O tempo de latência máximo permitido para cada animal foi de 300 segundos. Foi realizado um treino (30 segundos de porta fechada) e 24 horas depois um teste para avaliação da memória de longa duração (10 segundos de porta fechada). O treino foi realizado no dia seguinte ao reconhecimento do local do objeto.

4.10 Análise dos resultados

Os dados decorrentes de *Western Blotting* foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando sistema de detecção Syngene G:BOX F3 Fluorescence Imaging System (Integrated Scientific Solutions, San Diego, CA, EUA) e o Image J (NIH, EUA), considerando o resultado reprodutível a partir de três replicações.

Os dados de ELISA e da atividade da NKA foram analisados através da análise das absorbâncias no espectrofotômetro no comprimento de onda necessário e convertidos de acordo com a curva-padrão. Os dados bioquímicos e comportamentais receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey, onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor p<0,05. Para o dado de peso foi utilizado o teste t não pareado para a análise. A análise da distância percorrida pelo tempo foi analisada pelo teste ANOVA de três vias seguida do teste de Tukey, onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor p<0,05.

5. RESULTADOS

5.1Padronização da genotipagem e peso dos animais

Num primeiro momento, precisávamos aprender a trabalhar com os animais TNFR1 KO (nocaute). Por isso, padronizamos a genotipagem dos animais demonstrado na figura 7, onde a primeira banda corresponde ao animal nocaute (TNFR1 KO) com 300 pares de base, a segunda ao heterozigoto com as duas bandas de 300 e 470 pares de base e na terceira o selvagem (WT) que apresenta 470 pares de base.

Figura 7: Genotipagem dos animais homozigotos TNFR1 KO (HO), heterozigotos (HT) e homozigoto selvagem (WT).



As bandas de 470 pares de base correspondem aos animais WT, a banda de 300 pares de base correspondem aos animais HO e as duas bandas juntas representam o animal HT.

Observamos que alguns animais das colônias eram bem menores em comparação com um animal C57BL6 comum, então, decidimos averiguar se haveria alguma diferença de peso entre os animais WT e TNFR1 KO. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, apesar de existir uma tendência em um menor peso no grupo TNFR1 KO (Figura 8).

Figura 8: Peso dos animais WT e TNFR1 KO.



Não ocorreram diferenças significativas de peso entre os grupos WT e TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=29) e analisados com teste t não pareado.

5.2Efeitos na atividade da NKA e na expressão de isoformas

Dostanic *et al.* (117), mostraram que a injeção intraperitoneal de ouabaína na dose de 300 µg/kg não altera a pressão arterial, o que é um importante indicativo de não inibição da NKA, o que demonstra que podemos utilizar uma dose até esse valor. Mesmo que a dose de 300 µg/kg seja uma dose segura para que a inibição da atividade NKA não ocorra, escolhemos a dose de 30 µg/kg para utilizar nos experimentos, pois nos estudos anteriores com ratos usamos doses baixas de ouabaína e queríamos garantir que não ocorresse a inibição da NKA.

Entretanto, resolvemos conferir se essa dose de ouabaína e se o próprio LPS realmente não alteravam a atividade da NKA. Por isso, o primeiro ensaio que realizamos foi o ensaio de atividade da NKA nos animais WT e TNFR1 KO (Figura 9).

Os animais WT e TNFR1 KO não mostraram nenhuma alteração na atividade total em nenhum dos grupos e o mesmo aconteceu nas atividades das isoformas: α_1 -NKA e $\alpha_{2,3}$ -NKA. Isso demonstra que a dose de ouabaína não inibe a atividade da NKA e que os efeitos da ouabaína são resultados apenas da ativação de cascatas de sinalização.

Figura 9: Resultados obtidos no ensaio da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (total, $\alpha 2 e \alpha 3$, $\alpha 1$) dos animais WT (A,B e C) e TNFR1 KO (D, E e F) em amostras de hipocampo tratados com ouabaína e LPS.



Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos e nas diferentes isoformas da Na⁺,K⁺-ATPase. Sendo (A,D) a atividade total da Na⁺,K⁺-ATPase, (B,E) corresponde a atividade das subunidades $\alpha_{2,3}$. - Na⁺,K⁺-ATPase e (C,F) apenas a atividade da subunidade α_1 -Na⁺,K⁺-ATPase. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em relação à média das amostras do grupo controle (salina+salina) (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

Mesmo não ocorrendo alterações na atividade da NKA, fomos verificar se havia alguma diferença na expressão das isoformas α_2 -NKA e α_3 -NKA entre os grupos tratados com ouabaína e LPS no animal WT e TNFR1 KO. Assim, o próximo passo foi observar se havia uma diferença na expressão dessas isoformas. A isoforma α_2 -NKA é apenas expressa nas células da glia (Figura 10) e a α_3 -NKA é expressa em neurônios (Figura 11) no hipocampo. Porém, não houve diferença na expressão de nenhuma das isoformas (α_2 –NKA e α_3 -NKA)entre os grupos tanto nos animais TNFR1 KO como no WT.

Figura 10: Resultados obtidos para a expressão de membrana da isoforma α_2 -NKApresente em astrócitos no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Não houve alterações na expressão desta isoforma por nenhum tratamento nos animais WT e TNFR1 KO. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=8) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

Figura 11: Resultados obtidos para a expressão de membrana da isoforma α_3 -NKApresente em neurônios no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Não houve alterações na expressão desta isoforma por nenhum tratamento nos animais WT e TNFR1 KO. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=8) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

5.3 Alterações na via do TNF

A falta do receptor TNFR1 poderia acarretar em mudanças no receptor TNFR2, por ser também um receptor de TNF, e seria uma forma de compensar a falta do outro receptor. Um dado interessante é que a expressão do TNFR2 é induzida diferentemente do TNFR1 que é constitutivo, então, fomos observar se haveria alguma alteração na expressão de TNFR2 nos tratamentos nos grupos WT e TNFR1 KO (Figura 12). Nos animais TNFR1 KO, ocorreu uma diminuição na expressão do TNFR2 quando tratado com LPS independente do tratamento com ouabaína, o que demonstra que provavelmente a falta do receptor TNFR1 também causa um problema no controle da expressão do TNFR2 quando tratado com LPS, o que não ocorre com o grupo WT. Outro fato interessante é que a ouabaína não consegue reverter este efeito, talvez devido a falta do TNFR1.



Figura 12: Resultados obtidos para a expressão de membrana do TNFR2 presente no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.

O tratamento com LPS independente do tratamento com a ouabaína diminui a expressão do receptor TNFR2 apenas no grupo TNFR1 KO. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO (*p<0,05). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=7) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Outro dado essencial para o projeto era entender como ficaria a liberação de TNF tanto no sistema periférico como no SNC. Então, medimos a resposta do TNF no soro (Figura 13) e no hipocampo (Figura 14) pelo ensaio de ELISA. Em trabalhos anteriores do laboratório (62), observamos que a resposta do TNF é diferenciada no soro em comparação com o hipocampo e queríamos ver se haveriam diferenças também pela deleção do TNFR1.

Nos grupos TNFR1 KO e WT, há um aumento do TNF no soro nos grupos tratados com o LPS independente do tratamento com a ouabaína. O tratamento com ouabaína no soro não alterou a liberação do TNF no WT e TNFR1 KO pelo LPS o que já era esperado, pois o mesmo foi visto nos ratos Wistar em nosso trabalho publicado anteriormente (62). Apenas no grupo TNFR1 KO, os grupos tratados com LPS ou

ouabaína+LPS possuem diferenças individuais significativas com os grupos controle (salina+salina) e ouabaína (ouabaína + salina), embora o efeito do LPS independente da ouabaína esteja presente em ambos os grupos. O interessante é que o LPS possui um aumento muito superior do TNF no soro no grupo TNFR1 KO em comparação com o grupo WT.





O tratamento com ouabaína no soro não alterou a liberação do TNF tanto no WT como no TNFR1 KO. Entretanto, o tratamento com LPS independente da ouabaína aumenta os níveis de TNF no grupo WT e TNFR1 KO. No grupo TNFR1 KO, este efeito é mais pronunciado do que no grupo WT. Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Sendo * o efeito do tratamento com LPS independente do tratamento com ouabaína (*p<0,05). Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo * o efeito do tratamento com ouabaína (*p<0,05). Sendo (B) análise da absorbância dos tratamento com ouabaína (*p<0,05). Sendo (B) análise da absorbância dos tratamento com ouabaína (*p<0,001). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/mL (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

Assim como no soro, os animais WT e TNFR1 KO se comportaram de forma diferente no hipocampo. No animal WT, o tratamento com ouabaína diminuiu o TNF independente do tratamento com LPS, mas o LPS não apresentou nenhuma diferença com relação ao controle.

No grupo TNFR1 KO, o LPS possui um efeito no aumento de TNF no hipocampo independente do tratamento com ouabaína. No grupo tratado com LPS ocorreu um aumento de TNF em comparação com o controle. Aparentemente, o efeito da ouabaína visto nos animais WT é perdido no animal TNFR1 KO, mostrando que pode existir uma relação entre o TNFR1 e a ouabaína.

Figura14: Resultados obtidos para a quantidade de TNF no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. O tratamento com ouabaína no hipocampo apenas no grupo WT diminuiu a liberação do TNF independentemente do tratamento com LPS (*p<0,05). Porém, no grupo TNFR1 KO, o LPS aumentou a liberação de TNF independente do tratamento com a ouabaína (*p<0,01). O grupo LPS é diferente em comparação ao controle (a p<0,05 vs. controle) e essa ativação não foi revertida pela ouabaína. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/µg (n=3) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

5.4 Alterações em outras citocinas pró-inflamatórias

Como ocorreram mudanças no perfil de resposta do TNF aos tratamentos entre os animais WT e TNFR1 KO. Resolvemos avaliar outra citocina inflamatória para observar se o mesmo comportamento iria se repetir. Escolhemos o IL-1 β , pois ele tem uma relação importante com o LPS e o TNF, mas também necessita da ativação da via do inflamassoma para ser liberado. O mesmo foi medido pelo kit de ELISA para amostras de soro (Figura 15) e de hipocampo (Figura 16).

Assim como no TNF, as respostas relacionadas ao IL-1βcentrais e periféricas são diferenciadas. No caso do soro, os animais WT não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos, o que pode mostrar as diferenças temporais de liberação entre o TNF e IL-1β. Nos animais TNFR1 KO, há uma diminuição do IL-1β pela ouabaína independente do tratamento com LPS.



Figura 15: Resultados obtidos para a liberação de IL-1β no soro de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.

Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. No grupo WT, não houve alteração entre os grupos. Porém, no grupo TNFR1 KO há um efeito geral da ouabaína independente do tratamento com LPS, onde há uma diminuição dos níveis de IL-1β. Sendo *(p<0,05). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/mL (n=3) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

No hipocampo, o grupo WT apresenta um aumento do IL-1β nos grupos ouabaína e LPS e também existe uma interação entre a ouabaína e o LPS, mostrando o efeito protetor da ouabaína (Figura 16). O que é interessante é que a falta do TNFR1 inviabiliza a resposta da ouabaína e do LPS na liberação do IL-1β e não há diferenças entre os grupos.

Figura 16: Resultados obtidos para a liberação de IL-1β no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. No grupo WT, os grupos ouabaína e LPS aumentam a liberação de IL-1 β em comparação com o grupo controle. Também há uma interação entre a ouabaína e o LPS. Sendo a,b vs controle (p<0,05) e *(p<0,01)corresponde a interação entre a ouabaína e o LPS. Nenhum tratamento alterou a liberação de IL-1 β nos animais TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/µg (n=3) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Medimos também os níveis da citocina IL-6 no soro dos animais para observar se há o mesmo comportamento do TNF e do IL-1β com relação à resposta da ouabaína e do LPS entre TNFR1 KO e WT (Figura 17). A ouabaína não reverteu o aumento da liberação de IL-6 no soro causada pelo LPS tanto no grupo WT quanto no TNFR1 KO, o que é um comportamento parecido com a liberação de TNF no soro.

No grupo WT, ocorreu uma interação entre a ouabaína e o LPS, mostrando que a ouabaína potencializou o efeito do LPS. O interessante é que ao mesmo tempo a ouabaína sozinha também possui um efeito, apesar de não apresentar diferença com o grupo controle. No grupo TNFR1 KO não ocorreu a potencialização da ouabaína, o que pode ser um efeito que necessita do receptor TNFR1 para que ocorra, como demonstrado em outro trabalho (117).

Figura 17: Resultados obtidos para a liberação de IL-6 no soro de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.

В

А



Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Há um efeito geral do LPS independentemente do tratamento com ouabaína (*p<0,0001) e uma interação entre a ouabaína e LPS (p<0,05). Os grupos LPS e ouabaína+LPS aumentam a liberação de IL-6 em comparação com o grupo controle e ouabaína. Sendo a vs controle, ouabaína e ouabaína +LPS (p<0,01), b vs controle, ouabaína e LPS. Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Há um efeito geral do LPS independentemente do tratamento com ouabaína (*p<0,0001). Os grupos LPS e ouabaína+LPS

aumentam a liberação de IL-6 em comparação com o grupo controle e ouabaína. Sendo a,b vs controle e ouabaína (p<0,001). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/mL (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

5.5 Resposta dos astrócitos e ativação do NF-κB

O LPS alterou a liberação de IL-1β e TNF no hipocampo. Então, resolvemos observar se existiam alterações na expressão de p65 ou ReIA (Figura 18), uma subunidade do NF-κB, no citoplasma e na expressão de GFAP (Figura 19), um marcador importante na ativação astrocitária.

A expressão do p65 no citoplasma só diminuiu no grupo WT quando ocorreu a interação entre ouabaína e LPS, o que demonstra que possivelmente a combinação dos dois gerou um provável aumento na translocação do p65 para o núcleo. O grupo TNFR1 KO não apresentou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 18: Resultados obtidos para a expressão de p65 (RelA) citoplasmático no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Há uma interação entre o tratamento com ouabaína e LPS que ocasiona a diminuição da expressão de p65 no citoplasma. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT e *p<0,05 (interação ente LPS e ouabaína). Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados

foram expressos em média \pm erro padrão (n=4 para WT e n=3 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

A expressão do GFAP não apresentou diferenças entre os tratamentos e os genótipos (Figura 19) o que representa que a ativação astrocitária no hipocampo como um todo não foi alterada. Porém, existe a possibilidade de apenas alguma região do hipocampo ter sido mais afetada que as outras e mesmo assim o efeito ter sido camuflado pelas outras regiões.

Figura 19: Resultados obtidos para a expressão de GFAP no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Não há nenhuma diferença significativa na expressão de GFAP no hipocampo entre os tratamentos ou entre a linhagem. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos foram expressos em média ± erro padrão(n=4) e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

5.6 Envolvimento da via TrkB/BDNF

O BDNF é um importante fator de crescimento no SNC. Existem alguns trabalhos que mostram a relação entre TNF e BDNF (118,119). Logo, seria relevante avaliar os níveis de BDNF no soro (Figura 20) e no hipocampo (Figura 21) frente ao LPS e a ouabaína. No soro, não apareceram diferenças significativas entre os

tratamentos, embora o comportamento do BDNF seja visivelmente diferente entre WT e TNFR1 KO o que pode ser resultado de um número baixo de amostras por grupo (n=3).

Figura 20: Resultados obtidos para os níveis de BDNF no soro de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Nenhum dos grupos apresentou diferenças nos níveis de BDNF no soro. Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/mL (n=3) e analisados com o ANOVA de duas vias.

Estudos anteriores do laboratório em hipocampo de ratos Wistar mostraram que a ouabaína e o LPS diminuem a expressão de BDNF, porém, quando os dois são administrados juntos, os níveis de BDNF voltam aos níveis do grupo controle. Embora o mesmo não tenha ocorrido nos hipocampo dos camundongos WT, os animais TNFR1 KO apresentaram um aumento nos níveis de BDNF no tratamento com LPS independente da administração da ouabaína (Figura 21) o que fortalece a ideia que existe um interação entre a liberação de BDNF e o receptor de TNFR1 (120).

Figura 21: Resultados obtidos para os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



No grupo WT, não há diferenças entre os grupos e nos camundongos TNFR1 KO, os grupos tratados com LPS apresentam um aumento do BDNF independente do tratamento com ouabaína (*p<0,05). Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/µg (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Como ocorreram alterações nos níveis de BDNF no hipocampo, resolvemos explorar se haveria diferenças importantes no receptor de BDNF, o TrkB (Figura 18). Apesar do aumento de BDNF no grupo TNFR1 KO quando tratado com LPS (independente do tratamento com ouabaína), não há alteração na expressão no TrkB. Porém, o grupo WT mostra alteração quando tratado com LPS independente do tratamento com ouabaína e também há uma diferença do grupo LPS com o grupo controle (salina+salina).

O fato do aumento da expressão de TrkB ser modulada pelo LPS ter ocorrido apenas no grupo WT demonstra que a via do BDNF de certa forma pode estar desregulada no TNFR1 KO, o que pode ser o motivo do aumento de BDNF encontrado nos animais tratados com o LPS (Figura 22).

Figura 22: Resultados obtidos para a expressão de TrkB na membrana no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Os animais WT apresentaram um aumento na expressão do receptor TrkB quando tratados com LPS independente do tratamento com a ouabaína e o grupo LPS é diferente do grupo controle. O grupo TNFR1 KO não apresentou diferenças entre os tratamentos. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT, onde a vs. controle (salina+salina) (p<0,05) e *p<0,05. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=3) e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

5.7 Vias de sobrevivência celular

Estudos na literatura demonstram que a ouabaína é capaz de ativar a via da ERK e que o LPS também pode atuar na mesma via. Entretanto, a fosforilação da ERK pela ouabaína em células ocorre de forma bem rápida (15 minutos). No projeto anterior do grupo, mostramos que o LPS aumentava a fosforilação de ERK (pERK) em uma cultura de células da glia após 1 hora. Porém, no modelo atual em camundongos não foi observada nenhuma alteração independente do genótipo (Figura23), o que pode ser decorrente de um tempo diferente de tratamento, por ser uma via de administração intraperitoneal ou devido à variação entre as amostras (121).

Figura 23: Resultados obtidos para a expressão da relação de pERK e tERK no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Em nenhum dos grupos, a relação entre a ERK fosforilada e total foi alterada pelos tratamentos com ouabaína e LPS. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=3) e analisados com o ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

A ouabaína possui um efeito anti-apoptótico que foi descrito por diversos grupos e pelo nosso próprio laboratório (27,30,31,41,61) onde a ouabaína diminuiu a relação Bax/Bcl-2 que estava aumentada pelo LPS. Observamos a expressão de Bcl-2 (Figura 24), Bax (Figura 25) e da razão do Bcl-2/Bax (Figura 26). Entretanto, não ocorreram alterações na expressão de Bcl-2, Bax e na razão do Bcl-2/Bax em nenhum dos grupos.

Figura 24: Resultados obtidos para a expressão do Bcl-2 no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.

54



Nenhum dos grupos apresentou diferenças na expressão do Bcl-2 no hipocampo. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Figura 25: Resultados obtidos para a expressão do Bax no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Nenhum dos grupos apresentou diferenças na expressão do Bax no hipocampo. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Figura 26: Resultados obtidos para a razão entre Bcl-2 e Bax no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Nenhum dos grupos apresentou diferenças da razão entre Bcl-2 e Bax no hipocampo. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

5.8 Estresse oxidativo

Resolvemos explorar se havia alguma alteração na expressão da enzima superóxido dismutase -1 (SOD-1) (Figura 27), pois a ouabaína pode levar a ativação de espécies reativas de oxigênio. Apenas no grupo WT ocorreu uma interação entre a ouabaína e o LPS que é perdida nos animais TNFR1 KO onde não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Figura 27: Resultados obtidos para a expressão de SOD-1 no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Há uma interação entre a ouabaína e LPS no grupo WT levando ao aumento da expressão de SOD-1. Entretanto o grupo TNFR1 KO não apresenta nenhuma diferença entre os tratamentos. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT e *p<0,05 (interação ente LPS e ouabaína). Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

5.9 Autofagia

Outro ponto que resolvemos observar é a fosforilação do AMPK (Figura 28) devido a importância da NKA no metabolismo. Porém, a falta do receptor TNFR1 não alterou de forma significativa a fosforilação do AMPK, assim como os tratamentos com LPS e ouabaína.

Figura 28: Resultados obtidos para a fosforilação do AMPK no hipocampo de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Nenhum dos grupos apresentou diferenças na fosforilação do AMPK no hipocampo. Sendo (A) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise densitométrica em relação à média das amostras do grupo controle e a radiografia com bandas representativas dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

5.10 Citocinas e BDNF no córtex

Resolvemos explorar se algumas respostas de citocinas e do BDNF ao LPS e a ouabaína encontradas no hipocampo eram parecidas com as respostas no córtex para os grupos WT e TNFR1 KO.

Na Figura 29, no grupo WT há um efeito geral do LPS independente do tratamento com ouabaína, aumentando os níveis de BDNF e o mesmo não ocorreu no grupo TNFR1 KO. Contudo, é interessante notar que no hipocampo o resultado foi o mesmo porém no grupo TNFR1 KO ao invés do grupo WT. Isso mostra como há diferenças importantes entre as regiões cerebrais a um mesmo estímulo.

Figura 29: Resultados obtidos para os níveis de BDNF no córtex de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS.



Os camundongos WT apresentam um aumento do BDNF nos grupos tratados com LPS independente do tratamento com ouabaína e o grupo ouabaína +LPS é diferente do grupo ouabaína. No grupo TNFR1 KO, não há diferenças entre os grupos Sendo (A) análise da absorbância dos tratamentos no grupo WT, a vs. ouabaína (p<0,05) e *(p<0,05). Sendo (B) análise da absorbância dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/µg (n=4) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Um kit Multiplex foi realizado para as citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Figura 30) com as amostras de córtex. Neste ensaio houve bastante variação entre as amostras e apenas a citocina IL-6 apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. Com relação às outras citocinas, apenas o IL-1 β apresentou níveis compatíveis com a literatura (122), enquanto o TNF e o IL-10 apresentaram níveis muito baixos de citocinas que parecem ser um problema no ensaio.

O efeito do LPS no aumento de IL-6 independente do tratamento com ouabaína foi encontrado nos grupos WT e TNFR1 KO. No grupo WT ainda há a interação entre a ouabaína e o LPS e o tratamento ouabaína+LPS é diferente de todos os outros tratamentos, mostrando um efeito da ouabaína no aumento de IL-6 quando em combinação com o LPS o que é perdido com a falta do receptor TNFR1.

Figura 30: Resultados obtidos para os níveis de TNF, IL-1β, IL-6 e IL-10 no córtex de camundongos WT e TNFR1 KO tratados com ouabaína e LPS pelo kit Multiplex.







С

G

0.025-

0.020-

0.005-

0.000-

5alina

0.020 0.015 0.015 0.010 −10 0.010







salina

OUA



WТ

Y⁵





н

F



В

D

Apenas a citocina IL-6 (E e F) apresentou diferenças estatísticas. No grupo WT há um aumento em IL-6 após o tratamento com LPS independentemente do tratamento com ouabaína e há uma interação entre a ouabaína e o LPS. No grupo TNFR1 KO, há também um aumento de IL-6 no tratamento com o LPS independente do tratamento com LPS, mas não há interação com a ouabaína. Sendo (A) análise da absorbância de TNF dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância de TNF dos tratamentos no grupo WT. Sendo (B) análise da absorbância de TNF dos tratamentos no grupo WT. Sendo (D) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo WT. Sendo (D) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo WT. Sendo (D) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo WT. Sendo (D) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo WT. Sendo (D) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (C) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (E) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (C) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (E) análise da absorbância de IL-1 β dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (G) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo TNFR1 KO. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo WT. Sendo (H) análise da absorbância de IL-10 dos tratamentos no grupo

5.11 Testes comportamentais

Alguns testes comportamentais e de locomoção foram realizados para entender melhor os dados bioquímicos e avaliar se ocorreram mudanças funcionais nos animais após os tratamentos. O primeiro teste realizado foi o campo aberto e o primeiro parâmetro analisado foi a distância percorrida com relação ao tempo em períodos de 100 segundos (Figura 31).

Após a análise do ANOVA de três vias, foi observado que no grupo WT há um efeito geral da ouabaína independente do LPS e o mesmo ocorre com o LPS. O tratamento com ouabaína aumenta a distância percorrida e o tratamento com LPS diminui a distância percorrida durante todo o tempo do teste (600 segundos), mostrando um perfil exploratório dos animais tratados com ouabaína.

O interessante é que o aumento da distância induzido pela ouabaína não foi observado no grupo TNFR1 KO, o que demonstra que é necessário o receptor TNFR1 para que o aumento da distância percorrida pela ouabaína ocorra. Entretanto, a diminuição da distância do LPS foi também vista no grupo TNFR1 KO.

Como esperado, em ambos os grupos há uma diminuição da distância percorrida de acordo com o tempo. As outras análises foram feitas no período de adaptação(de 0 a 300 segundos), porque depois deste tempo a distância percorrida se estabiliza e os animais perdem o interesse em explorar o ambiente.

Figura 31: Distância percorrida em metros para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de campo aberto em relação ao tempo.



В

No grupo WT há um efeito geral da ouabaína (p<0,001) independente do LPS e um efeito geral do LPS (p<0,05) independente da ouabaína. O tratamento com ouabaína aumenta a distância percorrida e o tratamento com LPS diminui a distância percorrida durante todo o tempo do teste (600 segundos). No grupo TNFR1 KO, apenas o tratamento com LPS possui um efeito geral independente do tratamento com a ouabaína (p<0,0001). Ambos os grupos apresentam um efeito do tempo em que quando maior o tempo , menor a distância percorrida (p<0,001) independente de qualquer tratamento. Sendo (A) tratamentos no grupo WT e (B) tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em metros(n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de três vias seguido do teste de Tukey.

Além da distância total percorrida é importante observar como o animal se locomove no centro e na periferia da arena, pois pode ser um indicativo importante de ansiedade (Figura 32). Como esperado, os animais andam mais na região da periferia da arena em comparação com o centro, porém o grupo TNFR1 KO apresenta uma diminuição da distância percorrida no tratamento com ouabaína independente do tratamento com LPS e do LPS independente do tratamento com ouabaína na região da periferia. Entretanto, não apareceram diferenças entre os grupos e tratamento na distância total e no centro percorrida.

Figura 32: Distância percorrida total, no centro e na periferia para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de campo aberto durante os 300 segundos iniciais.

А



Não há diferenças entre os tratamentos para a distância total e no centro percorrida em 300 segundos de teste. Há diferenças apenas no grupo TNFR1 KO para a distância percorrida na periferia onde a ouabaína (*p<0,05) diminui a distância percorrida na periferia independente do LPS e o LPS (**p<0,05) também diminui a distância percorrida na periferia independente da ouabaína. Na comparação entre cada tratamento, há uma diferença entre o tratamento ouabaína+LPS e o grupo controle. Sendo (A e B) a distância total percorrida nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente. Sendo (C e D) a distância

percorrida no centro nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente. Sendo (E e F) a distância percorrida na periferia nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente onde há um efeito geral da ouabaína e do LPS (p<0,05) na diminuição da distância percorrida e a vs controle. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em metros para a distância percorrida e em centímetros para as distâncias no centro e na periferia (n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Outro parâmetro essencial para observar as diferenças de locomoção entre os grupos e os tratamentos é a velocidade média (Figura 33). No grupo TNFR1 KO, foi observada uma diminuição da velocidade média pelo LPS independente do tratamento com a ouabaína, o que explica a menor distância percorrida na periferia no tratamento com LPS o que também demonstra que a falta do receptor leva a respostas diferenciadas na locomoção. O interessante é que o grupo WT não apresenta diferenças na velocidade média em nenhum dos tratamentos.

Figura 33: Velocidade média para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de campo aberto durante os 300 segundos iniciais.



A velocidade média no grupo TNFR1 KO foi diminuída pelo LPS independente do tratamento com a ouabaína (*p<0,05). Sendo (A) tratamentos no grupo WT e (B) tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em metros por segundo (n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Os tempos dos animais no centro e na periferia foram também analisados (Figura 34). Os animais ficam mais tempo no centro em comparação com o tempo na periferia. Entretanto, no grupo TNFR1 KO, o tratamento com LPS diminui o tempo no centro independente do tratamento com ouabaína, o que corrobora os dados de

diminuição da distância percorrida e a menor velocidade média pelo LPS no mesmo grupo. Este mesmo efeito do LPS não foi encontrado no grupo WT e no tempo na periferia para ambos os grupos.



Figura 34: Tempo no centro e na periferia para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de campo aberto durante os 300 segundos iniciais.

Apenas os animais do grupo TNFR1 KO apresentaram menor tempo no centro do campo aberto quando tratados com LPS o que não foi revertido com a ouabaína. Sendo (A e B) o tempo no centro em segundos nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente, onde o LPS diminuiu o tempo no centro independente do tratamento com ouabaína (*p<0,05). Sendo (C e D) o tempo na periferia em segundos nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em segundos (n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

Outro comportamento importante que deve ser avaliado no ensaio de campo aberto é o *freezing*. Os episódios e o tempo total de *freezing* foram avaliados (Figura 35), mas em nenhum grupo foram encontradas diferenças entre os tratamentos. O tempo de *freezing* no centro apresentou uma diminuição no grupo TNFR1 KO quando os animais eram tratados com LPS independente do tratamento com ouabaína. Este resultado corrobora o dado anterior onde o tempo no centro dos animais TNFR1KO tratados com LPS é menor. Então, este menor tempo de *freezing* provavelmente é resultado de um menor tempo no centro. O tempo de *freezing* na periferia é menor do que no centro independente do grupo e nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada (Figura 35).

Figura 35: Episódios e tempo (total, no centro e na periferia) para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de campo aberto durante os 300 segundos iniciais.





Е















F





Os 67

В

episódios de *freezing* no centro são menores no grupo TNFR1 KO quando tratados com LPS. Sendo (A e B) os episódios de *freezing* nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente. Sendo (C e D) o tempo de *freezing* total nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente. Sendo (E e F) o tempo de *freezing* no centro nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente, onde há um efeito geral do LPS (*p<0,05) na diminuição do tempo de *freezing* no centro. Sendo (G e H) o tempo de *freezing* na periferia nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente, onde há um efeito geral do LPS (*p<0,05) na diminuição do tempo de *freezing* no centro. Sendo (G e H) o tempo de *freezing* na periferia nos grupos WT e TNFR1 KO, respectivamente. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em segundos e episódios (n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

С

В

Na Figura 36, temos os dados obtidos das diferenças basais entre as linhagens (WT e TNFR1 KO) com relação ao centro e a periferia. Para tal, os dados sobre distância percorrida, o tempo de permanência em cada região e o tempo de *freezing* do grupo controle para WT e TNFR1 KO foram plotados de acordo com o centro e a periferia.

Como observado anteriormente (123), não há diferenças basais nos parâmetros apresentados entre o grupo WT e TNFR1 KO. Porém, ambos apresentam um tempo maior no centro do que na periferia e ainda assim a distância percorrida é maior na periferia. Isso pode ser explicado pelo fato de um maior aumento do tempo de *freezing* no centro em comparação com a periferia.

Figura 36: Distância percorrida, tempo e tempo de *freezing* no centro e na periferia de para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de campo aberto durante os 300 segundos iniciais.



Os animais apresentam um aumento na distância percorrida na periferia em comparação com o centro independente da linhagem. Os animais ficam menos tempo na periferia em comparação com o centro, o que também é independente da linhagem, enquanto há um maior tempo de *freezing* no centro em comparação com a periferia e é um efeito que independe da linhagem. Sendo (A) a distância percorrida em cada área da arena, (B) o tempo em cada área da arena e (C) tempo de freezing em cada área da arena(* p<0,0001). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em centímetros para a distâncias e em segundos para os tempos (n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

68

O reconhecimento do local do objeto (Figura 37) foi escolhido para ver se os tratamentos e o genótipo eram capazes de influenciar a memória espacial dos animais. Ao comparar o tempo de exploração do objeto fixo com o objeto móvel no momento do teste de reconhecimento, não houve nenhuma diferença entre os tratamentos e o genótipo. Porém, observamos que os animais não apresentam um grande interesse pelos objetos e por isso nenhuma diferença entre eles foi observada.

Figura 37:Tempo de interação com o objeto móvel e fixo para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de reconhecimento do local do objeto durante 5 minutos.



Não há diferenças entre a interação dos objetos fixo e móvel tanto nos grupos quanto nos tratamentos. Sendo (A) tratamentos no grupo WT e (B) tratamentos no grupo TNFR1 KO. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em segundos (n=8 para WT e n=11 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

No ensaio de esquiva inibitória (Figura 38), os animais controle e ouabaína+LPS no grupo TNFR1 KO, apresentaram um aumento no tempo de latência no segundo dia em comparação com o primeiro, o que demonstra que os animais lembraram que no lado escuro haveria o choque e o mesmo aconteceu com os animais OUA WT, mostrando que a ouabaína é capaz de melhorar o desempenho dos animais WT. O mesmo efeito somente com o tratamento com a ouabaína não é visto no grupo TNFR1 KO, o que mostra a necessidade do parcial do receptor TNFR1 para as ações da ouabaína.

Entretanto, era esperado um aumento no tempo de latência dos animais controle WT, mas existe uma tendência do aumento do tempo de latência neste tratamento no segundo dia. Outro dado interessante é que nenhum dos animais chegaram no tempo

limite de latência de 300 segundos, o que pode ser um indicativo de que o choque talvez não tenha sido exatamente na mesma intensidade que a descrita no equipamento de 0,5mA ou esta linhagem é mais resistente ao choque.

Figura 38:Tempo de latência para os animais WT e TNFR1 KO no ensaio de esquiva inibitória.



No grupo WT, os animais tratados com a ouabaína apresentam um maior tempo de latência no segundo dia de ensaio (*p<0,01 OUA dia 1 vs. dia 2) em comparação com o primeiro dia. Já no grupo TNFR1 KO, o grupo controle e ouabaína+LPS apresentam um aumento no tempo de latência no segundo dia de ensaio *(p<0,01) em comparação com o primeiro dia. Sendo (A) tratamentos no grupo WT *(p<0,01-ouabaína) e (B) tratamentos no grupo TNFR1 KO(a p<0,01- controle dia 1 vs dia 2 e b p<0,01 ouabaína+LPS dia 1 vs dia 2).Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média em segundos (n=9 para WT e n=12 para TNFR1 KO) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. A primeira barra de cada grupo representa o dia 1 do ensaio (treino) e a segunda barra representa o dia 2 do ensaio (teste).

6. DISCUSSÃO

As doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson têm uma importância enorme de cunho social e econômico na sociedade contemporânea, pois a população mundial apresenta um aumento na expectativa de vida. Nos Estados Unidos, o custo estimado para demências (incluindo a doença de Alzheimer) é de 243 bilhões de dólares por ano (124). No Brasil, estima-se que a taxa de prevalência de demência na população idosa acima de 65 anos aumente de 7,6 a 7,9% de 2010 a 2020, o que corresponde a 55 mil novos casos por ano (125). Então, encontrar moléculas e/ou compostos que impeçam a evolução e a cura dessas doenças são extremamente necessárias e desafiadoras (126,127).

Os casos com o início precoce estão geralmente relacionados a mutações em genes específicos e geralmente de origem familiar (autossômico dominante), porém, a grande maioria dos casos de início tardio é considerada de forma esporádica (128,129). Todas as doenças neurodegenerativas têm em comum a presença da neuroinflamação. Apesar de não haver informações suficientes para avaliar se a neuroinflamação se instala antes ou durante o desenvolvimento da doença (130).

A inflamação tem um papel tão importante nessas doenças que estudos conduzidos em modelos *in vivo* de doença de príon e Alzheimer mostraram que há um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Neste mesmo modelo, quando esses animais são desafiados com LPS, a produção dessas citocinas aumenta drasticamente (58).

Isso mostra que um ambiente já sensibilizado e estimulado apresenta respostas drásticas que podem ser relevantes para a sobrevivência neuronal que é comprometida nas doenças. Outro fato relevante é que a neuroinflamação pode desencadear delírio, que é um dos sintomas encontrados por pacientes com as doenças de Alzheimer ou de Parkinson (131,132), o que também é observado em animais tratados com LPS (133).

O TNF é um dos principais mediadores inflamatórios e na homeostasia tem um papel importante na plasticidade sináptica no SNC (134). Alguns medicamentos como anticorpos contra TNF foram desenvolvidos com o intuito de diminuir a inflamação em diversos tipos de doenças inflamatórias (97). Porém, a resposta ao TNF é muito mais complexa do que aparenta devido à presença dos receptores TNFR1 e TNFR2 que apresentam respostas e afinidades diferentes.

Logo, ter o TNF como alvo farmacológico por si só não é a melhor estratégia para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas, então, é mais interessante entender como os receptores funcionam e como estratégias terapêuticas podem ser exploradas visando a sinalização desta citocina.

O TNF também possui um papel importante na sepse que corresponde ao modelo de LPS que foi utilizado no projeto. Existe uma associação entre os níveis de mortalidade de pacientes com os altos níveis séricos de TNF. Foram realizados testes onde foi administrado TNF exógeno em humanos que resulta na síndrome da resposta

71
inflamatória sistêmica, onde os sintomas não podem ser diferenciados de um choque séptico (97).

Com o uso de animais transgênicos, foi possível evidenciar diferenças entre os receptores TNFR1 e TNFR2. Um tratamento com uma dose letal de LPS mostrou que os animais sem o receptor TNFR1 tinham uma maior taxa de sobrevivência em comparação com os animais selvagens, enquanto a falta do TNFR2 não interferia na sobrevivência (97).

Outro ponto relevante é que a falta do TNFR1 no tratamento com LPS diminui a permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que é pertinente no desenvolvimento da encefalopatia associada à sepse que é uma complicação da sepse que também leva a um aumento na taxa de mortalidade dos pacientes (97). Embora o TNFR1 seja descrito como mais relacionado aos efeitos deletérios do TNF, ainda há muita discussão a respeito da função de cada receptor na sinalização do TNF. É interessante lembrar que existe a necessidade da ativação da via TNF/TNFR1 para a regulação da plasticidade neuronal e também no acidente vascular cerebral para o reparo e neurogênese hipocampal (135,136).

No nosso caso, trabalhamos apenas com camundongos sem o receptor TNFR1 onde tentamos observar se a ouabaína precisava do TNFR1 para o aparecimento de seus efeitos protetores observados em modelos anteriores.

A etapa do projeto inicial era padronizar a genotipagem dos animais e aprender a trabalhar com a reprodução dos animais TNFR1 KO. O peso dos animais foi medido e não foram encontradas diferenças de peso entre o grupo WT e TNFR1 KO.

A escolha da concentração da ouabaína foi um desafio, pois não havia nenhuma previsão de como os camundongos reagiriam à ouabaína neste modelo. Então, foi utilizada uma concentração de ouabaína que não altera a atividade da NKA, pois o objetivo era observar o efeito protetor da ouabaína independente da inibição da NKA como nos trabalho anterior em ratos Wistar (62).

A concentração de 30µg/kg é dez vezes menor do que a dose utilizada na literatura (117) que não altera a atividade da NKA no tratamento agudo. Porém, este estudo foi realizado na linhagem Black Swiss, então, como a linhagem de fundo dos animais TNFR1 é diferente (C57BL6/J), é importante avaliar se os tratamentos com

ouabaína ou LPS não seriam capazes de alterar a atividade da NKA. O LPS geralmente em concentrações maiores que as escolhidas pode diminuir a atividade da NKA, o que está relacionado também ao seu efeito deletério (137,138). Todavia, nenhuma alteração de atividade (NKA total, α 2e3-NKA e α 1- NKA) entre os tratamentos foi encontrada independente do genótipo (WT ou TNFR1).

Outro ponto importante era saber se a falta do receptor TNFR1 poderia modificar a expressão de isoformas específicas da NKA, principalmente a isoforma α 2-NKA, que está relacionada com a resposta inflamatória (63). As isoformas são expressas de forma diferenciada de acordo com o tipo celular no SNC. A isoforma α 2-NKA, expressa em células da glia, e a isoforma α 3-NKA, expressa apenas em neurônios não apresentaram nenhuma diferença de expressão entre os diferentes tratamentos nos grupos WT e TNFR1 KO.

A expressão do receptor TNFR2 é mínima em situações fisiológicas e induzida em doenças neurológicas. Sua expressão é restrita à micróglia, astrócitos e oligodendrócitos e alguns tipos específicos de neurônios (139–141). O TNFR2 também associado a uma ação protetora por favorecer a proliferação de progenitores de oligodendrócitos e a remielinização (142). Então, a falta do receptor TNFR1 poderia desencadear um aumento na expressão de membrana do receptor TNFR2 como forma de compensar a perda da sinalização do TNF pelo TNFR1.

O interessante é que o grupo WT não apresentou nenhuma alteração na expressão de membrana de TNFR2 pelo tratamento com o LPS apesar da grande variação entre as amostras e o mesmo resultado foi encontrado por outro grupo que utilizou a mesma linhagem animal por PCR (143). Porém, no grupo TNFR1 KO há uma diminuição da expressão de TNFR2 quando os animais foram tratados com LPS independente do tratamento com ouabaína.

Isso demonstra que a sinalização do TNF está comprometida quando há um estímulo inflamatório, onde deveria haver um possível aumento na expressão do TNFR2 (144,145), há uma diminuição de sua expressão que não é revertida pela ouabaína. Entretanto é importante lembrar que os receptores TNFR (1 e 2) são clivados pelaTACE/ADAM17 e se transformam numa porção solúvel (sTNFR) que é um

importante mecanismo de auto-regulação para prevenir lesões e regular a resposta ao TNF(146).

Porém só medimos a porção de TNFR2 que estava na membrana. Pode ser que esta diminuição é um reflexo de uma maior clivagem do receptor pela TACE/ADAM17 como forma de controlar o aumento de TNF no tecido causado pelo LPS. Além disso, foi visto em macrófagos que a estimulação apenas de TNFR2 sensibiliza as células a necroptose mediada por TNFR1 via modulação da atividade de TRAF2-cIAP1/2. Então, a diminuição da expressão de TNFR2 quando há o tratamento com LPS pode ser resultado de uma regulação pela falta do próprio TNFR1 que não poderia levar as células à necroptose (147).

É interessante notar que não há um aumento de TNF no hipocampo no grupo WT, o que pode ser resultado dos mecanismos de auto-regulação totalmente funcionais com a presença dos dois receptores. A ouabaína possui um efeito geral na diminuição dos níveis de TNF no hipocampo independente do tratamento com LPS no grupo WT, o que não foi encontrado no grupo TNFR1 KO. Isso indica que essa diminuição é dependente de alguma forma da sinalização do TNFR1 para que ocorra.

A liberação do TNF no soro dos camundongos foi diferenciada em comparação com a resposta do TNF no hipocampo no grupo WT, onde houve um aumento do TNF com o tratamento com o LPS independente do tratamento com a ouabaína no soro. Porém, não houve o mesmo comportamento no hipocampo. Apesar do TNFR1 ser importante para a manutenção da permeabilidade da barreira hematoencefálica, ainda assim, a presença do receptor impediu o aumento dos níveis de TNF no hipocampo dos animais tratados com LPS.

No grupo TNFR1 KO, houve um aumento nos níveis de TNF tanto no soro quanto no hipocampo dos animais tratados com o LPS, mostrando respostas similares na periferia e no SNC que podem evidenciar que a falta de TNFR1 pode prejudicar os ajustes de permeabilidade da barreira hematoencefálica ou apenas ser um reflexo do aumento exacerbado de TNF na periferia que foi observado apenas no grupo TNFR1 KO e já foi observado em outros trabalhos (148,149).

Existem algumas possibilidades para responder como há um aumento de TNF tão alto no grupo TNFR1 KO. Uma delas é que a falta do receptor TNFR1 pode

acarretar numa diminuição dos sTNFR1 que são os receptores clivados pela TACE/ADAM17 e importantes para o controle da resposta fina do TNF. Outra possibilidade é que o pico de resposta do TNF seja modificado devido a falta do receptor TNFR1 KO, o que pode dar a ideia que os níveis de TNF são mais elevados no TNFR1 KO. Para avaliar essa hipótese seria necessário realizar uma curva tempo-resposta com o LPS e verificar os níveis de TNF nos grupos WT e TNFR1 KO. Ou ainda, a simples falta do receptor TNFR1 pode ter desencadeado uma diminuição na degradação do TNF.

Embora a ouabaína não tenha tido nenhum efeito protetor no soro, o mesmo já havia ocorrido no experimento com os animais Wistar (62) em que no sistema periférico a ouabaína não possui nenhum efeito protetor porém, no hipocampo apresenta o efeito protetor. A resposta da ouabaína não foi exatamente a mesma porque o LPS não aumentou os níveis de TNF no hipocampo como anteriormente.

A resposta ao LPS intraperitoneal leva à liberação de TNF pelos macrófagos na circulação sanguínea após 30 minutos e seu pico ocorre entre 60-90 minutos, o que ocorre antes de outros mediadores inflamatórios como IL-1 β (pouco tardio) e IL-6 (mais tardio) (150,151).

Como já dito anteriormente, o TNF é um dos principais mediadores inflamatórios na sepse e em doenças neurodegenerativas, todavia é importante também observar outras citocinas pró-inflamatórias que não fazem totalmente parte da via de sinalização do estudo. Por essa razão, o IL-1 β foi escolhido para ser avaliado, pois o padrão de liberação é diferente do TNF e sua ativação ocorre via inflamassoma (152). Outra citocina importante é a IL-6 cuja ativação é dependente de IL-1 β (153) e também é capaz de mostrar como a resposta inflamatória se apresenta na ausência e na presença do TNFR1.

Novamente, a resposta no sistema periférico foi diferente da resposta no hipocampo. No sistema periférico do grupo WT, o LPS aumentou os níveis de IL-1 β como esperado e a ouabaína também aumentou os níveis de IL-1 β como também visto no trabalho anterior do nosso grupo em cultura de células da glia (63) e em células ganglionares da retina (43) onde o IL-1 β tinha um papel na sobrevivência celular. Porém, o teste estatístico também demonstrou uma interação entre o LPS e a

ouabaína em que a ouabaína possui atividade protetora quando em junção com o tratamento com LPS. Enquanto no SNC, não há nenhuma diferença entre os tratamentos.

Entretanto, no grupo TNFR1 KO não há alteração nenhuma nos níveis de IL-1 β no SNC, o que pode ser resultado da falta da sinalização TNF/TNFR1 que não leva à liberação de IL-1 β ou até mesmo uma liberação mais rápida nos animais TNFR1 KO do que no WT que pode ter mascarado os resultados.

A liberação de IL-1β é diferente da liberação de TNF e IL-6, o que foi evidenciado experimento com BFA (inibição em um da via retículo endoplasmático/complexo de Golgi) em monócitos ativados com LPS, onde a liberação de TNF e IL-6 foi comprometida enquanto houve um aumento na liberação de IL-1ß (154,155). Talvez o fato de um aumento exacerbado nos níveis de TNF pode ter interferido na liberação de IL-1β. Os níveis de IL-1β também modulam a resposta do TNF onde há um aumento na expressão de TNFR2 e sTNFR2, porém esta mudança é dependente de TNFR1 (156), o que evidencia mais uma vez que no grupo TNFR1 KO esta modulação no ocorre.

Os efeitos da falta do receptor TNFR1 são evidentes tanto no SNC como no sistema periférico. No soro, o grupo TNFR1 KO apresentou uma diminuição dos níveis de IL-1 β quando os camundongos receberam o tratamento com ouabaína, o que pode ser resultado de níveis basais de IL-1 β mais elevados e por isso o efeito da ouabaína apareceu e o do LPS não foi evidenciado.

Em relação aos níveis de IL-6, diferentemente do IL-1β, foram observados no soro dos animais e em ambos os grupos um perfil de resposta muito parecido com o TNF onde o LPS aumenta a liberação de IL-6 e a ouabaína não consegue reverter o efeito. Todavia, no grupo WT há uma potencialização do efeito do LPS pela ouabaína, o que não ocorre no grupo TNFR1 KO. A liberação de IL-6 foi descrita na literatura como dependente da sinalização de TNF/TNFR1 através da ativação de NF-κB (157).

O NF-κB é um fator de transcrição formado por dímeros com diversas funções de acordo com as subunidades presentes. O LPS ativa o dímero p50 e p65 (ReIA), sendo o segundo um importante marcador deste dímero, pois tem a atividade transcricional devido à presença do TAD (domínio de transativação) (158).

O NF-κB se encontra no citoplasma celular ligado à proteína IκB. Quando há a ativação do receptor TLR4, há a ativação de uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação da proteína IKK que fosforila o IκB que é degradado via proteassoma. Então, após a separação do IκB, o NF-κB consegue translocar para o núcleo e ativar a transcrição de genes pró-inflamatório (146).

Foi observado que a quantidade de p65 no citoplasma de certa forma corrobora os dados do IL-6, onde há uma diminuição de p65 no citoplasma quando há a combinação de LPS e ouabaína no grupo WT. Logo, há um aumento na translocação de p65 quando há ouabaína e LPS juntos, justificando o fato da ouabaína potencializar o efeito do LPS. Porém, não há diminuição na expressão de p65 no citoplasma no grupo LPS, enquanto no grupo TNFR1 KO não há nenhuma alteração no p65. Entretanto, o entendimento das alterações neste fator de transcrição passa por uma avaliação futura da ativação do NF-κB pelo ensaio de gel de EMSA (137).

O GFAP é um bom indicativo de ativação de astrócitos que é um marcador importante em doenças neurodegenerativas (159). Na grande maioria dos artigos que avaliam a expressão do GFAP, o LPS foi administrado diretamente no hipocampo de animais pela técnica de estereotaxia e resultando na ativação de GFAP (160,161).

Os tratamentos nos nossos experimentos não alteraram a expressão do GFAP nos camundongos TNFR1 KO e WT, porém, a ativação do GFAP pode estar presente em alguma região específica do hipocampo e esse efeito pode estar mascarado por outras regiões que não possuem o mesmo efeito.

Um artigo publicado pelo nosso grupo (62) mostra que os animais tratados com LPS tem um aumento na ativação de GFAP no giro dentado e que a ouabaína era capaz de reverter essa ativação, mas nas outras regiões nem sempre a ativação era tão clara o que pode ter ocorrido no experimento realizado por *Western Blotting* onde as regiões não foram separadas. É curioso o fato do GFAP também ser encontrado aumentado no soro de pacientes em condições patológicas como traumatismo craniano e acidente vascular cerebral (162,163).

A não alteração na expressão de GFAP também foi vista em um estudo feito em humanos, onde foi injetado LPS intravenoso o que resultou no aumento de TNF, IL-6 e

IL-10.Porém, não houve alteração da expressão de GFAP no soro no período de 8 horas após a injeção (164).

BDNF é uma das neurotrofinas mais estudadas e está associada à sobrevivência e diferenciação neuronal, regulação de neurotransmissores e consequentemente da plasticidade neuronal. Por estar relacionado à plasticidade, o BDNF está associado a outros processos como memória e aprendizado e comportamento.

Há uma correlação entre os níveis de BDNF e melhor performance no aprendizado no teste comportamental do labirinto aquático de Morris. O mesmo trabalho demonstra que a expressão do TrkB (um dos receptores de BDNF) está diminuída no envelhecimento, evidenciando que a via do BDNF pode ser menos ativada no envelhecimento favorecendo o aparecimento das doenças neurodegenerativas ou relacionadas com a inflamação (165).

Diversos distúrbios no SNC estão associadas com inflamação e níveis de BDNF alterados (166), como depressão, epilepsia e em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e de Huntington (167). O BDNF é tão importante durante o desenvolvimento pós-natal que os animais BDNF^{-/-} morrem prematuramente (com aproximadamente 21 dias) (168). A falta de BDNF acarreta em alterações no número de neurônios dopaminérgicos na substância negra (169) e no desenvolvimento anormal do cerebelo (170).

Foi descoberto que no gânglio da raiz dorsal há um aumento na expressão de TrkB quando os animais foram submetidos ao tratamento com TNF (171) e aumento nos níveis de RNAm por hibridização foi visto após o tratamento com LPS (172). A expressão de TrkB no hipocampo do grupo WT tratado com LPS também está aumentada provavelmente devido ao aumento do TNF, mas este mecanismo de modulação da expressão de TrkB na membrana plasmática pode ser dependente de TNFR1, pois o mesmo aumento não foi observado nos camundongos TNFR1 KO.

Curiosamente, o BDNF não apresentou uma diminuição no grupo WT quando tratado com LPS, como demonstrado em outros trabalhos, mas isso pode ser apenas resultado de um número de amostras pequeno ou da concentração de LPS utilizada

(173). Entretanto, foi observado em ratos que injeções consecutivas de LPS durante 3 ou 7 dias não alteram os níveis de BDNF no hipocampo (174).

Os animais TNFR1 KO responderam de forma diferente ao LPS. Esse tratamento levou ao aumento da expressão de BDNF, mostrando que de alguma forma a ativação TNF/TNFR1 é responsável também pela modulação de BDNF no hipocampo. Este aumento dos níveis RNAm de BDNF pelo LPS também foi visto em animais TNFR1 KO, mas no modelo de sepse de ligadura e perfuração cecal (120).

A ação do BDNF na modulação da LTP e no aprendizado associado ao hipocampo é dependente da sinalização de ERK(1/2) (175). Além disso, a ERK é uma quinase importante que pode ser ativada pela ouabaína e também pode ser ativada pelo LPS e o TNFR1 (176).

Contudo, a ouabaína não ativou a ERK, mas isso era esperado, pois a ativação da ERK pela ouabaína é muito rápida na ordem de minutos (177), o que seria muito difícil de observar nas amostras que foram tratadas por um período de duas horas. No grupo WT, existe uma tendência do tratamento com LPS aumentar a fosforilação da ERK o que era esperado. Talvez com o aumento do número de amostras, a diferença apareça. Quanto ao grupo TNFR1 KO, esta tendência não aparenta ser a mesma.

Alguns estudos mostraram que a ouabaína atua na alteração da expressão de Bax e Bcl-2 (23,41,51,52,61) uma proteína pró- e anti-apoptótica, respectivamente. O Bax é capaz de fazer poros na mitocôndria liberando o citocromo c que leva à ativação da via das caspases, enquanto o Bcl-2 tenta impedir que a formação dos poros ocorra (178).

O Bcl-2 e Bax não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos tratados. Porém, é importante avaliar a razão entre Bcl-2 e Bax, como foi avaliado num trabalho anterior do nosso grupo onde a ouabaína mostrou um efeito protetor perante o LPS. Entretanto, a análise foi realizada em níveis de RNAm, o que não necessariamente garante que a diferença também poderia ser encontrada na expressão protéica, porque depende do tempo que demora para que o RNAm seja traduzido para proteínas e também se não há mecanismos pós-transcricionais de regulação da expressão destas proteínas através de miRNA. Nos experimentos com o grupo TNFR1 KO existe uma tendência em que a ouabaína combinada com LPS diminua a relação Bcl-2/Bax, o que não ocorre no grupo WT, mostrando que pode haver um desequilíbrio na resposta com a falta de TNFR1.

A expressão da SOD1 foi avaliada também pela ouabaína por interferir na produção de espécies reativas de oxigênio e na apoptose, pois interage com proteínas da família BCL-2. A SOD1 é extremamente relevante na esclerose lateral amiotrófica, onde foram encontradas mutações relacionadas à doença (179).

No grupo WT, há apenas uma interação entre a ouabaína e o LPS, entretanto não há nenhuma diferença nos tratamentos com ouabaína ou LPS isolados. Parece que há uma tendência em uma diminuição da SOD1 com a ouabaína e o LPS que é revertida quando os dois são administrados juntos. Esta interação não é vista no grupo TNFR1, o que revela que o efeito da ouabaína é perdido. Independente dos resultados da expressão protéica da SOD1, vale lembrar que a atividade da SOD1 não foi medida e pode estar alterada.

A AMPK é uma proteína importante para a regulação do metabolismo e da produção de ATP, o que é imprescindível para a atividade da NKA. Além disso, a sua fosforilação é um indicativo importante para observar se há autofagia e crescimento celular (180). Foi visto também que a AMPK pode ser inibida pela ouabaína em altas concentrações, então, a AMPK é um marcador importante para reforçar que a dose de ouabaína utilizada não inibe a NKA (180).

O córtex foi escolhido para fazer a análise do perfil de algumas citocinas por ter uma relação importante com a memória assim como o hipocampo. Embora de forma diferente, por exemplo, o córtex pré-frontal tem relevância na recuperação da memória, enquanto o hipocampo tem mais relevância na consolidação da memória e o mais fascinante é que precisamos da comunicação entre as duas regiões para que a memória seja armazenada e recuperada quando necessário(181).

É interessante observar como cada região responde de forma diferente a um mesmo estímulo. No modelo de sepse, foi observado que a inibição da NKA ocorre mais rapidamente no córtex em comparação com o hipocampo (182). Além disso, o hipocampo parece ser mais suscetível à neuroinflamação crônica por ter um maior número de receptores de NMDA (183). No córtex, o grupo WT apresentou um aumento

de BDNF quando os camundongos foram tratados com LPS independente do tratamento com a ouabaína, o que não ocorreu no grupo KO, que foi justamente o contrário do visto no hipocampo.

Entretanto, na literatura foi visto que os níveis de BDNF estão diminuídos no córtex após o tratamento com LPS, porém o mesmo foi feito 7 horas depois da injeção intraperitoneal do LPS (173) e os níveis de RNAm do BDNF são menores após 4 horas da injeção de LPS no hipocampo (172). Porém, nossos resultados mostraram que em 2 horas, o BDNF pode responder de forma a tentar proteger o córtex dos efeitos lesivos do LPS como visto em cultura primária de micróglia de córtex que depois pode levar a depleção de BDNF por diminuir os níveis de RNAm do BDNF (184).

Os resultados do kit de Multiplex para córtex apresentaram uma grande variação entre as amostras para algumas citocinas. Até mesmo outro trabalho na literatura apresenta algumas variações entre as amostras, mesmo para um número amostral maior (185). O IL-1 β não possui diferenças entre os grupos e não há um aumento quando tratado com LPS, o que também foi observado em outro trabalho (122).

Enquanto o LPS, como esperado em 2 horas, aumenta o IL-6 tanto no grupo WT e TNFR1 KO e o efeito não é revertido pela ouabaína em ambos os casos. No grupo WT ocorre uma interação entre a ouabaína e o LPS, o que aumenta os níveis de IL-6, mas o mesmo não ocorre no animal TNFR1 KO, o que demonstra mais uma vez que os efeitos da ouabaína em sua grande maioria precisam da sinalização do TNFR1. A ouabaína em cultura de células é capaz de aumentar os níveis de IL-6 (186) e não necessariamente o aumento de IL-6 é prejudicial ao SNC.

O IL-6 tem um papel dual em lesões ou em doenças e, principalmente, o seu efeito depende do tipo neuronal (187). Foram descritos efeitos protetores do IL-6 ao diminuir a liberação de glutamato e consequentemente a atividade neuronal no córtex de ratos (188) e isso pode ser devido ao aumento de BDNF (189), o que se enquadra nos achados do córtex em relação aoIL-6 e BDNF. Além disso, em animais IL-6 KO foi demonstrado que há um comprometimento na resposta inflamatória, na cicatrização e reparo após um dano no SNC (190,191).

Os dados comportamentais são extremamente importantes para observar os resultados das mudanças encontradas nos ensaios bioquímicos. O fato da ouabaína ter

aumentado a distância percorrida independente do LPS era esperado, pois dados na literatura apontam para o aumento da locomoção em animais tratados com ouabaína (192–194).

Porém, os trabalhos que observaram este fenômeno injetaram ouabaína intracerebroventricularmente em altas concentrações, que alteram a atividade da NKA, para tentar mimetizar mania nos animais. Então, pela primeira vez, mostramos que há um aumento na distância percorrida no ensaio de campo aberto pela ouabaína sem alteração na atividade da NKA, o que pode ser relacionado com um aumento de exploração do ambiente pelos animais.

Isso pode ser resultado parcial do aumento de IL-1β no hipocampo causado pela ouabaína, o que foi visto também após a injeção intraperitoneal de IL-1β (195). O mais interessante é que este efeito de locomoção é perdido no grupo TNFR1 KO, mostrando que o TNFR1 pode ser essencial para o aumento da locomoção.

Os grupos WT e TNFR1 KO apenas com o tratamento com salina (controle) não apresentaram diferenças nos primeiros 300 segundos de ensaio entre o centro e periferia (distância percorrida, tempo de permanência e tempo de *freezing*). Em ambos os grupos, a distância percorrida foi maior na periferia e o tempo de *freezing* menor na periferia onde os animais se sentem mais seguros.

O tempo no centro foi maior do que na periferia, o que demonstra que os animais provavelmente não são ansiosos sem nenhum tratamento (195). O mesmo foi encontrado em um estudo que comparou animais TNFR1 e TNFR2 KO com WT no ensaio de labirinto de cruz elevado e apenas o TNFR2 KO mostrou um perfil mais ansioso (123).

Entretanto, os animais TNFR1 KO apresentaram uma diminuição da distância percorrida na periferia tanto com o tratamento com a ouabaína como com o LPS. Essa diminuição apresentada pelo LPS e também no tratamento ouabaína+LPS pode ser reflexo da diminuição da velocidade média.

O tempo no centro também foi menor com o tratamento com LPS no TNFR1 KO. Este comportamento de tigmotaxia (maior proximidade da paredes da arena) demonstra um perfil de ansiedade quando tratados com o LPS e que também acarreta

em um menor tempo de *freezing* no centro apenas pelo fato de permanecer um menor tempo no centro.

É interessante que mesmo os animais TNFR1 KO sendo mais resistentes a uma concentração letal de LPS (196), ainda sofrem mais os efeitos do LPS do que os animais WT. Isso mais uma vez prova a importância do TNFR1 para a resolução da inflamação e nas respostas comportamentais. É importante ressaltar que serão necessários mais ensaios comportamentais para confirmar alguns comportamentos como o aumento da ansiedade por LPS no TNFR1 KO e alguns parâmetros são importantes para a avaliação dos resultados como iluminação, tamanho e tipo de arena e a linhagem dos animais, por exemplo (197).

O ensaio de reconhecimento do local do objeto parece não ser um ensaio muito sensível para revelar diferenças nesses animais, pois nem os animais controles apresentaram alterações importantes no comportamento nesse ensaio, o que demonstra uma possível falta de interesse e/ou motivação pelos objetos, semelhante ao observado com os duplos nocautes (TNFR1/TNFR2) no labirinto aquático (110).

Embora tenham ocorrido diferenças na locomoção em alguns aspectos pelo ensaio de campo aberto, as diferenças no ensaio de esquiva inibitória não podem ser consideradas irrelevantes. Primeiro, o efeito do LPS deve estar mais brando com relação à velocidade de locomoção principalmente no grupo TNFRI KO, porque após 3 dias de experimento, inicia-se a fase de resolução da inflamação e consequentemente a ativação da micróglia é menor (179,198). Outro importante aspecto é o fato de, no grupo TNFR1 KO, o tratamento com LPS ter praticamente o mesmo tempo de latência no dia do teste e no dia do treino, o que não seria possível se houvessem alterações de locomoção.

O fato do tempo de latência ter sido relativamente baixo no segundo dia (teste) mostrou que a linhagem dos animais pode ter menor sensibilidade à dor ou que o choque do equipamento foi um pouco menor do que o necessário para causar uma memória aversiva e consequente aumento no tempo de latência no segundo dia em relação ao dia anterior no grupo controle WT. Foi visto que os níveis de corticosterona na linhagem C57BL/6J são aumentados após um choque de 0,3mA por 2 segundos. Porém, este aumento é menor do que outras linhagens como o BALBc e os níveis de

corticosterona voltam aos níveis basais em apenas 30 minutos, o que poderia impedir a formação da memória (199). Além disso, poderiam ser realizados testes relacionados com dor até mesmo com o próprio aparato de esquiva inibitória para verificar se há efeito no limiar de dor relacionado à linhagem através da curva de sensibilidade (200).

Entretanto, o grupo ouabaína WT apresentou um aumento no tempo de latência, o que evidencia o papel relevante da ouabaína na memória. É interessante que a ouabaína possui efeitos antinociceptivos, mostrando que a resposta da ouabaína não é fruto do aumento da sensibilidade à dor (54,201,202).

No grupo TNFR1 KO, o efeito da ouabaína desapareceu, evidenciando um *crosstalk* entre as vias da ouabaína e do TNF/TNFR1. Porém, este efeito também pode ocorrer via TLR4 devido ao aumento do tempo de latência no grupo ouabaína+LPS TNFR1 KO.

7. CONCLUSÃO

Apesar do TNFR1 ter o domínio de morte, a ativação de sua via é importante para que ocorra o *feedback* negativo desse processo, então, os animais com deleção do TNFR1 apresentam uma perda do controle da resposta inflamatória causada pelo LPS principalmente ligada ao TNF e isso acarreta em modificações comportamentais. Os animais TNFR1 KO têm mais dificuldade em degradar o TNF no soro em comparação com os animais WT provavelmente devido à falta dos receptores sTNFR1 e isso altera as respostas na esquiva inibitória e no campo aberto. Embora o efeito protetor da ouabaína não tenha sido evidenciado, alguns efeitos da ouabaína são de alguma forma dependente de TNFR1. Isso demonstra que o TNFR1 também participa de mecanismos finos que são importantes para a recuperação após a resposta inflamatória no SNC e que o efeito protetor da ouabaína parece estar relacionado com a via do TNFR1.

REFERÊNCIAS

- 1. Nesher M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. Life Sci. 2007 May;80(23):2093–107.
- 2. Hamlyn JM, Blaustein MP. Endogenous Ouabain: Recent Advances and Controversies. Hypertens (Dallas, Tex 1979). 2016 Sep;68(3):526–32.
- 3. Hamlyn JM, Linde CI, Gao J, Huang BS, Golovina VA, Blaustein MP, et al. Neuroendocrine humoral and vascular components in the pressor pathway for brain angiotensin II: a new axis in long term blood pressure control. PLoS One. 2014;9(9):e108916.
- 4. Murrell JR, Randall JD, Rosoff J, Zhao J, Jensen R V, Gullans SR, et al. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. Circulation. 2005 Aug;112(9):1301–8.
- 5. Pavlovic D. The role of cardiotonic steroids in the pathogenesis of cardiomyopathy in chronic kidney disease. Nephron Clin Pract. 2014;128(1–2):11–21.
- 6. Schoner W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2000;108(7):449–54.
- 7. Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Haupert GTJ, et al. On the structure of endogenous ouabain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun;96(12):6654–9.
- 8. Furstenwerth H. Ouabain the insulin of the heart. Int J Clin Pract. 2010 Nov;64(12):1591–4.
- 9. SKOU JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta. 1957 Feb;23(2):394–401.
- 10. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. J Bioenerg Biomembr. 1992 Jun;24(3):249–61.
- 11. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 2):F633-50.
- 12. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2001 Oct;21(10):1133–45.
- 13. Gillis RA, Quest JA. The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis. Pharmacol Rev. 1979 Mar;31(1):19–97.
- 14. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova O V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. Pharmacol Rev. 2009 Mar;61(1):9–38.
- 15. Lingrel JB. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. J Bioenerg Biomembr. 1992 Jun;24(3):263–70.
- 16. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. Annu Rev Biochem. 2002;71:511–35.
- 17. Fambrough DM. The sodium pump becomes a family. Trends Neurosci. 1988 Jul;11(7):325–8.
- 18. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na+,K(+)-ATPase. J Biol Chem. 1994 Aug;269(31):19659–62.
- 19. Levenson R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1994;123:1–45.
- 20. Sweadner KJ. Isozymes of the Na+/K+-ATPase. Biochim Biophys Acta. 1989

May;988(2):185-220.

- 21. Blanco G, DeTomaso AW, Koster J, Xie ZJ, Mercer RW. The alpha-subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the beta-subunit. J Biol Chem. 1994 Sep;269(38):23420–5.
- 22. Pressley TA. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. Miner Electrolyte Metab. 1996;22(5–6):264–71.
- 23. Dostanic-Larson I, Van Huysse JW, Lorenz JN, Lingrel JB. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov;102(44):15845–50.
- 24. Clausen M V, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. Front Physiol. 2017;8:371.
- 25. Sanchez G, Nguyen A-NT, Timmerberg B, Tash JS, Blanco G. The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. Mol Hum Reprod. 2006 Sep;12(9):565–76.
- 26. Viola MS, Rodriguez de Lores Arnaiz G. Brain Na+, K+-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. Life Sci. 2007 Jun;81(3):228–33.
- 27. Dobretsov M, Stimers JR. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. Front Biosci. 2005 Sep;10:2373–96.
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na+/K+ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. Nat Genet. 2003 Feb;33(2):192–6.
- 29. Kinoshita PF, Leite JA, Orellana AMM, Vasconcelos AR, Quintas LEM, Kawamoto EM, et al. The Influence of Na(+), K(+)-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. Front Physiol. 2016;7:195.
- 30. de Carvalho Aguiar P, Sweadner KJ, Penniston JT, Zaremba J, Liu L, Caton M, et al. Mutations in the Na+/K+ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. Neuron. 2004 Jul;43(2):169–75.
- 31. Heinzen EL, Swoboda KJ, Hitomi Y, Gurrieri F, Nicole S, de Vries B, et al. De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. Nat Genet. 2012 Sep;44(9):1030–4.
- 32. Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. J Neurosci. 2007 Jan;27(3):616–26.
- 33. Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, et al. alpha-synuclein assemblies sequester neuronal alpha3-Na+/K+-ATPase and impair Na+ gradient. EMBO J. 2015 Oct;34(19):2408–23.
- 34. Dickey CA, Gordon MN, Wilcock DM, Herber DL, Freeman MJ, Morgan D. Dysregulation of Na+/K+ ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. BMC Neurosci. 2005 Feb;6:7.
- 35. Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, Shapiro J, et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. J Biol Chem. 2007 Apr;282(14):10585–93.
- 36. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na+/K+-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem. 2002

May;277(21):18694–702.

- 37. Aizman O, Áperia A. Na,K-ATPase as a signal transducer. Ann N Y Acad Sci. 2003 Apr;986:489–96.
- 38. Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem. 2002 May;269(10):2434–9.
- 39. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. J Intern Med. 2007 Jan;261(1):44–52.
- 40. Liu XL, Miyakawa A, Aperia A, Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. Neuroreport. 2007 Apr;18(6):597–600.
- 41. Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amara FG, et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-kappaB in the rat hippocampus. J Neurosci Res. 2012 Jan;90(1):213–28.
- 42. de Sa Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AMM, Curi R, et al. Ouabain activates NFkappaB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. Neuropharmacology. 2013 Oct;73:327–36.
- 43. Salles von-Held-Ventura J, Mazala-de-Oliveira T, Candida da Rocha Oliveira A, Granja MG, Goncalves-de-Albuquerque CF, Castro-Faria-Neto HC, et al. The trophic effect of ouabain on retinal ganglion cells is mediated by IL-1beta and TNF-alpha. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep;478(1):378–84.
- 44. de Rezende Correa G, Araujo dos Santos A, Frederico Leite Fontes C, Giestal de Araujo E. Ouabain induces an increase of retinal ganglion cell survival in vitro: the involvement of protein kinase C. Brain Res. 2005 Jul;1049(1):89–94.
- 45. Orellana AM, Leite JA, Kinoshita PF, Vasconcelos AR, Andreotti DZ, de Sa Lima L, et al. Ouabain increases neuronal branching in hippocampus and improves spatial memory. Neuropharmacology. 2018 Sep;140:260–74.
- 46. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. J Neurosci. 2002 Feb;22(4):1350–62.
- 47. Amodeo DA, Grospe G, Zang H, Dwivedi Y, Ragozzino ME. Cognitive flexibility impairment and reduced frontal cortex BDNF expression in the ouabain model of mania. Neuroscience. 2017 Mar;345:229–42.
- 48. Hodes A, Rosen H, Deutsch J, Lifschytz T, Einat H, Lichtstein D. Endogenous cardiac steroids in animal models of mania. Bipolar Disord. 2016 Aug;18(5):451–9.
- 49. Valvassori SS, Arent CO, Steckert A V, Varela RB, Jornada LK, Tonin PT, et al. Intracerebral Administration of BDNF Protects Rat Brain Against Oxidative Stress Induced by Ouabain in an Animal Model of Mania. Mol Neurobiol. 2015 Aug;52(1):353–62.
- 50. Garcia IJP, Kinoshita PF, de Oliveira Braga I, Parreira GM, Mignaco JA, Scavone C, et al. Ouabain attenuates the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in the cerebellum of rats. J Cell Biochem. 2018;119(2).
- 51. Golden WC, Martin LJ. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo. Neuroscience. 2006;137(1):133–44.
- 52. Burlaka I, Liu XL, Rebetz J, Arvidsson I, Yang L, Brismar H, et al. Ouabain protects against Shiga toxin-triggered apoptosis by reversing the imbalance between Bax and Bcl-xL. J Am Soc Nephrol. 2013 Sep;24(9):1413–23.

- 53. Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjo S, Nanou E, Estrada M, et al. Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Feb;106(7):2212–7.
- 54. de Vasconcelos DIB, Leite JA, Carneiro LT, Piuvezam MR, de Lima MRV, de Morais LCL, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. Mediators Inflamm. 2011;2011:912925.
- 55. Orellana AM, Kinoshita PF, Leite JA, Kawamoto EM, Scavone C. Cardiotonic Steroids as Modulators of Neuroinflammation. Front Endocrinol (Lausanne). 2016;7:10.
- 56. Forshammar J, Block L, Lundborg C, Biber B, Hansson E. Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na+/K+-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. J Biol Chem. 2011 Sep;286(36):31586–97.
- 57. Glaros TG, Chang S, Gilliam EA, Maitra U, Deng H, Li L. Causes and consequences of low grade endotoxemia and inflammatory diseases. Front Biosci (Schol Ed). 2013 Jan;5:754–65.
- 58. Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. Glia. 2013 Jan;61(1):71–90.
- 59. Tonin PT, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Varela RB, Teixeira AL, et al. Effects of ouabain on cytokine/chemokine levels in an animal model of mania. J Neuroimmunol. 2014 Nov;276(1–2):236–9.
- 60. Yang Q, Huang W, Jozwik C, Lin Y, Glasman M, Caohuy H, et al. Cardiac glycosides inhibit TNF-alpha/NF-kappaB signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul;102(27):9631–6.
- 61. Ye J, Chen S, Maniatis T. Cardiac glycosides are potent inhibitors of interferonbeta gene expression. Nat Chem Biol. 2011 Jan;7(1):25–33.
- 62. Kinoshita PF, Yshii LM, Vasconcelos AR, Orellana AMM, Lima L de S, Davel APC, et al. Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. J Neuroinflammation. 2014 Dec;11:218.
- 63. Kinoshita PF, Yshii LM, Orellana AMM, Paixao AG, Vasconcelos AR, Lima L de S, et al. Alpha 2 Na(+),K(+)-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. Sci Rep. 2017 Jul;7(1):4894.
- 64. Chen Y, Huang W, Yang M, Xin G, Cui W, Xie Z, et al. Cardiotonic Steroids Stimulate Macrophage Inflammatory Responses Through a Pathway Involving CD36, TLR4, and Na/K-ATPase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Aug;37(8):1462–9.
- 65. Watson RW, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. J Leukoc Biol. 1994 Jul;56(1):95–103.
- 66. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 1994 Feb;8(2):217–25.
- 67. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010 Mar;140(6):805–20.
- 68. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. Cold Spring

Harb Perspect Biol. 2009 Sep;1(3):a001271.

- 69. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. Clin Chim Acta. 2002 Sep;323(1–2):59–72.
- 70. Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. Neurosci Biobehav Rev. 1988;12(2):123–37.
- 71. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. Eur J Pharmacol. 2004 Oct;500(1–3):399–411.
- 72. Cunningham C, Campion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, et al. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. Biol Psychiatry. 2009 Feb;65(4):304–12.
- 73. Jalleh R, Koh K, Choi B, Liu E, Maddison J, Hutchinson MR. Role of microglia and toll-like receptor 4 in the pathophysiology of delirium. Med Hypotheses. 2012 Dec;79(6):735–9.
- 74. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, et al. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. Nat Cell Biol. 2007 Sep;9(9):1081–8.
- 75. Green HF, Nolan YM. Inflammation and the developing brain: consequences for hippocampal neurogenesis and behavior. Neurosci Biobehav Rev. 2014 Mar;40:20–34.
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. J Neurosci Res. 2006 Mar;83(4):557– 66.
- 77. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. Brain Behav Immun. 2011 Feb;25(2):181–213.
- 78. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. Neuropharmacology. 2014 Jan;76 Pt C:639–56.
- 79. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. J Pharmacol Sci. 2003 Apr;91(4):267–70.
- 80. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. Blood. 2012 Jan;119(3):651–65.
- 81. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxininduced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Sep;72(9):3666–70.
- 82. Creaven PJ, Plager JE, Dupere S, Huben RP, Takita H, Mittelman A, et al. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. Cancer Chemother Pharmacol. 1987;20(2):137–44.
- 83. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. Annu Rev Med. 1994;45:491–503.
- 84. Wajant H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. Cell Death Differ. 2015 Nov;22(11):1727–41.
- 85. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ. 2003 Jan;10(1):45–65.
- 86. Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. Nat Rev Drug Discov. 2013 Feb;12(2):147–68.
- 87. Croft M, Duan W, Choi H, Eun S-Y, Madireddi S, Mehta A. TNF superfamily in

inflammatory disease: translating basic insights. Trends Immunol. 2012 Mar;33(3):144–52.

- Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Sedy JR, Ware CF. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. Immunity. 2016 May;44(5):1005– 19.
- 89. Xu Y, Chang L, Huang A, Liu X, Liu X, Zhou H, et al. Functional Detection of TNF Receptor Family Members by Affinity-Labeled Ligands. Sci Rep. 2017 Jul;7(1):6944.
- 90. Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. Mediators Inflamm. 2014;2014:861231.
- 91. Frankola KA, Greig NH, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2011 May;10(3):391–403.
- 92. Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS Demyelination with TNF-alpha Blockers. Curr Neurol Neurosci Rep. 2017 Apr;17(4):36.
- 93. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature. 1994 Aug;370(6490):555–7.
- 94. Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. J Immunol. 2006 Jan;176(2):721–5.
- 95. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, et al. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. EMBO J. 1990 Oct;9(10):3269–78.
- 96. Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Aderka D, Kemper O, Hornik V, et al. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. Agents Actions Suppl. 1991;35:51–7.
- 97. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. Int J Mol Sci. 2018 May;19(5).
- 98. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. Cell. 1999 Apr;97(1):133–44.
- 99. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. J Neuroinflammation. 2008 Oct;5:45.
- Chowdhury D, Hell JW. Homeostatic synaptic scaling: molecular regulators of synaptic AMPA-type glutamate receptors. Vol. 7, F1000Research. London, UK; 2018.
- 101. Siddoway B, Hou H, Xia H. Molecular mechanisms of homeostatic synaptic downscaling. Neuropharmacology. 2014 Mar;78:38–44.
- 102. Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. Nature. 2006 Apr;440(7087):1054–9.
- 103. Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, et al. Tumor

Necrosis Factor and Interleukin-1beta Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. Neural Plast. 2018;2018:8430123.

- 104. Becker D, Deller T, Vlachos A. Tumor necrosis factor (TNF)-receptor 1 and 2 mediate homeostatic synaptic plasticity of denervated mouse dentate granule cells. Vol. 5, Scientific Reports. 2015.
- 105. Rodriguez M, Zoecklein L, Papke L, Gamez J, Denic A, Macura S, et al. Tumor necrosis factor alpha is reparative via TNFR2 [corrected] in the hippocampus and via TNFR1 [corrected] in the striatum after virus-induced encephalitis. Brain Pathol. 2009 Jan;19(1):12–26.
- 106. Legler DF, Micheau O, Doucey M-A, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. Immunity. 2003 May;18(5):655–64.
- 107. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. Neurochem Int. 2008 Feb;52(3):447–56.
- 108. Vandenbroucke RE, Dejonckheere E, Van Lint P, Demeestere D, Van Wonterghem E, Vanlaere I, et al. Matrix metalloprotease 8-dependent extracellular matrix cleavage at the blood-CSF barrier contributes to lethality during systemic inflammatory diseases. J Neurosci. 2012 Jul;32(29):9805–16.
- 109. Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, et al. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Oct;27(10):1663–74.
- 110. Kawamoto EM, Scavone C, Mattson MP, Camandola S. Curcumin requires tumor necrosis factor alpha signaling to alleviate cognitive impairment elicited by lipopolysaccharide. Neurosignals. 2013;21(1–2):75–88.
- 111. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May;72:248–54.
- 112. Feschenko MS, Sweadner KJ. 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. J Biol Chem. 1997 Jul;272(28):17726–33.
- 113. Kawamoto EM, Munhoz CD, Lepsch LB, de Sa Lima L, Glezer I, Markus RP, et al. Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity. Neurobiol Aging. 2008 Nov;29(11):1712–20.
- 114. Fiske CH, Subbarow Y. THE NATURE OF THE "INORGANIC PHOSPHATE" IN VOLUNTARY MUSCLE. Science. 1927 Apr;65(1686):401–3.
- 115. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug;227(5259):680–5.
- 116. Ferguson D, Sapolsky R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. J Neurosci. 2007 Jul;27(30):8046–52.
- 117. Dostanic I, Paul RJ, Lorenz JN, Theriault S, Van Huysse JW, Lingrel JB. The alpha2-isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Feb;288(2):H477-85.

- 118. Balkowiec-Iskra E, Vermehren-Schmaedick A, Balkowiec A. Tumor necrosis factor-alpha increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. Neuroscience. 2011 Apr;180:322–33.
- 119. Saha RN, Liu X, Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. J Neuroimmune Pharmacol. 2006 Sep;1(3):212–22.
- 120. Calsavara AC, Soriani FM, Vieira LQ, Costa PA, Rachid MA, Teixeira AL. TNFR1 absence protects against memory deficit induced by sepsis possibly through over-expression of hippocampal BDNF. Metab Brain Dis. 2015 Jun;30(3):669–78.
- Pierre S V, Sottejeau Y, Gourbeau J-M, Sanchez G, Shidyak A, Blanco G. Isoform specificity of Na-K-ATPase-mediated ouabain signaling. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Apr;294(4):F859-66.
- 122. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. Mediators Inflamm. 2013;2013:271359.
- 123. Naude PJW, Dobos N, van der Meer D, Mulder C, Pawironadi KGD, den Boer JA, et al. Analysis of cognition, motor performance and anxiety in young and aged tumor necrosis factor alpha receptor 1 and 2 deficient mice. Behav Brain Res. 2014 Jan;258:43–51.
- 124. Gooch CL, Pracht E, Borenstein AR. The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action. Ann Neurol. 2017 Apr;81(4):479–84.
- 125. Burla C, Camarano AA, Kanso S, Fernandes D, Nunes R. [A perspective overview of dementia in Brazil: a demographic approach]. Cien Saude Colet. 2013 Oct;18(10):2949–56.
- 126. Berk C, Paul G, Sabbagh M. Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress. Expert Opin Investig Drugs. 2014 Jun;23(6):837–46.
- Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. Lancet Neurol. 2010 Jul;9(7):702– 16.
- 128. Dai M-H, Zheng H, Zeng L-D, Zhang Y. The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. Oncotarget. 2018 Mar;9(19):15132–43.
- 129. Cruchaga C, Del-Aguila JL, Saef B, Black K, Fernandez MV, Budde J, et al. Polygenic risk score of sporadic late-onset Alzheimer's disease reveals a shared architecture with the familial and early-onset forms. Alzheimers Dement. 2018 Feb;14(2):205–14.
- Gonzalez H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. J Neuroimmunol. 2014 Sep;274(1–2):1–13.
- 131. Vardy ERLC, Teodorczuk A, Yarnall AJ. Review of delirium in patients with Parkinson's disease. J Neurol. 2015 Nov;262(11):2401–10.
- 132. Fong TG, Jones RN, Marcantonio ER, Tommet D, Gross AL, Habtemariam D, et al. Adverse outcomes after hospitalization and delirium in persons with Alzheimer disease. Ann Intern Med. 2012 Jun;156(12):848–56, W296.
- 133. Skelly DT, Griffin EW, Murray CL, Harney S, O'Boyle C, Hennessy E, et al. Acute

transient cognitive dysfunction and acute brain injury induced by systemic inflammation occur by dissociable IL-1-dependent mechanisms. Mol Psychiatry. 2018 Jun;

- 134. Maggio N, Vlachos A. Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through intracellular calcium stores. J Mol Med (Berl). 2018 Aug;
- 135. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. Neuroscience. 2015 Aug;302:2–22.
- 136. Albensi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. Synapse. 2000 Feb;35(2):151–9.
- 137. Vasconcelos AR, Kinoshita PF, Yshii LM, Marques Orellana AM, Bohmer AE, de Sa Lima L, et al. Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na,K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. Neurobiol Aging. 2015 May;36(5):1914–23.
- Zhang T, Lu X, Li J, Chidiac P, Sims SM, Feng Q. Inhibition of Na/K-ATPase promotes myocardial tumor necrosis factor-alpha protein expression and cardiac dysfunction via calcium/mTOR signaling in endotoxemia. Basic Res Cardiol. 2012 Mar;107(2):254.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, et al. Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. Neuroscience. 2007 Feb;144(3):934–49.
- 140. Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, et al. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. Brain. 2011 Sep;134(Pt 9):2736–54.
- 141. Gao H, Danzi MC, Choi CS, Taherian M, Dalby-Hansen C, Ellman DG, et al. Opposing Functions of Microglial and Macrophagic TNFR2 in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Cell Rep. 2017 Jan;18(1):198–212.
- 142. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci. 2001 Nov;4(11):1116–22.
- Simen BB, Duman CH, Simen AA, Duman RS. TNFalpha signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. Biol Psychiatry. 2006 May;59(9):775–85.
- 144. Novrup HG, Bracchi-Ricard V, Ellman DG, Ricard J, Jain A, Runko E, et al. Central but not systemic administration of XPro1595 is therapeutic following moderate spinal cord injury in mice. J Neuroinflammation. 2014 Sep;11:159.
- 145. Lee HH, Cho YI, Kim SY, Yoon YE, Kim KS, Hong SJ, et al. TNF-alpha-induced Inflammation Stimulates Apolipoprotein-A4 via Activation of TNFR2 and NFkappaB Signaling in Kidney Tubular Cells. Sci Rep. 2017 Aug;7(1):8856.
- 146. Aderka D, Wysenbeek A, Engelmann H, Cope AP, Brennan F, Molad Y, et al. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1993 Aug;36(8):1111–20.
- 147. Siegmund D, Kums J, Ehrenschwender M, Wajant H. Activation of TNFR2

sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. Cell Death Dis. 2016 Sep;7(9):e2375.

- 148. Simon A, Park H, Maddipati R, Lobito AA, Bulua AC, Jackson AJ, et al. Concerted action of wild-type and mutant TNF receptors enhances inflammation in TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 May;107(21):9801–6.
- 149. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. Nature. 1993 Aug;364(6440):798–802.
- 150. Blanque R, Meakin C, Millet S, Gardner CR. Selective enhancement of LPSinduced serum TNF-alpha production by carrageenan pretreatment in mice. Gen Pharmacol. 1998 Aug;31(2):301–6.
- 151. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. J Infect Dis. 1990 Jan;161(1):79–84.
- 152. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Med. 2015 Jul;21(7):677–87.
- 153. McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Pociask DA, Broderick L, Hoffman HM, et al. Cutting edge: IL-6 is a marker of inflammation with no direct role in inflammasome-mediated mouse models. J Immunol. 2012 Sep;189(6):2707–11.
- 154. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Aug;22(4):189–95.
- 155. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. EMBO J. 1990 May;9(5):1503–10.
- 156. Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. J Interferon Cytokine Res. 2009 May;29(5):273–84.
- 157. Lee K-M, Jeon S-M, Cho H-J. Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF-kappaB in a rat neuropathic pain model. Eur J Pain. 2009 Sep;13(8):794–806.
- Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MCW, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. Neuropharmacology. 2003 Dec;45(8):1120–9.
- 159. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. Nat Clin Pract Neurol. 2006 Dec;2(12):679–89.
- 160. Chugh D, Nilsson P, Afjei S-A, Bakochi A, Ekdahl CT. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. Exp Neurol. 2013 Dec;250:176–88.
- 161. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. J Neurosci. 2006 May;26(18):4930–9.
- 162. Ren C, Kobeissy F, Alawieh A, Li N, Li N, Zibara K, et al. Assessment of Serum UCH-L1 and GFAP in Acute Stroke Patients. Sci Rep. 2016 Apr;6:24588.
- 163. Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in

humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. J Trauma. 2010 Jul;69(1):104–9.

- 164. van den Boogaard M, Ramakers BP, van Alfen N, van der Werf SP, Fick WF, Hoedemaekers CW, et al. Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. Crit Care. 2010;14(3):R81.
- 165. Petzold A, Psotta L, Brigadski T, Endres T, Lessmann V. Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. Neurobiol Learn Mem. 2015 Apr;120:52–60.
- Lima Giacobbo B, Doorduin J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. Mol Neurobiol. 2018 Aug;
- 167. Sandhya VK, Raju R, Verma R, Advani J, Sharma R, Radhakrishnan A, et al. A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. J Cell Commun Signal. 2013 Dec;7(4):301–7.
- Dluzen DE, Story GM, Xu K, Kucera J, Walro JM. Alterations in nigrostriatal dopaminergic function within BDNF mutant mice. Exp Neurol. 1999 Dec;160(2):500–7.
- 169. Baquet ZC, Bickford PC, Jones KR. Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. J Neurosci. 2005 Jun;25(26):6251–9.
- 170. Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF-/- mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. Neuron. 1997 Aug;19(2):269–81.
- 171. Lin Y-T, Ro L-S, Wang H-L, Chen J-C. Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study. J Neuroinflammation. 2011 Sep;8:126.
- 172. Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F. Systemic interleukin-1 beta decreases brainderived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. Neuroscience. 1993 Mar;53(2):297–301.
- 173. Guan Z, Fang J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. Brain Behav Immun. 2006 Jan;20(1):64–71.
- 174. Zhu B, Wang Z-G, Ding J, Liu N, Wang D-M, Ding L-C, et al. Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus. Exp Ther Med. 2014 Mar;7(3):750–4.
- 175. Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Learn Mem. 2004;11(2):172–8.
- 176. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013 Sep;13(9):679–92.
- 177. Wu J, Akkuratov EE, Bai Y, Gaskill CM, Askari A, Liu L. Cell signaling associated with Na(+)/K(+)-ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. Biochemistry. 2013 Dec;52(50):9059–67.
- 178. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Baxinduced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. J Biol Chem. 1999 Jan;274(4):2225–33.

- 179. Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RHJ, Naniche N, et al. ALSlinked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. Hum Mol Genet. 2010 Aug;19(15):2974–86.
- 180. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. Nat Cell Biol. 2011 Sep;13(9):1016–23.
- 181. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. Curr Biol. 2013 Sep;23(17):R764-73.
- 182. Jeremias IC, Scaini G, Constantino L, Vuolo F, Ferreira AK, Scherer EBS, et al. The decrease on Na(+), K(+)-ATPase activity in the cortex, but not in hippocampus, is reverted by antioxidants in an animal model of sepsis. Mol Neurobiol. 2012 Oct;46(2):467–74.
- 183. Rosi S, Ramirez-Amaya V, Hauss-Wegrzyniak B, Wenk GL. Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. J Neuroinflammation. 2004 Jul;1(1):12.
- 184. Gomes C, Ferreira R, George J, Sanches R, Rodrigues DI, Goncalves N, et al. Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. J Neuroinflammation. 2013 Jan;10:16.
- 185. Hasegawa-Ishii S, Inaba M, Umegaki H, Unno K, Wakabayashi K, Shimada A. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. Sci Rep. 2016 May;6:25457.
- 186. Matsumori A, Ono K, Nishio R, Nose Y, Sasayama S. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. Cytokine. 2000 Mar;12(3):294–7.
- 187. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. Int J Biol Sci. 2012;8(9):1254–66.
- 188. D'Arcangelo G, Tancredi V, Onofri F, D'Antuono M, Giovedi S, Benfenati F. Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex. Eur J Neurosci. 2000 Apr;12(4):1241–52.
- 189. Murphy PG, Borthwick LA, Altares M, Gauldie J, Kaplan D, Richardson PM. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. Eur J Neurosci. 2000 Jun;12(6):1891–9.
- Swartz KR, Liu F, Sewell D, Schochet T, Campbell I, Sandor M, et al. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. Brain Res. 2001 Mar;896(1–2):86–95.
- 191. Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, et al. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6deficient mice. Glia. 1999 Feb;25(4):343–57.
- 192. Ruktanonchai DJ, El-Mallakh RS, Li R, Levy RS. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. Physiol Behav. 1998 Feb;63(3):403–6.
- 193. Wang Y-C, Wang E-N, Wang C-C, Huang C-L, Huang ACW. Dissociating effects of spatial learning from locomotor activity for ouabain-induced bipolar disorder-like rats. Psychiatry Res. 2014 May;216(3):432–7.
- 194. Decker S, Grider G, Cobb M, Li XP, Huff MO, El-Mallakh RS, et al. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced

hyperlocomotion in the development of an animal model for bipolar illness. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2000 Apr;24(3):455–62.

- 195. Song C, Horrobin DF, Leonard BE. The comparison of changes in behavior, neurochemistry, endocrine, and immune functions after different routes, doses and durations of administrations of IL-1beta in rats. Pharmacopsychiatry. 2006 May;39(3):88–99.
- 196. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell. 1993 May;73(3):457–67.
- 197. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. Psychol Bull. 1976 May;83(3):482–504.
- 198. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. EMBO J. 2014 Jan;33(1):7–22.
- 199. Shanks N, Griffiths J, Zalcman S, Zacharko RM, Anisman H. Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. Pharmacol Biochem Behav. 1990 Jul;36(3):515–9.
- 200. Sakurai M, Sekiguchi M, Zushida K, Yamada K, Nagamine S, Kabuta T, et al. Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behaviour and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. Eur J Neurosci. 2008 Feb;27(3):691–701.
- 201. Zeng W, Dohi S, Shimonaka H, Asano T. Spinal antinociceptive action of Na+-K+ pump inhibitor ouabain and its interaction with morphine and lidocaine in rats. Anesthesiology. 1999 Feb;90(2):500–8.
- 202. Lopatina E V, Yachnev IL, Penniyaynen VA, Plakhova VB, Podzorova SA, Shelykh TN, et al. Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na+,K+-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. Med Chem. 2012 Jan;8(1):33–9.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela com o resumo dos resultados significativos para o hipocampo,

soro, córtex e hipocampo

Sendo que \checkmark corresponde a diminuição, \uparrow ao aumento, = sem alterações e INT quando há interação entre ouabaína e LPS.

// inpocampo												
Figura	Prote	eína Conti	ole	OUA	LPS	0+L	Controle	OUA	LPS	O+L		
		W	Г	WT	WΤ	WΤ	KO	KO	KO	KO		
8	TNF	R2 =		=	=	=	=	=	$\mathbf{+}$	$\mathbf{\Lambda}$		
10	TN	IF =		\mathbf{V}	=	$\mathbf{\Lambda}$	=	=	1	1		
12	IL-1	1β =		↑	1	INT	=	=	=	=		
14	P6	5 =		=	=	INT	=	=	=	=		
17	BDI	NF =		=	=	=	=	=	1	1		
18	Trk	:В =		=	↑	1	=	=	=	=		
23	SOE	D-1 =		=	=	INT	=	=	=	=		
B-soro												
Figura	Proteína	Controle	OUA	LPS	0+	L Co	ontrole (DUA I	LPS	O+L		
U		WT	WT	WT	W	Г	KO	KO	KO	KO		
9	TNF	=	=	1	1		=	=	1	1		
11	IL-1β	=	=	=	=		=	$\mathbf{\Lambda}$	=	\mathbf{h}		
12	IL-6	=	=	1	IN	Г	=	=	1	↑		
C-córtex												
Figura	Proteína	Controle WT	OUA WT	LPS WT	O+ W	L Co F	ontrole C KO	DUA I KO	LPS KO	O+L KO		
25	BDNF	=	=	1	1		=	=	=	=		
26	IL-6	=	=	1	IN	Г	=	=	1	↑		

A-hipocampo

D-comportamento

Figura	Parâmetro	Controle	OUA	LPS	O+L	Controle	OUA	LPS	O+L
-		WT	WT	WT	WT	KO	KO	KO	KO
27	Distância percorrida total	=	↑	=	↑	=	=	=	=
28	Distância percorrida periferia	=	=	=	=	=	¥	¥	¥
29	Velocidade média	=	=	=	=	=	=	1	$\mathbf{\Lambda}$
30	Tempo no centro	=	=	=	=	=	=	$\mathbf{+}$	1
31	Tempo de freezing	=	=	=	=	=	=	$\mathbf{+}$	$\mathbf{+}$
	centro								
34	Tempo de latência	=	1	=	=	1	=	=	1

APÊNDICE B- Mapa da distribuição do deslocamento dos animais WT e TNFR1 KO Sendo A os animais WT e B os animais TNFR1 KO no período de 600 segundos.



B controle

ouabaína







ouabaína+LPS





APÊNDICE C – Resultados significativos apenas comparando a linhagem dos animais e LPS

Figura 1- Os níveis de TNF no soro (A) e no hipocampo (B).



Tanto no soro quanto no hipocampo há o efeito geral da linhagem e do LPS nos níveis de TNF. Sendo (A) análise da absorbância do tratamento com LPS e da linhagem no soro onde há um efeito geral do LPS no aumento de TNF (a p<0,0001) e também um efeito geral da linhagem onde há um aumento dos níveis de TNF no soro nos animais TNFR1 KO (*p<0,001). Há também uma interação entre o LPS e a linhagem (b<0,001).Sendo (B) análise da absorbância do tratamento com LPS e da linhagem no hipocampo onde há um efeito geral do LPS no aumento de TNF (a p<0,001).Sendo (B) análise da absorbância do tratamento com LPS e da linhagem no hipocampo onde há um efeito geral do LPS no aumento de TNF (a p<0,05) e também um efeito geral da linhagem em que o animal WT possui níveis mais elevados de TNF (*p<0,05). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em pg/mL para o soro e em pg/µg para o hipocampo (n=4 para o soro e n=3 para o tecido) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

Figura 2- Os níveis de IL-1β no soro (A) e no hipocampo (B).



Tanto no soro quanto no hipocampo há o efeito geral da linhagem nos níveis de IL-1 β . Enquanto que no hipocampo ainda há o efeito geral do LPS. Sendo (A) análise da absorbância do tratamento com LPS e da linhagem no soro onde há um efeito geral do TNFR1 KO no aumento de IL-1 β (*p<0,01). Sendo (B) análise da absorbância do tratamento com LPS e da linhagem no hipocampo onde há um efeito geral do LPS no aumento de IL-1 β (a p<0,001). Há também uma interação entre LPS e a linhagem. Os resultados

foram expressos em média ± erro padrão em pg/mL para o soro e em pg/µg para o hipocampo (n=3) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.





A expressão do TrkB é modulada pelo LPS independente da linhagem e há uma interação entre LPS e linhagem nos níveis de BDNF. Sendo (A) análise densitométrica do tratamento com LPS e da linhagem no hipocampo em relação à média das amostras do grupo controle onde há um efeito geral do LPS no aumento de TrkB (*p<0,05). Sendo (B) análise da absorbância do tratamento com LPS e da linhagem no hipocampo onde há uma interação entre o LPS e a linhagem (*p<0,05). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão em relação à média do controle para o TrkB e em pg/µg para o BDNF (n=3 para o TrkB e n=4 para BDNF) e analisados com o ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

APÊNDICE D- Resultados do projeto ATP1A1

No período em que estava no laboratório da Profa. Anita Aperia, participei de um projeto, onde exploramos a descoberta de uma nova mutação da α1-NKA com sintomas neurológicos. Uma paciente de apenas dez meses faleceu no Hospital do Karolinska Institutet por complicações pulmonares que provavelmente estão relacionadas ao número elevado de convulsões tônico-clônicas. Até os primeiros três meses de vida, a paciente apresentou um desenvolvimento normal, porém a mãe percebeu uma movimentação que aparentava ser involuntária e repetitiva que posteriormente foi diagnosticada como coreia.

Com três meses, a paciente apresentou uma diminuição na curva de crescimento e logo depois teve o primeiro episódio de convulsão, apesar de não apresentar alterações nos exames de eletroencefalografia e em exames de ressonância magnética. Os casos de convulsões se tornaram cada vez mais frequentes com a presença de *status epilepticus* que eram resistentes a diversos tratamentos, apenas o uso da cetamina foi efetivo durante um curto período.

Os exames de eletroencefalografia e ressonância magnética apresentaram anormalidades e as alterações de movimentos continuaram presentes. Após diversos exames, os níveis de magnésio na urina estavam diminuídos, o que motivou o tratamento com reposição de magnésio foi utilizado, mas o quadro continuou o mesmo. Aos dez meses a paciente faleceu e foi detectada morte neuronal na região CA1 do hipocampo e a presença de calcificações no cerebelo.

Após um exame genético, foi detectado uma mutação na α1-NKA que tinha como consequência a mudança do aminoácido triptofano (neutro) por arginina (carregado positivamente). A posição do aminoácido que apresenta a mutação é a 931 que é localizado em uma região extremamente conservada entre espécies e até mesmo entre as próprias isoformas da NKA. Essa região é especial, pois fica próxima ao terceiro sítio de ligação do íon sódio na NKA onde ainda não foi elucidado como o íon sódio se liga nessa região.

O nosso primeiro ensaio para entender melhor a mutação, foi utilizar células HEK 293 transfectadas com plasmídeos com diferentes sensibilidades à ouabaína. O primeiro plasmídeo é o chamado OS que é basicamente a α 1-NKA selvagem dentro do plasmídeo e que possui uma alta sensibilidade à ouabaína. Enquanto os outros plasmídeos são chamados de OR que são resistentes à ouabaína com a mutação W931R ou apenas WT (selvagem). Após um dia de transfecção dos plasmídeos, adicionamos ouabaína (10µM) por 2 dias onde inibimos a isoforma α 1-NKA endógena e ficamos apenas com as células transfectadas.

A partir da seleção com ouabaína, conseguimos comparar os níveis de sobrevivência entre os grupos onde observamos que as células transfectadas com mutação apresentam uma menor sobrevivência em comparação com o grupo apenas OR WT, o que demonstra que a funcionalidade ou expressão da isoforma α1-NKA provavelmente está comprometida (Figura 1).

Figura 1 - Esquema de transfecção e seleção das células com o uso de ouabaína(10µM).



Apenas as NKAs transfectadas expressas são funcionais devido à inibição da NKA endógena pela ouabaína. A mutação W931R apresentou uma diferença significativa em comparação com o grupo controle ouabaína resistente, onde p <0,001 (n=7), o que mostra que a mutação altera a função da NKA. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão e analisados com o ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Utilizamos também plasmídeos de NKA marcados com Phluorin que apresentam uma alteração na intensidade de fluorescência de acordo com as mudanças de pH para observar se a α 1-NKA era expressa na membrana de neurônios (cultura primária hipocampal). Com a mudança do pH no meio extracelular, ocorreu a diminuição da intensidade de fluorescência tanto para a α 1-NKA WT quanto para a mutada (W931R), mostrando que a alteração na sobrevivência não tem relação com o fato da α 1-NKAmutada não conseguir ser expressa na membrana celular. Porém, estudos posteriores em microscópios com melhor precisão mostraram que possivelmente a proporção de proteína no grupo W931R apresenta uma menor expressão na membrana (Figura 2).

Figura 2 - Figuras representativas para a expressão da isoformaα1-NKA (WT e a mutação W931R).





Isoformaα1-NKA (WT e a mutação W931R) marcadas com pHlourin, onde é possível observar a presença de proteína na membrana de neurônios hipocampais.

Realizamos ensaio de atividade para as células HEK transfectadas com os plasmídeos OR e OR W931R em comparação com células não transfectadas (NT) (Figura 3). Existe uma tendência ao aumento da atividade relativa com a mutação, mas como o plasmídeo apresenta resistência à ouabaína, os resultados devem ser
analisados de uma outra forma. As pessoas que estão continuando o projeto vão refazer o ensaio provavelmente para confirmar os dados obtidos com outros tipos de plasmídeo.

Figura 3 - Gráfico representativo do ensaio da atividade da NKA em células HEK293 não transfectadas (NT), OR e OR W931R.



Existe uma tendência no aumento da atividade da NKA no grupo com a mutação W931R, porém, os dados precisam ser reavaliados (n=5).Os resultados foram expressos em média ± erro padrãoe analisados com o ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

APÊNDICE E- Resultados do projeto GPNMB

No laboratório da Profa. Anita surgiu a ideia de trabalhar com uma nova proteína chamada GPNMB (glicoproteína não-metastática b) que é uma proteína transmembrana que foi descoberta a princípio em tumores agressivos, como o tumor de mama triplo-negativo. O GPNMB é clivado pela ADAM-10 e seu fragmento extracelular interage com a NKA tanto na isoforma α 1-NKA (expressão constitutiva) quanto na isoforma α 3-NKA que é presente apenas em neurônios.

Um trabalho do *Scientific reports* demonstrou que o GPNMB tem um efeito protetor em células que possuem a mutação na proteína SOD1 encontrada em pacientes com esclerose lateral amiotrófica. Um outro artigo mostrou o efeito protetor do GPNMB mais uma vez no SNC em um modelo de isquemia-reperfusão. O efeito protetor do GPNMB pode ser mediado pela fosforilação das proteínas Akt e ERK, o que é um ponto interessante pois as mesmas vias também são ativadas quando as células são tratadas com ouabaína.

Num primeiro momento, testamos se havia expressão do GPNMB tanto em tecido (hipocampo, córtex e estriado de ratos) como em neurônios provenientes da cultura de hipocampo de embriões de ratos (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - Expressão protéica de GPNMB em diferentes áreas cerebrais pelo ensaio de *Western Blotting*.



Radiografia com bandas representativas para a regiões: hipocampo (HPC), córtex (CX) e estriado (ST), onde o GPNMB é expresso em todas as regiões estudadas. O peso molecular corresponde a 75KDa, um dos fragmentos do GPNMB.

Figura 2 - Expressão protéica de GPNMB em cultura embrionária de neurônios hipocampais.



Pan neuronal

GPNMB

merged

Figura representativa com a marcação específica de neurônios (Pan neuronal) e GPNMB, em que é possível observar a expressão de GPNMB em neurônios.

Observamos que há GPNMB tanto no hipocampo quanto nos neurônios e um dado interessante encontrado foi uma tendência no aumento da expressão de GPNMB intracelular nos neurônios tratados com NMDA durante 5 minutos e mantidos por 6 horas em cultura na imunofluorescência. Porém, no caso do GPNMB extracelular não há diferenças pelo ensaio de *Western Blotting*. O GPNMB extracelular provavelmente não teve ainda influência pelo aumento de GPNMB intracelular no tempo estudado (Figura 3). Esse dado corrobora dados da literatura que mostram o aumento da expressão GPNMB no CNS quando ocorre um estresse no retículo endoplasmático muitas vezes relacionado a um estímulo lesivo.

Figura 3 - Resultados obtidos para a expressão de GPNMB intracelular e extracelular (ECD) em neurônios tratados com ouabaína e NMDA.



Neurônios tratados com ouabaína e NMDA por 5 minutos que ficaram 6 horas em cultura depois do tratamento pelas técnicas de Imunofluorescência e *Western Blotting*. Sendo o gráfico da esquerda, a análise densitométrica em unidades arbitrárias da expressão do GPNMB intracelular de neurônios tratados com ouabaína e NMDA no ensaio de imunofluorescência (n=4). O gráfico da direita corresponde a análise densitométrica da expressão de GPNMB extracelular normalizado pela proteína constitutiva GAPDH de neurônios tratados com ouabaína e NMDA no ensaio de analisa e NMDA no ensaio de CPNMB extracelular normalizado pela proteína constitutiva GAPDH de neurônios tratados com ouabaína e NMDA no ensaio de *Western Blotting* (n=6). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão e analisados com o teste t.

Depois resolvemos testar o efeito protetor do GPNMB para posteriormente compará-lo com o efeito protetor da ouabaína. Porém, como neurônio expressa tanto α1-NKA quanto α3-NKA, resolvemos explorar um modelo muito utilizado no laboratório da profa. Anita Aperia que é a cultura de células do túbulo proximal renal (TR) de ratos onde só há a expressão da isoforma α1-NKA,o que facilitaria entender se o fenômeno de proteção era relacionado apenas com uma das isoformas para depois avançar para o estudo com a cultura neuronal. Além disso, o GPNMB é também considerado um marcador de doença renal crônica, o que pode ser resultado de uma tentativa de reparo celular com o aumento de GPNMB na área afetada.

A cultura de TR é de certa forma delicada e dura pouco tempo, pois após o quarto dia de cultura, as células tendem a se transformar em fibroblastos. A cultura provém de rim de ratos com 20 dias de vida.

Escolhemos investir no tratamento com albumina (10 mg/mL) como estímulo lesivo durante 6 horas que é um modelo utilizado no laboratório e também tratamos as células TR com GPNMB (2,5ug/mL) que foi a concentração usada em outros trabalhos já publicados e ativa as vias da ERK e Akt. Porém, o efeito da albumina muitas vezes não é tão diferente do controle devido às diferenças de respostas entre os experimentos, apesar de ser uma concentração alta de albumina. Existia uma

tendência nos resultados, mas não existia uma diferença estatística entre os grupos (Figura 4).

Resolvemos também tentar o modelo de glicose como possível efeito lesivo que também é um modelo bastante utilizado no laboratório porém mais complicado, pois é necessário o uso de manitol como controle de osmolaridade e para isso era necessário mais células (consequentemente mais animais) para realizar o experimento e ainda a apoptose causada pela glicose é muito sutil, o que inviabiliza os experimentos (Figura 5).

Então, voltamos a trabalhar com a albumina, mas aumentamos o tempo de exposição à albumina para 18 horas de tratamento. Porém, o tratamento ainda assim não resultou em diferença estatística entre o grupo controle e albumina, provavelmente porque muitas células já tinham morrido durante o processo (Figura 6).

Figura 4 - O índice de apoptose em cultura primária de túbulo renal tratada com albumina e GPNMB.



O índice de apoptose em cultura primária de túbulo renal tratada com albumina e GPNMB por 6 horas obtidos no ensaio de TUNEL. Onde o tratamento de albumina apresenta uma tendência a aumento do índice de apoptose (n=7).

Figura 5- O índice de apoptose em cultura primária de túbulo renal tratada com glicose



O índice de apoptose em cultura primária de túbulo renal tratada com glicose por 6 horas em comparação com o grupo controle obtidos no ensaio de TUNEL. Apresentação de todas as lâminas observadas onde o tratamento de glicose apresenta uma tendência a aumento do índice de apoptose (n=3).

Figura 6 - O índice de apoptose em cultura primária de túbulo renal tratada com albumina e GPNMB.



O índice de apoptose em cultura primária de túbulo renal tratada com albumina e GPNMB por 18 horas obtidos no ensaio de TUNEL. Onde o tratamento de albumina apresenta uma tendência a aumento do índice de apoptose (n=5) e uma possível recuperação pelo tratamento com GPNMB.

APÊNDICE F- Resultados do projeto ouabaína e NMDA

Realizamos o ensaio de TUNEL para detectar apoptose em culturas de neurônio provenientes de hipocampos de embriões de rato. Observamos que a ouabaína era capaz de diminuir o número de neurônios que apresentavam DNA fragmentado (em apoptose) com o tratamento com NMDA, mostrando que as vias de sinalização ativadas pela interação da ouabaína com a NKA apresentam um efeito relevante na sobrevivência celular de neurônios (Figura 1).

Figura 1 - Resultados obtidos pelo ensaio de TUNEL para o tratamento com ouabaína e NMDA em neurônios.



Os neurônios foram tratados com ouabaína e NMDA por 5 minutos que ficaram 6 horas em cultura depois foram fixadas para o ensaio de TUNEL. Sendo o gráfico da esquerda, a análise do índice de

apoptose (n=3). Na direita, vemos as figuras representativas das células tratadas com NMDA e ouabaína+NMDA. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão e analisados com o ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Após esta etapa, realizamos a imunofluorescência da proteína apoptótica Bax que pode ser modulada pela ouabaína, já que demonstramos que a ouabaína também é capaz de aumentar a expressão de BcL-xL que é uma proteína anti-apoptótica que protege a mitocôndria de sofrer danos e liberar o citocromo c e iniciar toda a cascata de apoptose.

A imunofluorescência de Bax possui um *background* muito forte o que dificulta as análises e em alguns estudos também foi demonstrado que nem sempre a quantidade de Bax se modifica e que muitas vezes é mais uma relação com sua localização o que é difícil de ser detectado. Tentamos também realizar o ensaio de *Western blotting* para toda a cultura o que inclui uma pequena quantidade de células da glia para Bax e Bcl-xL (Figura 2), mas os resultados provavelmente ficaram mascarados devido à presença de outros tipos celulares, embora haja uma tendência a alterações na relação Bax/Bcl-xL no grupo OUA, NMDA e OUA+NMDA em comparação com o grupo controle.

Figura 2 - Resultados obtidos para a expressão de Bax e da razão Bax/Bcl-xL em neurônios tratados com ouabaína e NMDA.



Sendo o gráfico da esquerda, a análise densitométrica em unidades arbitrárias da expressão da proteína Bax normalizada pela proteína constitutiva GAPDH de neurônios tratados com ouabaína e NMDA (n=6). O gráfico da direita é a análise densitométrica da razão entre as proteínas relacionadas com apoptose Bax (pró-apoptótica) e Bcl-xL (anti-apoptótica) de neurônios tratados com ouabaína e NMDA (n=5). Os

resultados foram expressos em média ± erro padrão e analisados com o ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Concluímos que o papel do Bcl-xL provavelmente é mais importante do que a possível diminuição do Bax para a proteção da ouabaína e que não encontramos um anticorpo com o qual o sinal da fluorescência fosse adequado para a análise e comparação entre os grupos. Resolvemos tentar explorar também outra possível proteína que poderia ser modulada pela ouabaína e para tal, resolvemos fazer o ensaio de imunofluorescência para a proteína Bad que faz parte da cascata de apoptose numa fase posterior ao da ativação da proteína Bax.

A proteína Bad forma heterodímeros com as proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL e Bcl-2, o que impede que essas proteínas protejam a mitocôndria do Bax, por exemplo. Permitindo assim, a formação de poros na mitocôndria e como consequência a liberação do citocromo c e ativação da cascata de apoptose. Porém, apesar de apresentar uma tendência de aumento na expressão de Bad no tratamento com NMDA através do ensaio de imunofluorescência e uma reversão com a ouabaína, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 3).

Figura 3 - Resultados obtidos para a expressão de Bad em relação ao grupo controle em neurônios tratados com ouabaína e NMDA.



Não há diferenças estatísticas entre os grupos(n=5). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão e analisados com o ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Tentamos também observar se o efeito protetor da ouabaína tem relação com o fator de transcrição NF-κB que é importante para a regulação de diversos genes,

principalmente genes relacionados à inflamação. Para isso, optamos por observar a subunidade p65 do NF-κB que é responsável pela transcrição de genes próinflamatório e comparamos sua translocação para o núcleo apenas de neurônios pelo ensaio de imunofluorescência (Figura 4).

Observamos que o grupo NMDA apresenta um aumento na translocação nuclear da subunidade p65 em comparação com o grupo ouabaína e controle, porém, o grupo tratado com ouabaína e NMDA possui diferenças apenas no grupo controle, mostrando que não ocorreu a reversão da translocação de p65 pela ouabaína em neurônios e que o papel do p65 na sobrevivência pode ser relacionado a outro tipo celular como as células da glia que também estão presentes na cultura.

Figura 4- Resultados obtidos para a translocação nuclear da subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB em neurônios tratados com ouabaína e NMDA.



Sendo a vs. controle e ouabaína e b vs. controle (p<0,005), mostrando a alteração do NMDA na translocação da p65 que aparentemente não é revertida pela ouabaína em neurônios (n=4).