

NATACHA MEDEIROS DE SOUZA PORT`S

**Avaliação do papel do BDNF no mecanismo anti-
apoptótico da Ouabaína frente a um estímulo
excitotóxico moderado no hipocampo de ratos**

São Paulo
2022

NATACHA MEDEIROS DE SOUZA PORT`S

Avaliação do papel do BDNF no mecanismo anti-apoptótico da Ouabaína frente a um estímulo excitotóxico moderado no hipocampo de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Prof. Dr. Cristoforo Scavone**
Versão Corrigida

São Paulo
2022

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)

Medeiros de Souza Ports, Natacha
Avaliação do papel do BDNF no mecanismo anti-
apoptótico da Ouabaina frente a um estímulo
excitotóxico moderado no hipocampo de ratos /
Natacha Medeiros de Souza Ports; orientador
Cristoforo Scavone. -- São Paulo, 2022.
87 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ouabaina. 2. BDNF. 3. Excitotoxicidade. 4.
Apoptose. 5. Hipocampo. I. Scavone, Cristoforo ,
orientador. II. Título.

Candidato(a): Natacha Medeiros de Souza Port's

Título da Dissertação/Tese: **Avaliação do papel do BDNF no mecanismo anti-apoptótico da Ouabaína frente a um estímulo excitotóxico moderado no hipocampo de ratos**

Orientador: Cristoforo Scavone

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO PAPEL DO BDNF NO MECANISMO ANTI-APOPTÓTICO DA OUABAÍNA NO HIPOCAMPUS DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 5869090419, sob a responsabilidade de **Cristoforo Scavone e equipe; Natacha Medeiros de Souza Port's; Ana Maria Marques Orellana; Diana Zukas Andreotti Viana; Larissa de Sa Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 29/05/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF BDNF ROLE IN THE ANTI-APOPTOTIC MECHANISM OF OUABAIN IN RAT HIPPOCAMPUS", utilizing 80 Isogenic rats (80 males), protocol number CEUA 5869090419, under the responsibility of **Cristoforo Scavone and team; Natacha Medeiros de Souza Port's; Ana Maria Marques Orellana; Diana Zukas Andreotti Viana; Larissa de Sa Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/29/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [48 meses](#)

Depto/Setor: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [2 a 3 meses](#)

Linhagem: [Wistar](#)

N amostral: [80](#)

São Paulo, 29 de maio de 2019



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

x²

*À minha família, pelo apoio incondicional
e em especial à minha mãe, por sempre me*

fazer acreditar que posso ser tudo o que quiser.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Cristoforo Scavone, agradeço pelo acolhimento imediato, pelos conselhos e apoio durante toda essa jornada acadêmica. Ademais, agradeço principalmente por ter me ensinado que a universidade e a pós-graduação vão muito além das portas de um laboratório.

À Ana Maria Orellana, que mais do que minha co-orientadora, foi e continua sendo minha grande mentora científica desde o primeiro dia em que tive a felicidade de conhecê-la. Uma das minhas grandes inspirações como mulher, mãe e cientista.

À minha mãe Silvana Medeiros e minha irmã Victória Port's, por terem sido meu alicerce fundamental, meu abrigo em dias tortuosos e pelo amor incondicional.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional e do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental: Martina, Odaias, Malu, Paloma, Giovanna, Marina, Gabi, Thiago, Gigio, André, Amanda Siena, Luiz Felipe, Vinicius Watanabe e Amanda Midori. Por todas as conversas, frustrações, cafés (e choros) compartilhados. Por termos enfrentado juntos uma pandemia global e por terem sido minha família científica em São Paulo.

À Fernanda e Odaias, por serem os melhores companheiros e amigos de apê que eu jamais sonharia em ter nesta cidade feita de pedra, mas de gente boa também.

Às técnicas do laboratório, Larissa e Diana, pelo ombro amigo, suporte técnico e ajuda imensa em toda a metodologia dessa dissertação.

Às minhas queridas amigas de graduação da UFPA, Gleyce, Eliany, Keyla e Larissa, por estarem comigo há exatos 10 anos desde o primeiro dia de faculdade.

Ao meu companheiro Gabriel, pelo amor compartilhado, pela cumplicidade e por tornar este tal mundo dos vivos tão mais agradável ao seu lado.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia do ICB, em especial à querida Mônica, pela disponibilidade e ajuda contínua em todos os processos burocráticos.

Aos nobres seres animais que sacrificaram suas vidas para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

**“Looking for an answer:
You hunt it,
you catch it,
You fool yourself;
the answer,
is always,
a step ahead.”**

“The identification of sodium-potassium pump”
Palestra do prêmio Nobel em 8 de dezembro de 1997
por *Jens C. Skou*

RESUMO

PORT'S, NMS. **Avaliação do papel do BDNF no mecanismo anti-apoptótico da Ouabaína frente a um estímulo excitotóxico moderado no hipocampo de ratos.** 2022. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A excitotoxicidade glutamatérgica é um dos fenômenos comuns a fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas e decorre principalmente da hiperativação dos receptores NMDA extrasinápticos, que devido a sua alta permeabilidade ao Ca^{2+} permite um influxo massivo deste íon na célula, desencadeando a morte de neurônios por apoptose ou necrose. Na morte por apoptose, verifica-se o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL. Dados da literatura sugerem que dentre os efeitos neuroprotetores desencadeados pelo BDNF está seu efeito na sobrevivência celular, modulando a expressão das proteínas da família Bcl-2. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstram que a Ouabaína (OUA) é capaz de aumentar a expressão de Bcl-2, Bcl-xL e diminuir a expressão de Bax no hipocampo de ratos, impedindo a progressão da apoptose na presença de estímulo excitotóxico moderado. Além disso, o tratamento com OUA 10 nM é capaz de aumentar a expressão de BDNF/CREB. Portanto, o objetivo do presente projeto é avaliar se, por meio da ativação da via de sinalização do BDNF-TrkB, a OUA exerce seu mecanismo de proteção à morte por apoptose frente a um estímulo excitotóxico moderado no hipocampo. Os resultados encontrados mostram que o modelo de insulto excitotóxico moderado com NMDA 100 μM provoca mudanças de fenótipo microglial de M0 para M1/M2 e a OUA 10 nM é capaz de aumentar os níveis de BDNF em comparação com o grupo NMDA e os níveis de NT-3 em comparação com os grupos controle e NMDA em cultura primária de neurônios hipocampais maduros.

Palavras-chave: Ouabaína. BDNF. Excitotoxicidade. Apoptose. Hipocampo.

ABSTRACT

PORT'S, NMS. **Evaluation of BDNF role in the anti-apoptotic mechanism of Ouabain upon a moderate excitotoxic stimulus in rat hippocampus.** 2022. Dissertation (Master in Pharmacology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Glutamatergic excitotoxicity is a common phenomenon in the pathophysiology of several neurodegenerative diseases and occurs mainly due to hyperactivation of extrasynaptic NMDA receptors, which due to their high permeability to Ca^{2+} allows a massive influx of this ion in the cell, triggering neuron death by apoptosis or necrosis. In death by apoptosis, there is an increase in the expression of pro-apoptotic proteins such as Bax, and a decrease in the expression of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL. Literature data suggest that among the neuroprotective effects triggered by BDNF is its effect on cell survival, modulating the expression of Bcl-2 family proteins. Previous studies performed by our group demonstrate that Ouabain (OUA) is able to increase the expression of Bcl-2, Bcl-xL and decrease the expression of Bax in rat hippocampus, preventing the progression of apoptosis in the presence of moderate excitotoxic stimulus. Furthermore, treatment with 10 nM OUA is able to increase BDNF/CREB expression. Therefore, the aim of the present project is to evaluate whether, through the activation of the BDNF-TrkB signaling pathway, OUA exerts its mechanism to protect against death by apoptosis in the face of a moderate excitotoxic stimulus in the hippocampus. The results found show that the moderate excitotoxic insult model with NMDA 100 μM causes microglial phenotype changes from M0 to M1/M2 and OUA 10 nM is able to increase BDNF levels compared to the NMDA group and NT-3 levels compared to the control and NMDA groups in primary culture of mature hippocampal neurons.

Keywords: Ouabain. BDNF. Excitotoxicity. Apoptosis. Hippocampus.

LISTA DE ABREVIATURAS

aCSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
AMPA	Ácido a-amino-3 hidróxi-5- metil isoxazol-4-propiónico
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	BCL-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/ lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA1	Região CA1 do hipocampo
Ca ²⁺	Cálcio
C-Jun	Fator de transcrição Jun
Cl ⁻	Cloreto
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR/Src	Receptor do fator de crescimento epidérmico/Src
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EMSA	Ensaio de desvio de mobilidade eletroforética
GD	Giro dentado do hipocampo
iGluR	Receptores ionotrópicos glutamatérgicos
IL- β	Interleucina beta
kDa	Kilodaltons
K ⁺	Potássio
Mg ²⁺	Magnésio
mGluRs	Receptores metabotrópicos glutamatérgicos
mTOR	Proteínas alvo de rapamicina em mamíferos
Na ⁺	Sódio
NFKB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento do nervo
NKA	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase

NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDAR	Receptores de NMDA
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
RNA	Ácido ribonucleico
RNA	RNA mensageiro
Ras/ERK	Quinase proteica ativada mitogénica/Quinase extracelular de sinal regulado
PI3K/AKT	Proteína quinase B/Fosfatidilinositol-3-quinase/
PLC- γ	Fosfolipase-C gamma
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do modelo de Albers-Post para o mecanismo de transporte da NKA.....	18
Figura 2. Estrutura cristalizada da NKA ligada a OUA e K ⁺	21
Figura 3. Representação ilustrativa das vias intrínseca e extrínseca nos eventos apoptóticos.....	27
Figura 4. Representação ilustrativa da localização do ponto das coordenadas para o implante da cânula guia durante a cirurgia estereotáxica.....	31
Figura 5. Esquema ilustrativo do protocolo e tratamento das culturas de neurônios hipocâmpais.....	38
Figura 6. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes.....	41
Figura 7. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes.....	42
Figura 8. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes.....	42
Figura 9. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes.....	43
Figura 10. Imunofluorescência e TUNEL de secções de hipocampo de rato após 6 h de infusão com aCSF.....	44
Figura 11. Modulação de Ciclina D1 nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 µM e OUA 10 nM + NMDA 100µM ao longo de 6 horas.....	45
Figura 12. Modulação de Bcl-xL nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 µM e OUA 10 nM + NMDA 100 µM ao longo de 6 horas.....	46
Figura 13. Modulação de Espectrina nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 µM e. OUA 10 nM + NMDA 100µM ao longo de 6 horas.....	47
Figura 14. Perfil de ativação do CREB por Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA) nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 µM e OUA 10 nM + NMDA 100µM ao longo de 6 horas.....	48
Figura 15. Quantificação dos diferentes tipos celulares em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal.....	50
Figura 16. Caracterização de células neuronais em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal.....	51
Figura 17. Caracterização de astrócitos em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal.....	51
Figura 18. Caracterização de micróglia em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal.....	52
Figura 19. Análise estatística do ensaio de apoptose TUNEL em neurônios hipocâmpais após 5 minutos de exposição excitotóxica ao NMDA 100µM.....	53
Figura 20. Fotomicrografia representativa da marcação de neurônios para TUNEL nos diferentes grupos tratados após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocâmpais.....	54
Figura 21. Fotomicrografia da colocalização de marcação para núcleos celulares e apoptótico no grupo NMDA e OUA+NMDA.....	55

Figura 22. Fotomicrografia da mudança fenotípica da micróglia por insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais.....	56
Figura 23. Fotomicrografia da reversão de mudança fenotípica da micróglia por OUA após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais.....	57
...	
Figura 24. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de p75NTR após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais.....	58
Figura 25. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de p75NTR após insulto excitotóxico moderado em cultura de neurônios hipocampais.....	58
Figura 26. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de TrkA após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais.....	59
Figura 27. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de TrkB após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais.....	59
Figura 28. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de TrkC após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais.....	60
Figura 29. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Ngf após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	61
Figura 30. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Bdnf após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	62
Figura 31. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Il- β após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	63
Figura 32. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Tnf- α após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	64
Figura 33. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do NGF após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	65
Figura 34. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do BDNF após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	66
Figura 35. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do NT-3 após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	67
Figura 36. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do NT-4 após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 As subunidades α, β e γ	19
1.2 Na^+, K^+-ATPase como transdutora de sinais	20
1.3 Ouabaína e Na^+, K^+-ATPase	20
1.4 NFκB, o BDNF e as neurotrofinas	22
1.5 Sinalização glutamatérgica e excitotoxicidade	24
1.6 Apoptose e ciclo celular	26
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos específicos	29
4 METODOLOGIA	29
4.1 Animais	29
4.2 Cirurgias Estereotáxicas	29
4.3 Infusão Intrahipocampal	30
4.4 Injeção de traçador retrógrado para validação de posição das cânulas guia	31
4.5 Perfusão Transcardíaca	32
4.6 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares	32
4.7 Ensaio de Western Blotting	33
4.8 Ensaio de Apoptose em tecido - TUNEL	33
4.9 Ensaio de Imunofluorescência para tecido	34
4.10 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)	34
4.11 Cultura primária pós-natal de neurônios hipocampais	35
<i>4.11.1 Ensaio de imunofluorescência em cultura</i>	<i>36</i>
<i>4.11.2 Tratamento das células</i>	<i>37</i>
<i>4.11.3 Ensaio de apoptose em cultura – TUNEL</i>	<i>38</i>
<i>4.11.4 Ensaio de ELISA</i>	<i>39</i>
<i>4.11.5 Ensaio de PCR Tempo Real</i>	<i>39</i>
4.12 Análise e apresentação dos resultados	40

5 RESULTADOS	40
5.1 Análise histológica para validação das coordenadas estereotáxicas por injeção de traçador fluorescente	40
5.2 Ação anti-apoptótica da OUA frente a um estímulo excitotóxico <i>in vivo</i>	43
5.3 Perfis de modulação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose e na regulação de ciclo celular ao longo de 6 horas	44
5.4 Análise da mobilidade eletroforética de CREB	47
5.5 Ação anti-apoptótica da OUA em modelo <i>in vitro</i>	48
5.5.1 <i>Caracterização da cultura primária de neurônios hipocampais</i>	49
5.5.2 <i>Perfil anti-apoptótico da OUA após insulto excitotóxico em cultura primária de neurônios hipocampais maduros</i>	52
5.5.3 <i>Perfil fenotípico da micróglia após insulto excitotóxico moderado em cultura de neurônios hipocampais maduros</i>	55
5.5.4 <i>Efeitos do tratamento com OUA nos receptores das neurotrofinas após insulto com NMDA 100 µM em cultura primária de neurônios hipocampais maduros</i>	57
5.5.5 <i>Efeitos do tratamento com OUA na expressão de RNAm dos genes Bdnf, Ngf, Il-β e Tnf-α após insulto com NMDA 100 µM em cultura primária de neurônios hipocampais maduros</i>	60
5.5.6 <i>Efeitos do tratamento com OUA na modulação dos níveis de neurotrofinas após insulto com NMDA 100 µM em cultura primária de neurônios hipocampais maduros</i>	64
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

Durante seus estudos acerca da natureza do transporte de íons em fibras nervosas de caranguejo, o médico dinamarquês Jens C. Skou se deparou com uma enzima adenosina trifosfatase (ATPase) obrigatoriamente dependente de Mg^{2+} e estimulada pela presença conjunta de íons Na^+ e K^+ . Em 1957, propôs que o mecanismo dessa enzima estaria por detrás do processo de transporte ativo de íons de sódio na membrana plasmática e ademais, que impunha certas condições para funcionar de tal modo (SKOU, 1957).

Tal pensamento foi um tanto progressista para uma época fortemente estagnada ao ideal simplista de permeabilidade seletiva, onde existia certa resistência para com a proposição de um esquema de “bombeamento” iônico através de uma membrana (GLYNN, 2002).

A partir de uma série de experimentos voltados para caracterização dos aspectos enzimáticos do comportamento desse sistema de transporte ativo de Na^+ , Skou formulou as bases iniciais para que ele fosse identificado e isolado. Portanto, para que esse íons fossem transportados do citoplasma para o fluido intersticial contra um gradiente eletroquímico de concentração por meio da energia proveniente da hidrólise de ATP, era necessário que ele cumprisse alguns requisitos essenciais: 1) estar localizado na membrana celular, 2) ter uma afinidade por Na^+ maior do que por K^+ no sítio localizado dentro da membrana, 3) ter uma afinidade por K^+ maior do que por Na^+ no sítio localizado fora da membrana, 4) conter um sistema de enzimas capaz de catalisar a hidrólise de ATP e assim converter a energia do ATP em movimento de cátions, 5) ser capaz de hidrolisar ATP em uma taxa dependente da concentração de Na^+ dentro da célula e de K^+ fora da célula e 6) ser encontrado em todas as células onde ocorram transporte ativo e conjunto de Na^+ e K^+ (SKOU, 1965).

Posteriormente, Robert Post demonstrou que essa ATPase era responsável pelo transporte ativo de 3 íons de Na^+ para a porção intracelular e 2 íons de K^+ para a porção extracelular na membrana de glóbulos vermelhos no sangue, no qual o ciclo da bomba consistia numa etapa de fosforilação associada com efluxo de sódio e uma etapa de hidrólise associada ao influxo de potássio. Outros estudos subsequentes originaram o esquema do mecanismo de reação

de Albers-Post, que se confirmou não unicamente verossímil para a Na^+, K^+ -ATPase, mas também para todos os outros membros da família das ATPases do tipo P, confirmando que a atividade de bombeamento iônico era derivada de um ciclo de mudanças conformacionais (POST et al., 1969; SIEGEL; ALBERS, 1967).

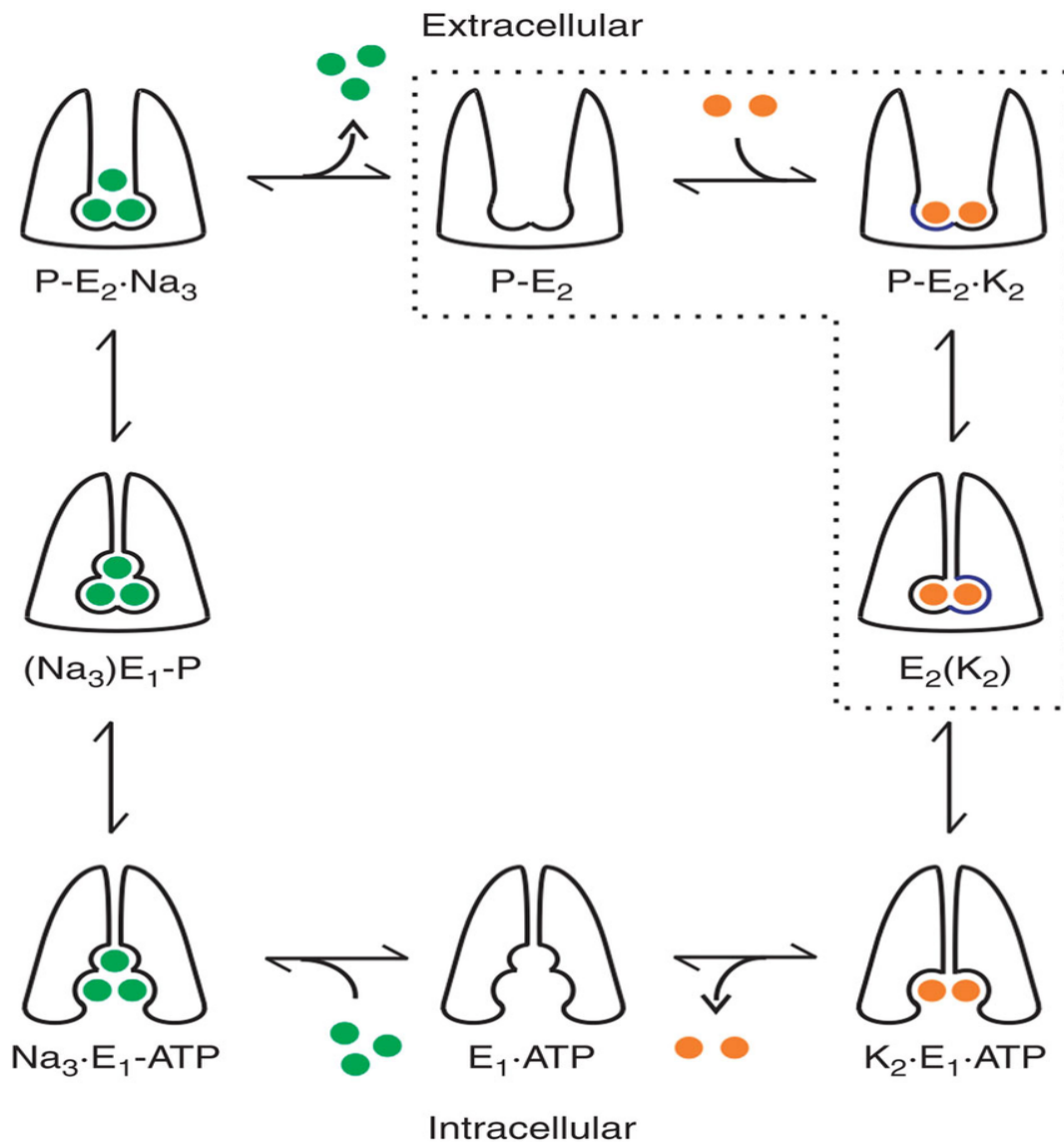


Figura 1. Esquema ilustrativo do modelo de Albers-Post para o mecanismo de transporte da NKA. Três íons Na^+ (círculos verdes) deslocam-se para fora, seguidos por dois íons K^+ transportados para dentro, através de uma série de estados que alternam os locais de ligação em ambos os lados da membrana celular, e que estão associados a reações de fosforilação e desfosforilação. Fonte: Castillo et al. (2015).

A NKA se constitui como um complexo molecular heterogêneo, sendo altamente conservada entre as espécies (HAMLYN et al., 1991; LINGREL,

2010). Visto que tanto o gradiente quanto o transporte de íons são processos imprescindíveis para inúmeras funções enzimáticas em todas as células animais, é importante ressaltar que a seletividade de resposta da NKA precisa estar de acordo com o padrão de necessidade de células variadas, sugerindo que essa enzima tenha evoluído propriedades distintas para responder aos requerimentos fisiológicos de diferentes tipos celulares (BLANCO; MERCER, 1998).

Apesar da presença de indícios diretos e indiretos sobre as propriedades da NKA, é enfático reiterar a importância do papel de Skou e o modo como seus estudos abriram um leque de novos pensamentos para a época, assim como novas abordagens a respeito de como elucidar o mecanismo de tal enzima biológica cheia de particularidades.

1.1 As subunidades α , β e FXYD

A atividade enzimática da NKA é modulada por duas subunidades principais e obrigatórias, sendo uma a subunidade alfa e a outra a subunidade beta. Até o presente momento, foram identificados 4 isoformas da subunidade alpha (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) e 3 isoformas da beta (β_1 , β_2 e β_3), além dos polipeptídeos da família FXYD, também referenciado como subunidade gamma (γ_a e γ_b), presentes na NKA dos rins. A subunidade alpha é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte, onde se observa os sítios de ligação tanto para o ATP, Na^+ e K^+ quanto para os glicosídeos cardiotônicos e é capaz de sofrer alterações conformacionais que influenciam no acoplamento, oclusão e translocação dos íons. A subunidade beta se apresenta como um glicosídeo essencial para a atividade enzimática e age como uma proteína chaperona (BLANCO, 2005; SWEADNER, 1989).

A isoforma α_1 é expressa de forma ubíqua e apresenta alta afinidade aparente pelo Na^+ intracelular e pelo K^+ extracelular, o que confere a ela o papel de isoforma fundamental para a manutenção do gradiente eletroquímico da NKA. A isoforma α_2 é expressa majoritariamente nas células da glia (astrócitos e oligodendrócitos), embora possa estar presente em alguns neurônios (MOSELEY et al., 2002). A isoforma α_2 apresenta baixa afinidade aparente pelos íons Na^+ e K^+ e alta sensibilidade a alterações na voltagem da membrana e nos níveis de Ca^{2+} intracelulares. A isoforma α_3 é exclusivamente expressa em

neurônios, sendo ativada durante o potencial de ação quando os níveis intracelulares de Na^+ estão elevados, favorecendo o aumento da atividade da bomba e, portanto, aumento nos níveis de K^+ intracelulares importante para o restabelecimento do potencial de repouso (HAMMANN et al., 2018).

1.2 Na^+ , K^+ -ATPase como transdutora de sinais

Desde a descoberta da sua existência na década de 1960, estudos extensivos acerca da estrutura, função e propriedades da NKA como regulador chave das concentrações intracelulares de Na^+ e K^+ foram realizados. Outras funções além da ação como transportador começaram a ser relatadas por volta dos anos 2000, descrevendo de modo inédito a sua capacidade de interação com proteínas na indução de estímulos que culminaram na regulação de genes e no crescimento celular. O conhecimento de que essa comunicação ocorria independentemente das propriedades associadas com a sua função clássica de bomba foi identificada em estudos com miócitos cardíacos de ratos (XIE; ASKARI, 2002).

Assim, pela primeira vez surgiam evidências de que, além do seu clássico papel na transdução de energia, a NKA era capaz de ativar cascatas de sinalização que acarretam na transdução de sinais. Devido a essa nova descoberta, diversos grupos de pesquisa começaram a se dedicar na elucidação desses mecanismos desencadeados pela ligação de moléculas endógenas e exógenas. Desde o século 18, uma classe de ligantes específicos denominados esteróides cardiotônicos são usados no tratamento de doenças cardíacas, sendo a maior representante desse grupo a Ouabaína, que apesar de ser considerada um típico derivado digitálico, apresenta características únicas que a tornam uma grande ferramenta para pesquisa farmacológica envolvendo a NKA (FÜRSTENWERTH, 2010).

1.3 Ouabaína e Na^+ , K^+ -ATPase

A Ouabaína (OUA) é um esteróide cardiotônico pertencente ao grupo dos fármacos digitálicos ou glicosídeos cardíacos, inicialmente considerado um metabólito derivado de plantas e mais recentemente considerado um hormônio produzido pela adrenal e pelo hipotálamo, cuja função fisiológica é pouco conhecida (CAVALCANTE-SILVA et al., 2017). Apresenta alta afinidade e

especificidade de ligação à enzima NKA, sendo capaz de inibir a sua atividade de forma dose-dependente (AIZMAN et al., 2001; AIZMAN; APERIA, 2003).

Na presença de concentrações nanomolares de OUA, a NKA é capaz de se comportar como um receptor e ativar diferentes vias de sinalização, ocorrendo assim apenas inibição parcial da sua atividade de bomba (LARRE; CERREIJO, 2010; LINGREL, 2010).

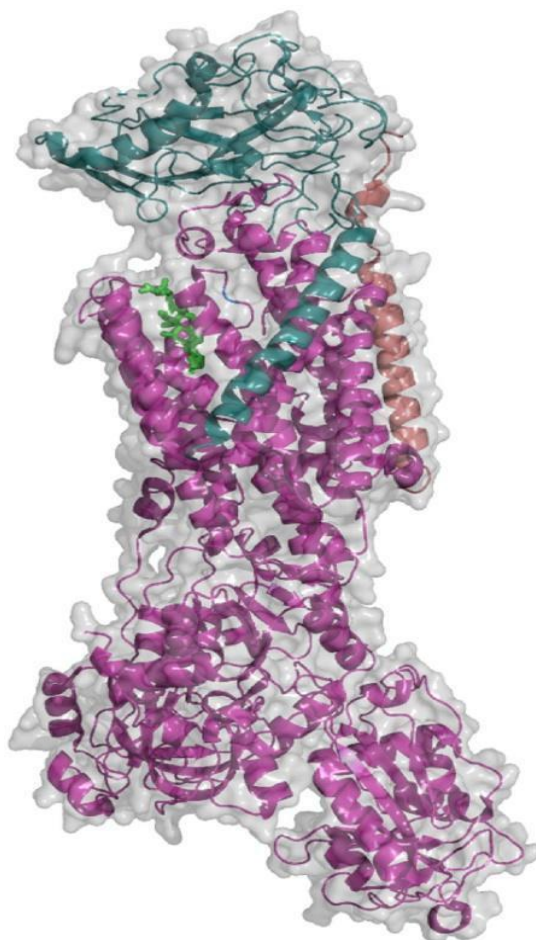


Figura 2. Estrutura cristalizada da NKA ligada a OUA e K⁺. Observamos a bomba de sódio e potássio ligada a OUA (verde) e ao potássio (laranja). As subunidades são codificadas por cores: subunidade α (rosa), subunidade β (azul), e subunidade FXYD (laranja). Fonte: (OGAWA et al., 2009)/Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/3A3Y>).

As vias de sinalização ativadas pela OUA já descritas, estão envolvidas com funções relacionadas à sobrevivência e proliferação celular (XIE; CAI, 2003; XIE; ASKARI, 2002). Tais funções resultam da estimulação: (i) da via da Src quinase por interações proteína-proteína (LIANG et al., 2006) entre a NKA e o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF) (HAAS; ASKARI; XIE, 2000). Essa interação leva a ativação de múltiplas cascatas de sinalização como ERK1/2 e Ras/MAPK, sem alterar a atividade de bomba (ABRAMOWITZ et al., 2003;

AYDEMIR-KOKSOY; ABRAMOWITZ; ALLEN, 2001); (ii) da interação física da NKA com receptores tipo IP₃R de Ca²⁺ na membrana do retículo endoplasmático que desencadeia oscilações de baixa frequência nos níveis de Ca²⁺ intracelular (AIZMAN et al., 2001).

Como importante segundo mensageiro intracelular, as oscilações de Ca²⁺ citosólico regulam a transcrição gênica, adesão celular, crescimento celular e apoptose (DOLMETSCH; XU; LEWIS, 1998). Oscilações de baixa frequência, como a induzida por essa ativação da OUA em baixas concentrações, levam a ativação específica de um importante fator de transcrição denominado Fator Nuclear Kappa B (NFκB) (LIU et al., 2007).

1.4 NFκB, o BDNF e as neurotrofinas

O NFκB (fator nuclear ligado à cadeia leve das moléculas de anticorpo das células B) é um dímero, homo ou heterodímero podendo ser constituído pelas subunidades p65 (também chamada RELA), p50, c-REL, RELB e p52 (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996; SIEBENLIST, 1997). A diferente combinação entre as subunidades pode ativar diferentes genes que controlam a morte celular programada, a adesão celular, a proliferação, a inflamação e o remodelamento tecidual (BONIZZU; KARIN, 2004; GERONDAKIS et al., 1999; MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016; PASPARAKIS; LUEDDE; SCHMIDT-SUPPRIAN, 2006).

Esse fator é encontrado em uma variedade de tipos celulares incluindo neurônios e micróglia (KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT; BAEUERLE, 1993), porém há estudos que indicam um papel dual do NFκB no sistema nervoso central (SNC) e em doenças neurodegenerativas, pois sua ativação em neurônios promove sua sobrevivência, enquanto medeia processos inflamatórios em células da glia e no sistema imune (CAMANDOLA; MATTSON, 2007). O NFκB se localiza predominantemente no citosol associado a uma proteína denominada IκB. Quando a via se torna ativa, o IκB é fosforilado, deixando o NFκB livre para translocar para o núcleo (BAEUERLE; BALTIMORE, 1988).

No SNC, a ativação da via do NFκB pode ocorrer pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (KAWAMOTO et al., 2012), que tem como alvo,

dentre outras vias, a ativação da Proteína de Ligação Responsiva ao AMPc (CREB)(DOLMETSCH; XU; LEWIS, 1998; O'RIORDAN et al., 2006). Dentre as suas diversas funções, o CREB atua majoritariamente regulando a expressão gênica induzida do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), responsável por modular sobrevivência neuronal, plasticidade, formação sináptica e neurogênese (FINKBEINER et al., 1997; TAO et al., 1998).

O BDNF faz parte de uma família de fatores tróficos denominada neurotrofinas, importantes reguladores de sobrevivência, desenvolvimento, função e plasticidade neuronal (HUANG; REICHARDT, 2001). Esses fatores agem por meio da ativação de duas diferentes classes de receptores transmembranares, a família Trk de receptores tirosina quinases e a p75NTR, membro da superfamília de receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNF) (DECHANT; BARDE, 2002; KAPLAN; MILLER, 2000).

Inicialmente, O BDNF foi observado no hipocampo, córtex cerebral e bulbo olfatório, e posteriormente em outras estruturas (ERNFORS et al., 1990; HOFER et al., 1990; WETMORE et al., 1990). A cascata de sinalização acontece majoritariamente através dos receptores Trk subtipo B (TrkB), ocorrendo ativação das vias Ras/ERK, PI3K/AKT e PLC- γ por meio do acoplamento do BDNF a esses receptores (LEAL; COMPRIDO; DUARTE, 2014). Tais sinalizações são consideradas importantes para efeitos neuroprotetores mediados por fatores de crescimento, pois envolvem processos de crescimento e diferenciação neuronal com a plasticidade sináptica (BOUTAHAR et al., 2010).

Ações protetoras do BDNF contra danos neuronais induzidos no SNC parecem ser moduladas por meio da ativação das vias ERK, PI3K e aumento de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 (HETMAN et al., 1999; LIU et al., 2007b; ZHANG et al., 2011). O BDNF exerce neuroproteção frente a excitotoxicidade, promovendo regeneração dendrítica (WU et al., 2010). Nesse contexto, moléculas que interferem nessa sinalização são consideradas promissoras no âmbito terapêutico como possível tratamento em desordens neurológicas (SASI et al., 2017).

Além das ações anti-apoptóticas e antioxidantes, evidências sugerem que o BDNF pode ativar a via das Proteínas Alvo de Rapamicina em Mamíferos

(mTOR) com subsequente ativação do fator de transcrição c-Jun, portanto estimulando vias de supressão da autofagia (CHEN et al., 2017). Disfunções no processo autofágico vem sendo associadas à demência frontal, Esclerose Lateral Amiotrófica e Doenças de Parkinson e Alzheimer (KOMATSU et al., 2006).

Estudos publicados em nosso laboratório demonstram que a infusão intrahipocampal de OUA 10 nM em ratos é capaz de promover a ativação de NFkB em neurônios, assim como a ativação de CREB/BDNF, levando ao aumento da arborização dendrítica em neurônios hipocampais e melhora na memória espacial de longa duração (KAWAMOTO, E.M. et al., 2012; ORELLANA et al., 2018).

Ademais, outras três neurotrofinas já foram identificadas e caracterizadas em mamíferos, o Fator de Crescimento do Nervo (NGF), Neurotrofina-3 (NT-3) e a Neurotrofina-4 (NT-4). O NGF se liga mais especificamente ao receptor TrkA, enquanto o BDNF e NT-4 ao TrkB, e o NT-3 é capaz de se ligar ao TrkC e também a outros receptores Trks, porém de forma menos eficiente (ULTSCH et al., 1999).

1.5 Sinalização glutamatérgica e excitotoxicidade

Além de ser um dos principais neurotransmissores excitatórios no sistema nervoso central, o glutamato se encontra em posição moduladora crítica para diversos processos fisiológicos, como controle sináptico e função de circuitaria até formação de memória e aprendizagem (REINER; LEVITZ, 2018) principalmente por meio dos seus receptores metabotrópicos (mGluRs, tipo I, II e III) e inotrópicos (iGluR, tipo AMPA, Cainato e NMDA) (FEATHERSTONE, 2010).

A partir do momento em que um potencial de ação é disparado no neurônio excitatório, o glutamato é liberado da terminação pré-sináptica permitindo sua ligação a receptores pós-sinápticos glutamatérgicos do tipo AMPA (ácido α -amino-3 hidróxi-5- metil isoxazol-4-propiónico) que assim permitirá um aumento no influxo de Na^+ intracelular iniciando a despolarização necessária para a abertura do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato). O NMDA uma vez ativado, é altamente permeável aos íons Ca^{2+} e através da ativação desse receptor ocorre a despolarização da

terminação pós-sináptica (BERRIDGE, 1998). Portanto, alterações na atividade, expressão, tráfico ou localização desses receptores se tornam fatores contribuintes para o início do processo de inúmeras condições neurológicas e psiquiátricas, visto que várias desordens que afetam o SNC são consideradas consequências causais ou associadas a algum tipo de disfunção sináptica (ZHOU; SHENG, 2013).

Em astrócitos, a presença de glutamato na fenda e a despolarização dos neurônios circundantes ativam de forma orquestrada a atividade da isoforma $\alpha 2$ da NKA e os transportadores de neurotransmissores, favorecendo a remoção do neurotransmissor da fenda e o término do potencial de ação (BAZARGANI; ATTWELL, 2016).

Dentre as diversas contribuições do médico Dennis Choi para pesquisas sobre a toxicidade mediada por glutamato, uma das principais foi a elucidação do mecanismo celular de injúria neuronal causada pela exposição excessiva a esse neurotransmissor, hoje denominado excitotoxicidade. Primeiramente, demonstrou-se que esse processo era composto por duas fases distintas que poderiam ser separadas de acordo com o curso temporal e tipo de dependência iônica. A primeira fase aguda era caracterizada por uma mudança morfológica devido ao aumento no volume dos neurônios, conferindo-lhes um aspecto de inchaço celular e dependente de Na^+ e Cl^- extracelular. A segunda fase, que ocorre mais tardiamente, era marcada por um estado gradual de desintegração das células neuronais de modo dependente de Na^+ e, portanto, sugere-se que esse processo era mediado pelo influxo de Ca^{+2} (CHOI, 1987).

Posteriormente, verificou-se que o insulto excitotóxico dependia do influxo de Ca^{2+} extracelular e que, comparado a outros receptores glutamatérgicos, os receptores do subtipo NMDA eram predominantemente responsáveis por essa dinâmica (CHOI; KOH; PETERS, 1988; CHOI; MAULUCCI-GEDDE; KRIEGSTEIN, 1987). Dependendo do tipo e origem do estímulo, a atividade dos NMDAr pode ser tanto tóxica quanto neuroprotetora. Estudos acerca desses receptores demonstram que a estimulação de NMDAr sinápticos ativa CREB e promove sobrevivência celular, enquanto a ativação extra sináptica atenua a

sinalização exercida por CREB e é capaz de, via excitotoxicidade, levar a morte celular (HARDINGHAM; BADING, 2010).

1.6 Apoptose e ciclo celular

Dentro os diferentes mecanismos de morte celular, a apoptose se configura como um processo de morte programada caracterizada não apenas por mudanças morfológicas marcantes, como também por alterações em mecanismos bioquímicos. Tal evento é de grande importância fisiológica para manutenção de inúmeras funções como funcionamento adequado do sistema imune, desenvolvimento embrionário apropriado, organização do sistema nervoso central, renovação tecidual e atrofia induzida por hormônios (ARENDS; WYLLIE, 1991).

Os mecanismos que resultam nesse tipo de morte celular envolvem duas cascatas de sinalização principais: intrínseca (ou via mitocondrial) e extrínseca (ou via receptor de morte), que desencadeiam cascatas de eventos moleculares dependentes de energia. Demonstrou-se que as duas vias interagem entre si e moléculas de ambas as vias podem ter influência sobre a outra (IGNEY; KRAMMER, 2002).

A via intrínseca, foco do presente projeto, pode iniciar-se por diversos estímulos, dentre os quais radiação, danos ao DNA, toxinas ou hipóxia, que ativam cascatas de sinalização provocando alterações na membrana mitocondrial interna, por isso é também denominada de via mitocondrial, resultando na formação de poros, perda de potencial de membrana e liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo C para o citosol, dando início a sinalização de morte. Todas as vias resultam num único sinal terminal de execução que culmina em alterações citomorfológicas características desse processo, que incluem retração celular, condensação de cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos e por fim, fagocitose desses corpos por células parenquimatosas adjacentes, células neoplásicas ou macrófagos (ELMORE, 2007).

O controle central da integridade da membrana mitocondrial é realizado pela família Bcl-2 e majoritariamente pelas proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, que são

consideradas suas “guardiãs” devido ao seu poder de inibição da liberação de citocromo C e ativação de caspases devido a estabilização da função de barreira e permeabilidade da membrana (ZAMZAMI; KROEMER, 2001).

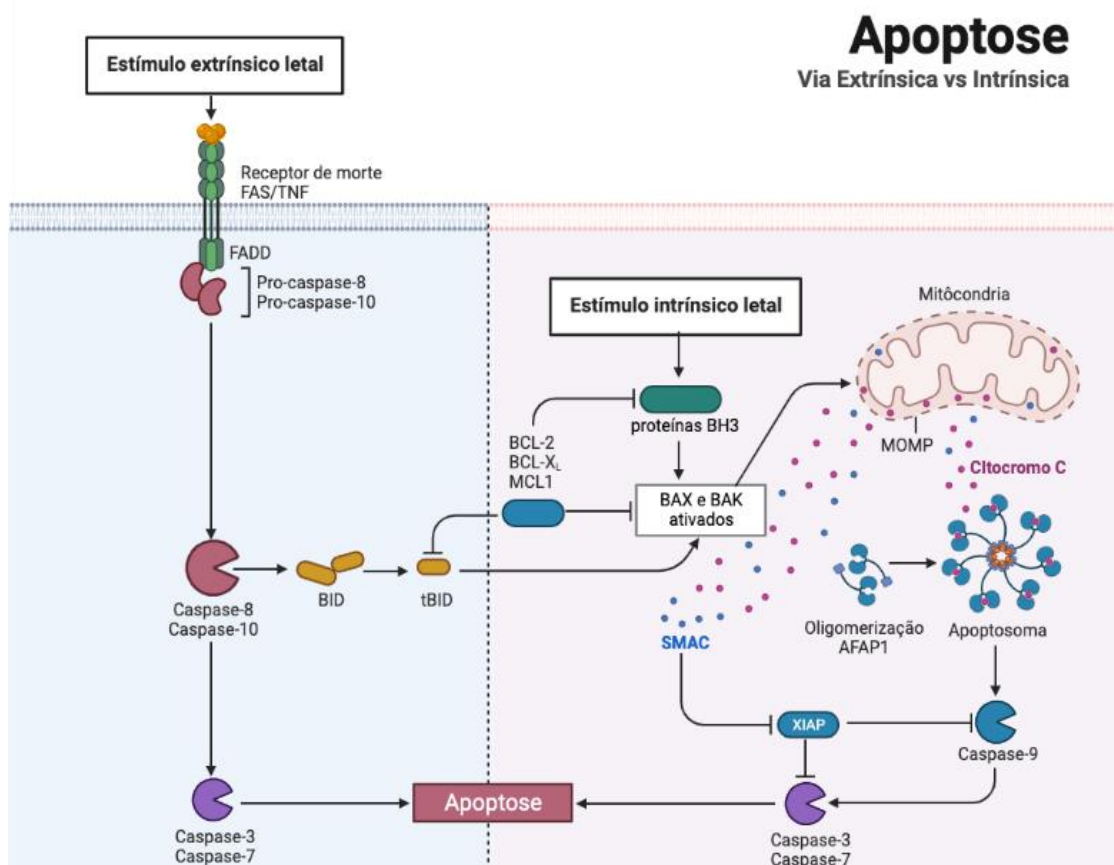


Figura 3. Representação ilustrativa das vias intrínseca e extrínseca nos eventos apoptóticos. As duas principais vias de morte celular por apoptose são a extrínseca (ou via receptor/ligante de morte) e a intrínseca (ou via mitocondrial), onde cada uma requer diferentes estímulos para ativação inicial de suas caspases específicas: caspase-8/caspase-10 para via extrínseca e caspase-9 para via intrínseca, desencadeando cascatas de eventos moleculares dependentes de energia que irão culminar na ativação de caspases executoras (caspase-3/caspase-7) da apoptose (Baseado em ICHIM; TAIT, 2016) Figura criada pelo Biorender.com.

No SNC, o processo de excitotoxicidade é um importante desencadeador da apoptose. Além disso, estudos sugerem que em doenças neurodegenerativas a excitotoxicidade pode levar à entrada aberrante de neurônios pós-mitóticos no ciclo celular (FOLCH et al., 2012; SEWARD et al., 2013). A morte induzida por mitose aberrante é denominada “catástrofe mitótica”, sendo controlada por inúmeros elementos como caspases, quinases e membros da família Bcl-2 (CASTEDO et al., 2004; VAKIFAHMETOGLU; OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2008).

Em 2006, Li e colaboradores inicialmente demonstraram que o tratamento com concentrações nanomolares de OUA (10 nM por 24 h) foi capaz de prevenir a morte por apoptose induzida por privação de soro em cultura primária de células do túbulo renal proximal de ratos, aumentando a proliferação dessas células pela ativação da via do NFκB (LI et al., 2006). Outro estudo também demonstrou ação anti-apoptótica da OUA em células do epitélio renal exposta a *Escherichia coli* produtora de Shiga Toxina (STEM), por meio da reversão do desbalanço entre Bax e Bcl-xL (BURLAKA et al., 2013).

Posteriormente, outros dados corroboram com a ideia de que a OUA tem potencial efeito protetor contra o processo de apoptose induzida, nesse caso por agonistas de receptor glutamatérgico (NMDA ou Cainato) em cultura neuronal de córtex de rato (SIBAROV et al., 2012). Portanto, Sibarov e colaboradores descrevem que a ativação das cascatas que levam a morte celular por apoptose poderia ser revertida e/ou prevenida por meio do uso concomitante da OUA ao estímulo excitotóxico, resultando em uma expressão praticamente basal da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no SNC.

2 JUSTIFICATIVA

Visto que os processos desencadeados pela OUA são capazes de interferir diretamente em vias de sinalização importantes para a proteção frente a estímulos lesivos, o estudo exploratório dessa molécula como ferramenta farmacológica se torna emergente e de grande valia para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos pela NKA na transdução de sinais no contexto das doenças neurodegenerativas. Ademais, o objetivo proposto neste estudo visa a investigação dos processos envolvidos no possível efeito anti-apoptótico exercido pela OUA, o que a torna também um alvo em potencial para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como principal objetivo explorar o mecanismo molecular pelo qual a OUA é possivelmente capaz de exercer seu efeito anti-apoptótico em células neuronais e verificar se essa modulação ocorre via BDNF-TrkB após um insulto excitotóxico moderado, em neurônio de ratos.

3.1 Objetivos específicos

1. Verificar se a OUA 10 nM protege os neurônios da morte por apoptose após um estímulo excitotóxico moderado, pela infusão de NMDA 100 μ M;

2. Caracterizar um modelo *in vitro* viável para observação dos efeitos da OUA sobre a apoptose após um estímulo excitotóxico moderado, especificamente em diferentes populações celulares;

3. Verificar o perfil de modulação das proteínas pró-inflamatória IL- β e TNF- α , das neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 e NT-4, e seus receptores TrkA, TrkB e TrkC após os tratamentos dos diferentes grupos experimentais com aCSF (controle), OUA, NMDA e OUA+NMDA.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar adultos, com 4 meses de idade, provenientes do Biotério Central da USP protocolada sob o CEUA nº 5869090419 no dia 29/05/2019. Eles foram transferidos para o biotério do Departamento de Farmacologia (ICB/USP) e mantidos por um período mínimo de uma semana para ambientação, antes do início da realização dos experimentos. O local fornece temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ$ C), sob ciclo de iluminação claro/escuro controlado (claro:6-18 horas) com água e ração *ad libitum*. Para as culturas primárias, foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar de ambos os sexos, com idade entre 0 a 3 dias, igualmente provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo.

4.2 Cirurgias Estereotáxicas

A cirurgia foi realizada para implantação de cânulas guia no hipocampo, situadas diretamente sobre a região CA1, em ambos os hemisférios dos animais de acordo com o protocolo padronizado e descrito por KAWAMOTO et al., 2012. Os animais foram inicialmente anestesiados com uma mistura de (1:1) quetamina 10% (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e xilazina 2% (Syntec) (0,15 ml/kg i.p). A cabeça do animal foi colocada e fixada no aparelho estereotáxico (Modelo

900, Kopf, CA, USA), após tricotomia. A assepsia local foi realizada com peróxido de hidrogênio 3%, seguido de uma incisão de aproximadamente 2 cm para expor a caixa craniana. As coordenadas escolhidas, tomando o bregma como referência, foram: + 3,5 mm ântero-posterior; \pm 2,0 mm latero-lateral e - 2,7 mm de profundidade (de acordo com o atlas Paxinos e Watson, 1986). Seguindo essas coordenadas, dois pontos situados em cada hemisfério foram marcados e a caixa craniana foi perfurada com o auxílio de uma broca odontológica. Após inseridas, as cânulas foram fixadas com o auxílio deacrílico autopolimerizante adjacente e parafusos para melhor sustentação. Além disso, foi colocado um fio odontológico na parte externa de cada cânula para evitar exposição da região interna.

Após a cirurgia, os animais retornaram ao biotério, onde permaneceram por um período de 7-10 dias para recuperação completa. Estudos anteriores do nosso grupo padronizaram esse período como suficiente para resolução de qualquer inflamação remanescente e total eliminação da quetamina utilizada no procedimento cirúrgico, visto que ela é um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA.

4.3 Infusão Intrahipocampal

Após o período de recuperação, infusões foram realizadas com microseringas Hamilton, bomba de infusão (Kd Scientific, Holliston, MA, EUA) e agulhas gengivais 30G (Terumo, Tóquio, Japão) por um tempo de 2 minutos, seguida de mais 4 minutos de repouso da agulha para evitar o refluxo do líquido infundido (Bersier e Arnaiz, 2009). O volume de infusão foi de 2 μ L. Os animais foram divididos nos seguintes grupos de tratamento: (1) sham (controle cirúrgico), onde apenas a cirurgia foi realizada sem infusão de qualquer substância; (2) controle, cirurgia seguido de infusão com aCSF (líquido cefalorraquidiano artificial); (3) OUA (10 nM), cirurgia seguido de infusão com OUA 10 nM diluída em aCSF; (4) NMDA (100 μ M), cirurgia seguido de infusão com NMDA 100 μ M diluída em aCSF; (5) OUA (10 nM) + NMDA (100 μ M).

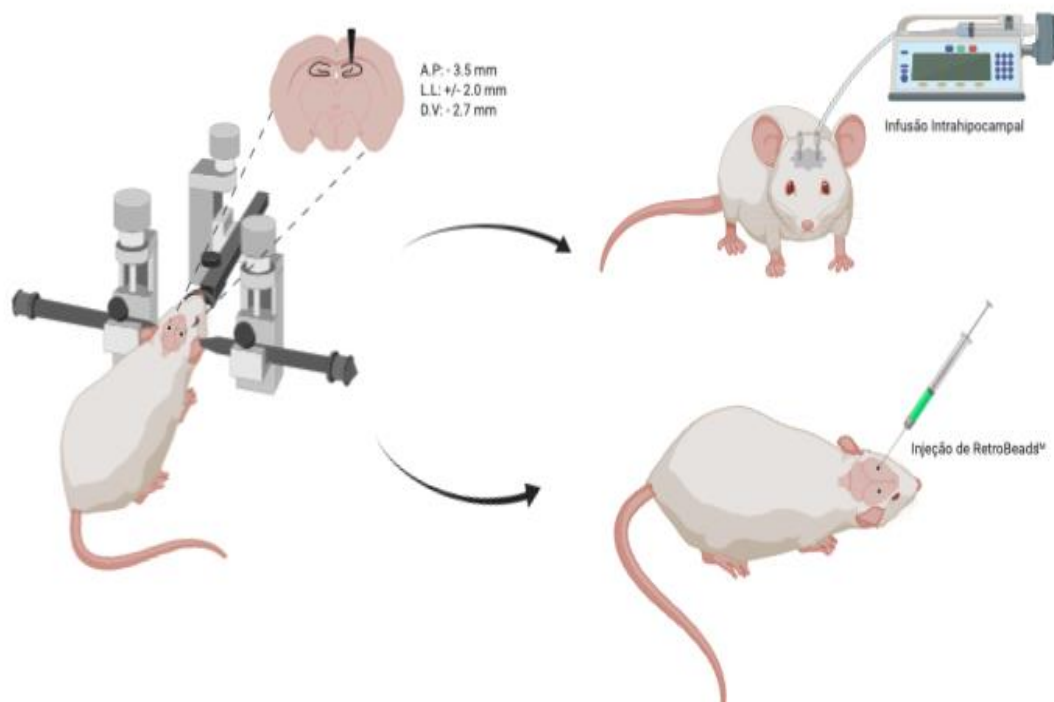


Figura 4. Representação ilustrativa da localização do ponto das coordenadas para o implante da cânula guia durante a cirurgia estereotáxica. Esquema do animal fixado ao aparato cirúrgico e a exposição da caixa craniana tendo como referência a linha do Bregma. As coordenadas determinadas pelo Atlas são marcadas e furos são realizados para implante das cânulas posicionadas sobre a região CA1 do hipocampo, seguindo a coordenada dorso-ventral em relação ao osso da caixa craniana de 2.7 mm ou injeção de traçador retrógrado RetroBeads™ para validação da posição da cânula guia sob a mesma região. Figura criada pelo Biorender.com.

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação após 8 h dos tratamentos, o encéfalo dissecado, os hipocampos foram coletados e armazenados a -80°C para uso posterior (ARVIDSSON et al., 2002; HIYOSHI et al., 2012; VAN PRAAG et al., 2002; VEAS-PÉREZ DE TUDELA et al., 2015).

4.4 Injeção de traçador retrógrado para validação de posição das cânulas guia

Para verificar o posicionamento correto das cânulas-guia no hipocampo por meio das coordenadas usadas no aparelho estereotáxico, um grupo de animais recebeu injeção de 2 μL de solução de salina 0,9% contendo microesferas de traçador retrógrado autofluorescente LumaFluor Green Retrobeads™ a 5% (SILVA et al., 2016). Após 12 h, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca (vide item 5.5) e os encéfalos fixados foram seccionados em plano coronal no micrótomo (Leica, SM2000R),

sequencialmente a partir do início do hipocampo e coletados em placas de cultura de 24 poços com solução anti-freezing.

4.5 Perfusão Transcardíaca

Os ratos destinados para técnicas histológicas foram anestesiados com Isoflurano (anestésico inalatório) para anestesia profunda, seguido da perfusão com salina estéril (0,9% NaCl) e solução fixadora (4% de paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato 0.1 M; pH 7.4, 4 °C). Os encéfalos foram coletados e fixados em solução de PFA por 4 h sendo transferido para uma solução de sacarose (30% sacarose em tampão fosfato) onde permaneceram armazenadas até o uso. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em micrótomo na espessura de 30 µm e colocados em lâminas de vidro microscópicas. As lâminas foram fechadas com Immuno Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada) e os cortes foram posteriormente analisados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Toquio, Japão) com sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C.

4.6 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares

O método utilizado foi o descrito em Rong e Baudry (1996). Os hipocampos foram descongeladas, homogeneizadas em dounce de vidro contendo tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 0,5 mM; leupeptina 2,5 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; NaF 30 mM; Pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e EDTA 0,1 mM. Em sequência, os homogenatos resultantes foram centrifugados a 12,000 x g por 30 segundos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspendido novamente em tampão de lise e centrifugado a 12,000 x g por 30 segundos a 4°C. Posteriormente, foram incubados em gelo durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 12.000 x g por 30 seg, a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado, correspondendo ao extrato citosólico. O pellet obtido foi ressuspendido em tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25%; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL; NaF 30 mM; pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e

incubado 20 min em gelo, centrifugando-se o extrato à 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O último sobrenadante, referente ao extrato nuclear, foi recolhido e a concentração de proteína de todas as amostras foram determinadas de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando reagente da BioRad® com subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. Os extratos foram estocados a -80 °C para posterior preparação de amostras para Western blot e ensaio de EMSA.

4.7 Ensaios de Western Blotting

O protocolo utilizado foi de acordo com o descrito por ORELLANA et al., 2015. As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para membrana de nitrocelulose e marcadas com os seguintes anticorpos: Espectrina (1:1000, Biolegend), Ciclina D1 (1:100, Cell Signaling), Bcl-xL (1:250, Biolegend), β -Actina e α -Tubulina como controles endógenos. Para os ensaios de Western Blot foram aplicadas 15 μ g de proteínas.

4.8 Ensaio de Apoptose em tecido - TUNEL

O ensaio foi executado nos cortes histológicos por meio do kit ApopTag® Red *in situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) conforme as orientações do fabricante. Após o término do kit, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (1:10.000 em tampão PBS) e os neurônios com NeuN (1:2000, Abcam) ou com o anticorpo Neuro-Chrom Pan-Neuronal Marker (1:1000, Millipore). As lâminas foram fechadas e os cortes analisados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Tóquio, Japão) com sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C. As células foram consideradas apoptóticas quando exibiam a marcação vermelha do ApopTag. A taxa de células apoptóticas foi calculada como a porcentagem de células com núcleo TUNEL positivo (vermelho) que se sobrepunham com a marcação de núcleo celular por DAPI (azul), sobre o número de núcleos totais no campo. Em cada lâmina, 4 campos diferentes foram fotografados. Um ensaio de TUNEL independente foi realizado com número amostral de 4 a 6 para cada grupo.

4.9 Ensaios de Imunofluorescência para tecido

Após perfusão, os encéfalos fixados foram seccionados em plano coronal no micrótomo (Leica, SM2000R), sequencialmente a partir do início do hipocampo e coletados em placas de cultura de 24 poços com solução anti-freezing. Os cortes foram incubados *free-floating* por 2 h em tampão de bloqueio (PB 0,1M + 5% de soro de burro + 0,3% de Triton X-100). Após esta etapa, foram transferidos para lâminas gelatinizadas contendo aproximadamente 6 cortes por lâmina. Para a reação de imunofluorescência os cortes foram incubados, *overnight* a 4° C, com os seguintes anticorpos primários: anti NeuN (1:2000; Millipore, USA); anti-GFAP (1:500; Cell Signaling, USA) e Anti-Iba-1 (1:500; Fujifilm). Na sequência foram lavados 3 vezes por 10 min com tampão PB 0,1 M e incubados por 2 h, temperatura ambiente, com os anticorpos secundários adequados ao primário, dentre os quais: Alexa Fluor donkey anti-mouse (DAM) 594 e (DAR) 488, Alexa Fluor donkey anti-rabbit (DAR) 488 e (DAR) 594 e Alexa Fluor donkey anti-goat (DAG) 594, todos diluídos 1:1000 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA).

Para os controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos da reação. Após incubação com os anticorpos secundários, os cortes foram lavados novamente e incubados por 5 min com DAPI (1:10.000) (4'-6-Diamidino-2-phenylindole; Sigma). As lâminas foram fechadas e os cortes foram analisados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Toquio, Japão) com sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C.

4.10 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

Para a marcação da sonda, os oligonucleotídeos do CREB contendo a sequência 5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3' foram marcados com a adição de γ -³²P ATP numa solução contendo tampão T4 quinase (em mM: Tris-HCl 700, pH 7,6; MgCl₂ 100 e DTT 50), T4 quinase e água; nas seguintes concentrações: 3,5 pmol de oligonucleotídeo 1 U/ μ L de T4 quinase, 1 μ L de γ -³²P ATP (3Ci/mmol), 1 μ l de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 μ L de volume de reação). Após incubação a 37 ° C por 10 min, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25.

As colunas (Microspin G-25) foram posicionadas em um tubo de microcentrífuga, centrifugando-se por 1 min a 3.000 rpm, e em seguida foram transferidas para um novo tubo, aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após a centrifugação, o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/ μ L. O método está padronizado no nosso laboratório.

Para a reação de ligação e corrida do gel, foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X ($MgCl_2$ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%), extrato nuclear (2,5 μ g de proteína) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final. O tubo foi incubado por 20 min em temperatura ambiente, adicionando em seguida a sonda marcada (1 μ L), e novamente o tubo foi incubado por 30 min em temperatura ambiente.

Para visualizar a corrida adicionou-se 1 μ L de azul de bromofenol ao controle (-). O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida que consiste em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). A corrida ocorreu por um período aproximado de 2 h a 150-160 V. Ao final desta, o gel foi seco e permaneceu definitivamente fixado em um papel filtro especial. Para revelar os resultados, um filme de raios-X foi exposto mediante ao papel filtro contendo a corrida, em cassete a $-80^\circ C$, onde permaneceu por 14 dias.

4.11 Cultura primária pós-natal de neurônios hipocampais

A cultura neuronal foi realizada a partir de neonatos, conforme protocolo descrito por Grabert e colaboradores (GRABERT et al., 2018). Ratos neonatos com até 2 dias de vida foram submetidos a eutanásia por decapitação com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Os córtices foram afastados, as meninges foram retiradas com o auxílio de pinças, e então os hipocampos foram expostos e transferidos para um tubo contendo solução gelada de HBSS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O tubo foi levado ao fluxo laminar onde a solução HBSS foi retirada e 3 mL de solução de tripsina 0,05% foi adicionada por 30 min, a $37^\circ C$.

Após o período de ação da tripsina, o tecido foi lavado 2 vezes com HBSS e 2 vezes em NB27 (Meio Neurobasal) (Sigma-Aldrich) contendo 2% de B27, 2 mM de L-Glutamina, 1% penicilina/estreptomicina com acréscimo de Soro Fetal Bovino 5%, sendo que na última etapa foi dissociado mecanicamente com auxílio de um pipetador até a homogeneização completa do tecido. O homogenato foi centrifugado em temperatura ambiente, por 10 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspendido em 4 mL de meio de cultivo, como descrito acima. Nesse momento, o homogenato foi vertido sobre uma peneira celular com poros de 70 µm de diâmetro. Por fim, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 2×10^4 células sob lamínulas de vidro previamente tratadas com PEI (Sigma-Aldrich) na concentração de 80 µg/mL, *overnight* a 37 °C. O meio foi trocado duas vezes por semana e substituído por um meio de manutenção, (meio Neurobasal com 2% de B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,5 mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich) sem soro fetal bovino). Aproximadamente metade do meio da troca era mantido e novo meio era adicionado sobre ele para manutenção dos fatores tróficos liberados pelas próprias células. As culturas foram mantidas por aproximadamente 21 dias em estufa a 37 °C, 90% de umidade e 5% de CO₂, até alcançarem condições adequadas de conexões neuronais bem estabelecidas.

4.11.1 Ensaio de imunofluorescência em cultura

Para caracterizar as culturas celulares estudadas, assim como verificar as porcentagens das subpopulações celulares existentes e analisar a quantificação dos receptores de neurotrofinas foram feitos ensaios de imunofluorescência. As células foram semeadas na densidade celular de 2×10^4 em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de vidro no fundo, previamente tratadas com PEI. Após 21 dias de cultivo, as células foram fixadas com PFA 4% a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida, lavadas 3 vezes com PBS (Na₂HPO₄ 7,7 mM, NaH₂PO₄ 2,3 mM, NaCl 150 mM). Para permeabilização, 0,05% Triton x-100 foi adicionado por 5 min. Os poços foram lavados novamente 3 vezes com PBS e incubados com tampão de bloqueio (5% BSA diluído em PBS contendo 0,01% de Triton x-100 e 5% soro de cabra) durante 1 h a temperatura ambiente. Após esse período, foram incubados com os anticorpos primários previamente diluídos em solução de tampão de bloqueio e deixados na geladeira *overnight*.

Os anticorpos utilizados foram: iba-1 (1:500, Wako FUJIFILM), GFAP (1:250, Cell Signaling), NeuN (1:2000, Millipore ou 1:100, Cell Signaling), p75NTR (D4B3) (XP® Rabbit mAb 1:500), p75NTR (D4B3) (Alomone labs 1:500), Anti-TrkA (Alomone labs - extracellulular 1:500), Anti-TrkB(Alomone labs - extracellulular 1:500) e Anti-TrkC (Alomone labs - extracellulular 1:500).

No dia seguinte, os anticorpos primários foram retirados e as células foram lavadas 3x com PBS à temperatura ambiente. Então, o anticorpo secundário correspondente foi adicionado, diluído 1:1000 em PBS com Triton x-100 0,01% por 2h, protegido da luz. Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse (Thermo Fisher), Goat Anti-rabbit 594 (Invitrogen), Alexa Fluor 594 Donkey anti-Rabbit (Thermo Fisher), Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG (Thermo Fisher) e Alexa Fluor 594 Donkey anti-Mouse IgG (Invitrogen). Posteriormente, as células foram incubadas com DAPI (1:10.000) por 1 min e lavadas 3 vezes com PBS. Então, as lâminulas foram retiradas dos poços, colocadas em uma lâmina de microscopia e montadas com ImmunoMount (Thermo Scientific). Após secagem, elas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i, Toquio, Japão) com sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C, onde se analisou 4 campos por lâminula por grupo experimental.

4.11.2 Tratamento das células

Os grupos experimentais receberam os seguintes tratamentos: (i) aCSF (controle), (ii) OUA 10 nM, (iii) NMDA 100 μ M e (iv) OUA 10 nM + NMDA 100 μ M. Ambos os compostos foram inicialmente diluídos em líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (NaCl 111 mM, KCL 4 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 2H₂O 1,5 mM, Glicose 10 mM, HEPES 20 mM, p.H 7,4 sem magnésio) e depois diluídas em meio de manutenção (meio Neurobasal com 2% B27, 1% penicilina/estreptomicina e 0,5 mM de L-Glutamina) até atingir a concentração desejada no poço. O grupo controle recebeu apenas aCSF diluído em meio de manutenção. O tratamento com NMDA foi feito por 5 minutos. Nesse período o meio de manutenção foi retirado e os meios contendo as drogas referentes a cada grupo foram adicionados por 5 min conforme previamente padronizado por D`ORSI et al., 2015. Após transcorridos o tempo de 5 min de

exposição inicial, os grupos que receberam OUA 10 nM com ou sem NMDA 100 μ M foram incubados por 6 h com meio de manutenção contendo OUA 10 nM. O grupo aCSF e NMDA 100 μ M foram incubados apenas com meio de manutenção a 37° C, sendo levados e mantidos na estufa até a realização dos experimentos. Ou seja, os grupos foram expostos por 5 minutos ao estímulo excitotóxico, com ou sem OUA, e aqueles que receberam OUA continuaram com ela por mais 6h após o estímulo inicial de 5 minutos.

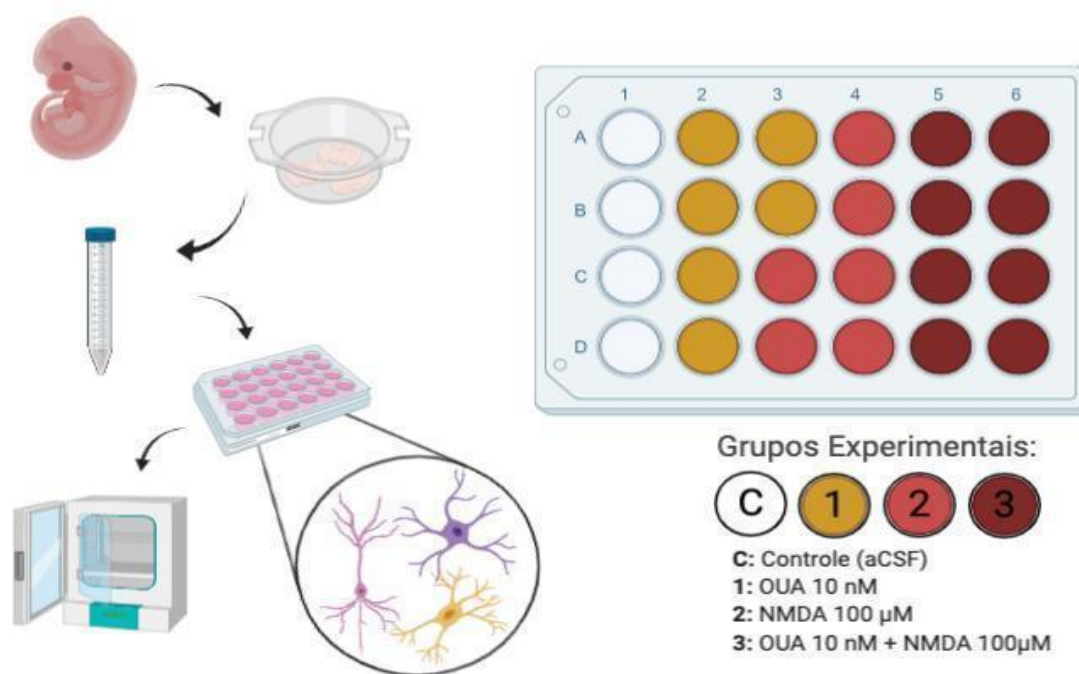


Figura 5. Esquema ilustrativo do protocolo e tratamento das culturas de neurônios hipocâmpais. Após a dissecção dos cérebros de ratos neonatos para obtenção dos hipocâmpais, as culturas contendo neurônios (célula rosa), astrócitos (célula roxa) e micróglia (célula laranja) foram mantidas em estufa de CO₂ por até 21 dias. Para os tratamentos, as placas foram divididas em 4 grupos experimentais diferentes contendo de 4-8 lamínulas. Figura criada pelo Biorender.com.

4.11.3 Ensaio de apoptose em cultura – TUNEL

Para avaliar o perfil apoptótico do tratamento com NMDA 100 μ M foi realizado ensaio TUNEL. Após transcorridos 6 h dos tratamentos, os meios de manutenção contendo ou não OUA 10 nM foram retirados e as células foram fixadas com PFA 4% em temperatura ambiente. O kit *Click-iT™ Plus TUNEL Assay for In Situ Apoptosis Detection, Alexa Fluor™ 594 dye* (Invitrogen) foi utilizado e o protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foi realizado ensaio de imunofluorescência conforme descrito no

item 5.11.1, com marcação para neurônios (NeuN), astrócitos (GFAP) e micróglia (IBA-1). As células foram consideradas positivas para apoptose quando exibiram marcação vermelha referente ao comprimento de onda 594 nm do kit TUNEL. A taxa de neurônios apoptóticos foi calculada por meio da porcentagem de células com núcleo TUNEL positivas que se sobrepunham com a marcação neuronal, sobre o número de neurônios totais no campo. Em cada lamínula, 4 campos diferentes foram analisados. Um total de 3 ensaios de TUNEL independentes foram realizados, com número amostral de 4-8 lamínulas para cada grupo.

4.11.4 Ensaio de ELISA

Foi utilizado o método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para detecção da concentração das seguintes neurotrofinas: NGF (R&D System cat#DY556), BDNF (Elabscience Biotechnology Co. cat#E-EL-M0203), NT-3 (Wuhan Fine Biotech Co. cat#ER0055) E NT-4 (Biorbyt Ltd. cat#orb555312) nas amostras (N=6-8) de acordo com o fabricante. As concentrações foram estimadas a partir de uma curva padrão e expressa em função da concentração de proteína total da amostra em pg/ μ g de proteína.

4.11.5 Ensaio de PCR Tempo Real

O RNA total das células foi extraído utilizando Kit RNeasy (QIAGEN) e 3 μ g foram tratados com DNase I e submetidos a transcrição reversa utilizando oligo(dT)20 e MMLV de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Os transcritos foram amplificados utilizando primers específicos para cada gene a ser avaliado. Como controle negativo, reações foram realizadas com produtos de RT onde a enzima foi omitida ou na ausência de cDNA. Cada reação foi realizada em duplicata e conteve 4 μ L de cDNA diluído 5 vezes, 6 μ L de SyBr Green Master mix (Roche Diagnósticos) e 300 nM de primers. A condição da reação foi: 95°C por 5 min., seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 10 s e 72°C por 30 s. Uma análise de curva de melting de 76°C a 84°C foi realizada no final de cada reação para controle de qualidade. O “cyclethreshold” (Ct) e a eficiência dos pares de primers foram estabelecidos automaticamente de acordo com algoritmos do sistema do termociclador utilizado (ABI 7500 FAST, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A expressão gênica relativa foi determinada

utilizando o método Delta–DeltaCt ($\Delta\Delta\text{Ct}$)(LIVAK, SCHMITTGEN, 2001). Os genes analisados no estudo foram *bdnf* (Rn02531967_s1 - Catalog number: 4453320 - Target species: Rat – BDNF), *Ngfb* (Rn01533872_m1 - Catalog number: 4331182 - Target species: Rat – NGF/ Chromosome Location: Chr.2: 204886158 - 204939523), *Tnf- α* (Rn01525859_g1 Catalog Number: 4453320 Target Species: Rat) e *Il- β* (Rn00580432_m1 Catalog Number: 4331182 Target Species: Rat).

4.12 Análise e apresentação dos resultados

Os dados obtidos do ensaio de Western Blot, EMSA e Imunofluorescência foram analisados por meio da densidade óptica pelo programa “ImageJ” (National Institute of Health, USA). A porcentagem de células obtida dos ensaios de imunofluorescência foi obtida usando o *plug in Cell Counter* do software ImageJ. Para o RT-PCR foi utilizado One-Way ANOVA não paramétrico seguido de pós-teste Kruskal-Wallis (GONI; GARCÍA; FOISSAC, 2009; PFAFFL, 2001). Para os dados obtidos de todos os outros ensaios restantes foi utilizado One-Way ANOVA paramétrico seguido de pós-teste Tukey ou Bonferroni, onde para as diferenças significantes foi considerado o valor de $p \leq 0,05$. Todos os tratamentos e gráficos representativos foram realizados pelo Software GraphPad Prism 9.0. Os gráficos estão representados como a média dos valores \pm erro padrão da média (E.P.M). As figuras científicas de resumo da metodologia/resultados foram criadas pelo site Biorender.com.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica para validação das coordenadas estereotáxicas por injeção de traçador fluorescente

No intuito de primeiramente avaliar se as coordenadas escolhidas para a cirurgia de estereotaxia e o volume infundido alcançavam a região desejada, foi realizada a infusão de traçador retrógrado fluorescente, LumaFluor Green RetrobeadsTM a 5% em salina 0,9% no volume 2 μl (SILVA et al., 2016). Por meio dessa técnica foi possível verificar que as coordenadas escolhidas para o implante das cânulas-guia e o volume infundido se mostraram adequados para

o protocolo cirúrgico, assim como previamente descrito por ORELLANA et al., 2018.

As figuras 6 a 9 são representativas das marcações obtidas pela infusão do traçador Retrobeads fluorescente (verde) e DAPI (azul), que se encontram predominantemente situadas na região do hipocampo, distribuídos pela camada CA1, adentrando também camadas de células granulares da região do giro dentado do hipocampo (GD).

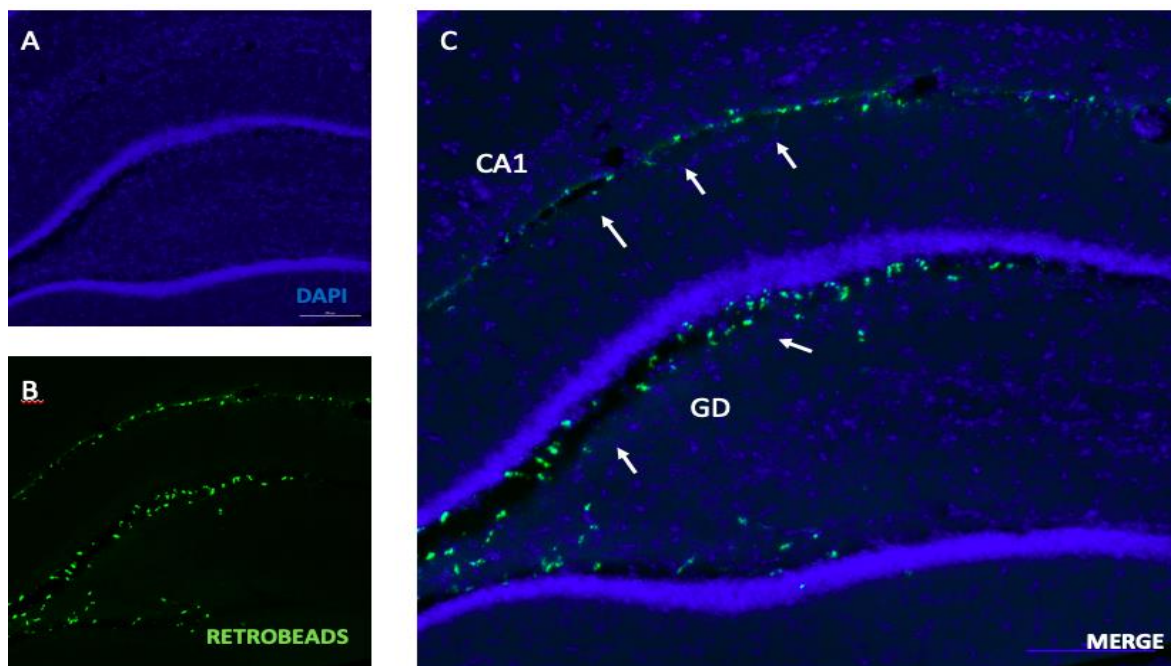


Figura 6. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes. As imagens representam um hipocampo com marcação nuclear para DAPI em azul (A), retrobeads fluorescentes em verde (B) e a sobreposição dos dois (C) o que permite visualizar com clareza as regiões que receberam o traçador mostrando a fluorescência emitida na região dorsal de CA1 e giro dentado do hipocampo. CA1: região CA1 do hipocampo; GD: região do giro dentado. n=6. Aumento de 20x.

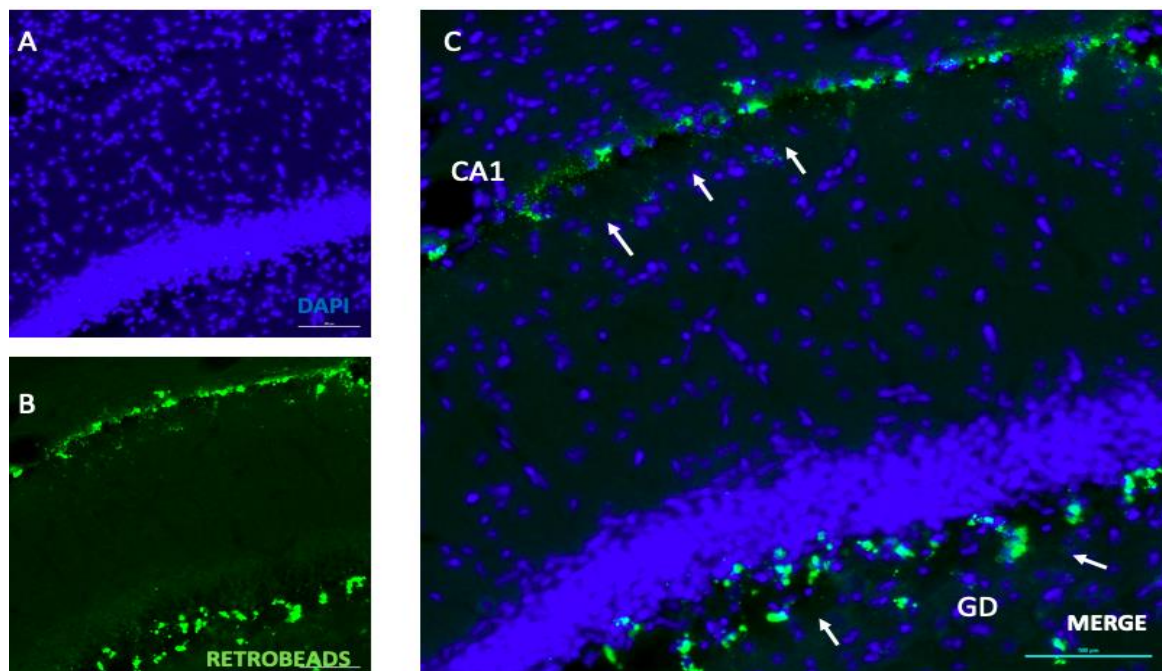


Figura 7. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes. As imagens representam um encéfalo com marcação para DAPI em azul (A), retrobeads fluorescentes em verde (B) e a sobreposição dos dois (C) o que permite visualizar com clareza as regiões que receberam o traçador mostrando a fluorescência emitida na região dorsal de CA1 e giro dentado do hipocampo. CA1: região CA1 do hipocampo; GD: região do giro dentado. n=6. Aumento de 40x.

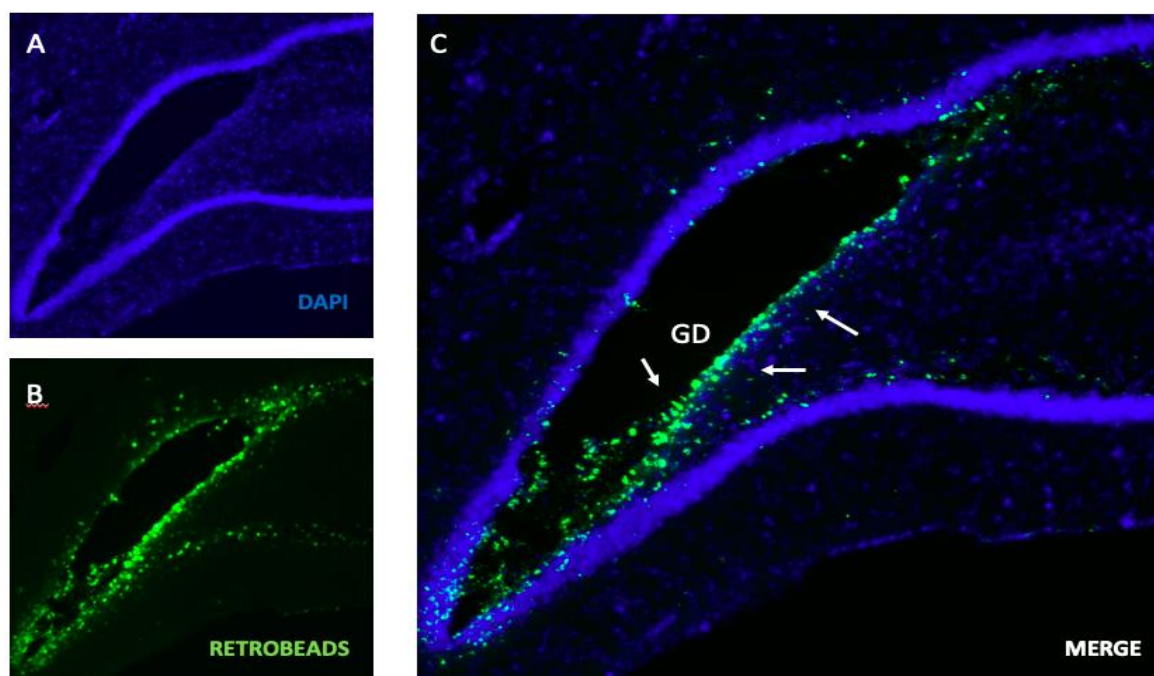


Figura 8. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes. As imagens representam um encéfalo com marcação para DAPI em azul (A), retrobeads fluorescentes em verde (B) e a sobreposição dos dois (C) o que permite visualizar com clareza as regiões que receberam o traçador mostrando a fluorescência emitida na região dorsal de CA1 e giro dentado do hipocampo. CA1: região CA1 do hipocampo; GD: região do giro dentado. n=6. Aumento de 40x.

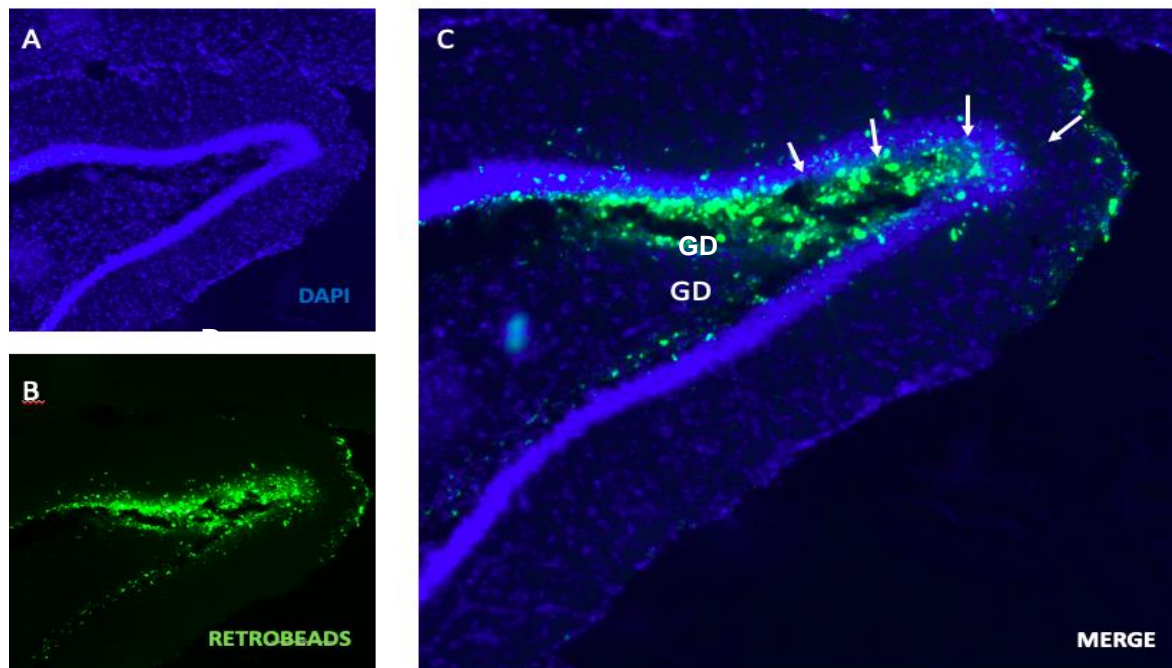


Figura 9. Imagem digital de secção coronal do cérebro de rato após 12 h de infusão de retrobeads fluorescentes. As imagens representam um encéfalo com marcação para DAPI em azul (A), retrobeads fluorescentes em verde (B) e a sobreposição dos dois (C), o que permite visualizar com clareza as regiões que receberam o traçador mostrando a fluorescência emitida na região dorsal de CA1 e giro dentado do hipocampo. CA1: região CA1 do hipocampo; GD: região do giro dentado. n=6. Aumento de 40x

5.2 Ação anti-apoptótica da OUA frente a um estímulo excitotóxico *in vivo*

Ensaio para determinação da taxa de apoptose por TUNEL foi realizado em secções dos cortes de cérebros de ratos submetidos aos diferentes tratamentos. Na figura 10, podemos observar por meio de uma imagem representativa de imunofluorescência do grupo controle (aCSF) que o ensaio de TUNEL e de imunofluorescência não funcionaram, não sendo possível observar marcação nítida do DAPI e anticorpos, nem determinar se os tratamentos com NMDA levaram a maior taxa de apoptose ou se a OUA 10 nM foi capaz de reverter. Esse ensaio foi realizado mais uma vez e de fato o conjunto (cortes kit e marcação) não apresentou resultado satisfatório.

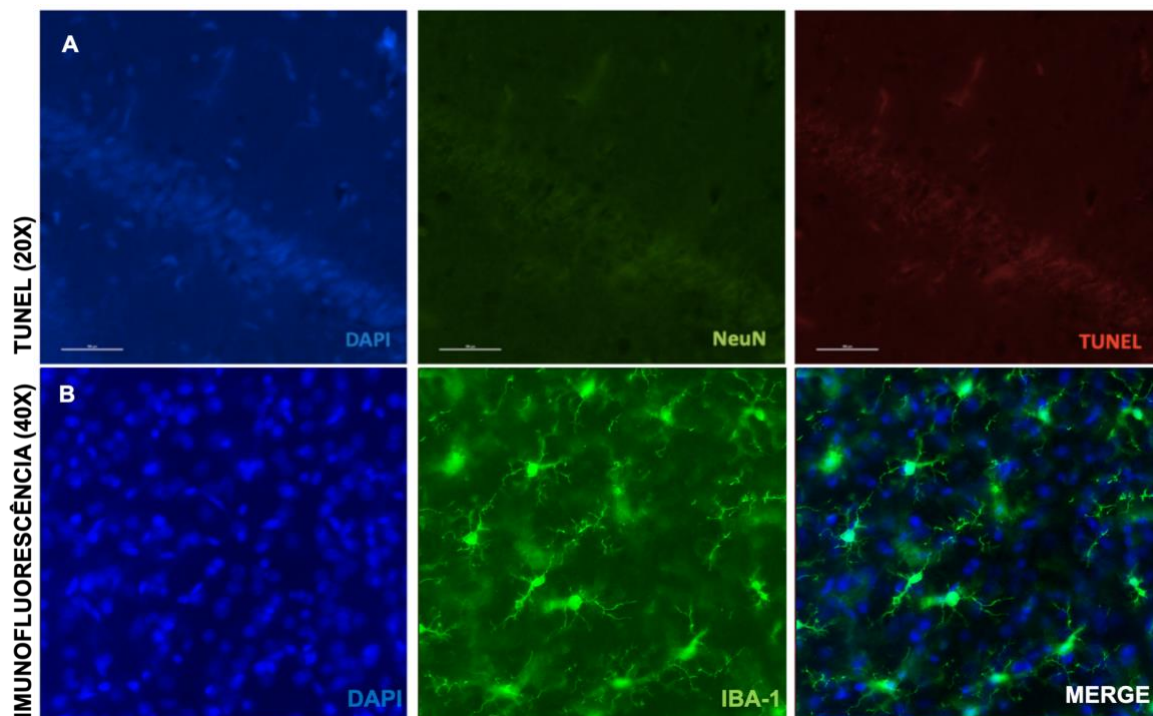


Figura 10. Imunofluorescência e TUNEL de secções de hipocampo de rato após 6 h de infusão com aCSF. As imagens representam parte da região hipocampal (A) com marcação para núcleo celular por DAPI (azul), neurônio por NeuN (verde) e TUNEL (vermelho), onde nem as marcações, nem o ensaio de TUNEL mostraram diferença visual perante os controles negativos (dados não mostrados) Em (B) temos uma representação do ensaio de imunofluorescência realizado para marcação de núcleo celular por DAPI (azul), micróglia por IBA-1 (verde) e merge (azul e verde), para demonstrar a viabilidade de marcação nas secções do hipocampo.

5.3 Perfis de modulação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose e na regulação de ciclo celular ao longo de 6 horas

Por meio dos extratos citosólicos obtidos dos hipocampos dos ratos, ensaios de Western Blotting foram realizados para verificar o perfil de modulação da expressão de algumas proteínas ao longo do decurso temporal de 6 h de tratamento. As proteínas analisadas e mensuradas foram: Bcl-xL, Ciclina D1 e Espectrina.

A figura 11 mostra um gráfico referente a expressão de Ciclina D1, uma proteína da família das ciclinas importante para a entrada e transição na fase G1/M. Diferentes ciclinas exibem padrões de expressão e degradação que se coordenam com a transição de eventos referentes as fases do ciclo celular. Como observado, não houve diferença estatística significativa na expressão de Ciclina D1 em nenhum dos grupos tratados.

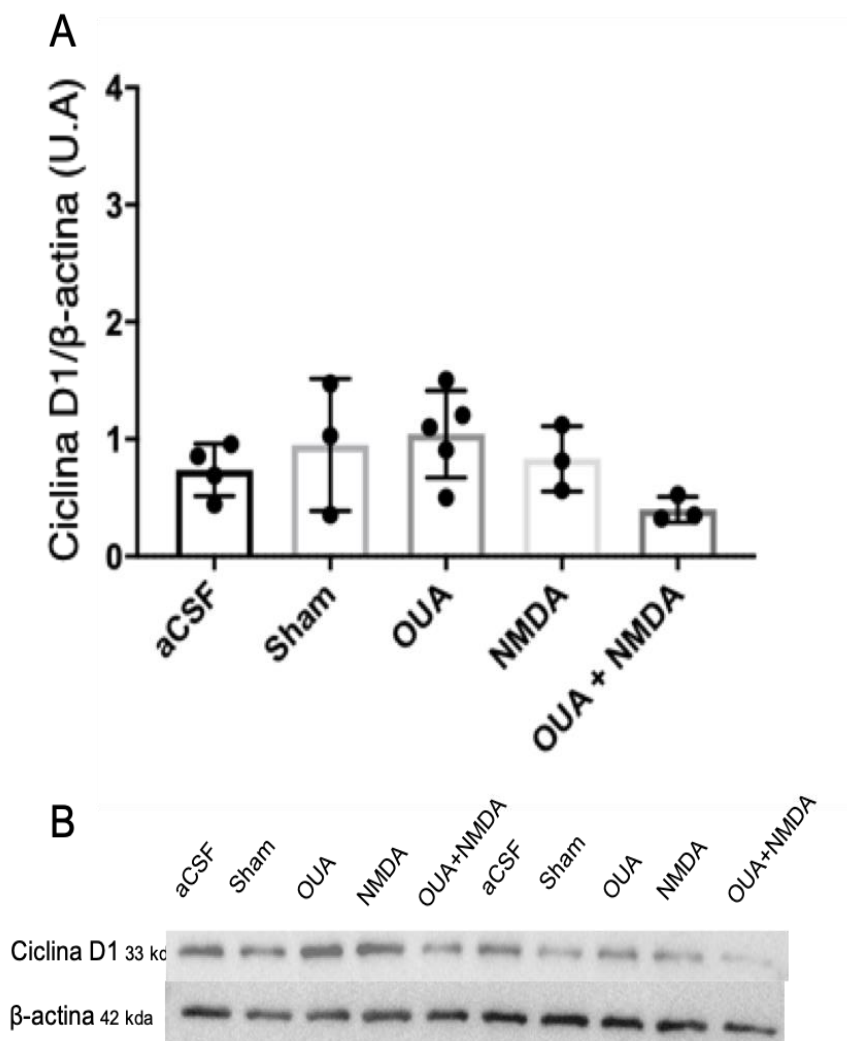
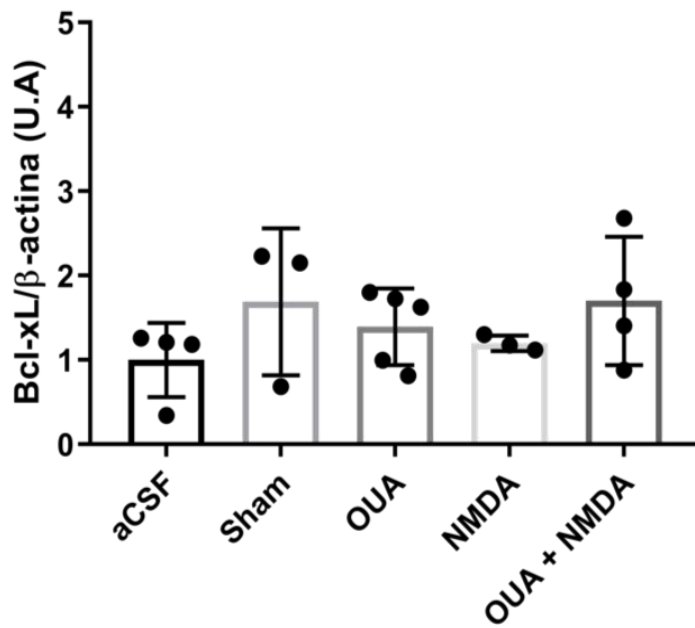


Figura 11. Modulação de Ciclina D1 nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 μM e OUA 10 nM + NMDA 100 μM ao longo de 6 horas. Imagem digital do ensaio de Western Blot (B) e Teste de Variância de uma via seguido de pós-teste Bonferroni (A), normalizados pela relação entre Ciclina D1 e β-actina. Os dados não mostram diferença significativa na modulação da expressão de Ciclina D1 em nenhum dos grupos tratados. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Grupos aCSF n=4; Sham n=3; OUA n=5; NMDA=3; OUA+NMDA N=4.

Na figura 12, podemos analisar a expressão de Bcl-xL, que age como uma proteína anti-apoptótica, pertencente à família Bcl-2 na porção mitocondrial, evitando a liberação de citocromo-C, o que leva a ativação de caspases e por consequência, morte celular por apoptose. Não se observou diferença significativa em nenhum dos grupos tratados.

A



B

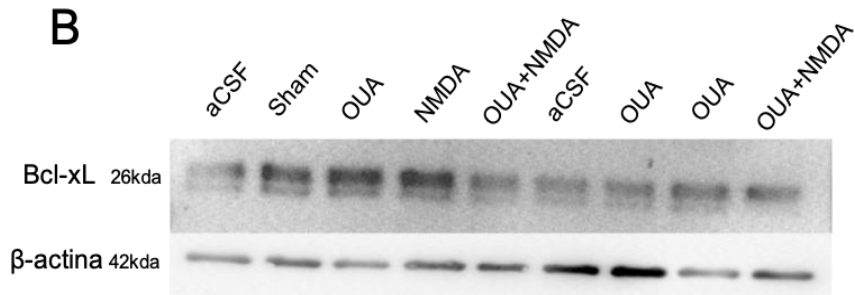


Figura 12. Modulação de Bcl-xL nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA 10 nM + NMDA 100 μ M ao longo de 6 horas. Imagem digital do ensaio de Western Blot (B) e Teste de Variância de uma via seguido de pós-teste Bonferroni (A), normalizados pela relação entre Bcl-xL e β -actina. Os dados não mostram diferença significativa na modulação da expressão de Bcl-xL por nenhum dos grupos tratados. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Grupos aCSF n=4; Sham n=3; OUA n=5; NMDA=3; OUA+NMDA N=4.

Para verificar por Western Blot se os tratamentos eram capazes de modular a taxa de apoptose, a marcação para a espectrina e seus subprodutos foi feita. As espectrinas são uma família de proteínas estruturais que se organizam em tetrâmeros para juntamente com a actina compor o citoesqueleto celular. Os tetrâmeros podem ser compostos por isoformas α (α I-II) e β (I-IV). Nos neurônios estão presentes as isoformas α II e β II e ambas são substratos da ação proteolítica da caspase-3 e das calpaínas. No ensaio de Western Blot realizado, o anticorpo usado reconhece a espectrina α II que tem peso molecular de 250-280 kDa, mas sua clivagem pela ação da caspase-3 pode gerar produtos de diferentes tamanhos moleculares como 150 e 120 kDa. Assim, a

quantificação dos fragmentos é um indicativo indireto da ação da caspase-3. Não houve diferença estatística entre os grupos, de forma que não podemos afirmar se o tratamento com NMDA é capaz de promover aumento da apoptose e se a OUA é capaz de impedir tal processo (Figura 13).

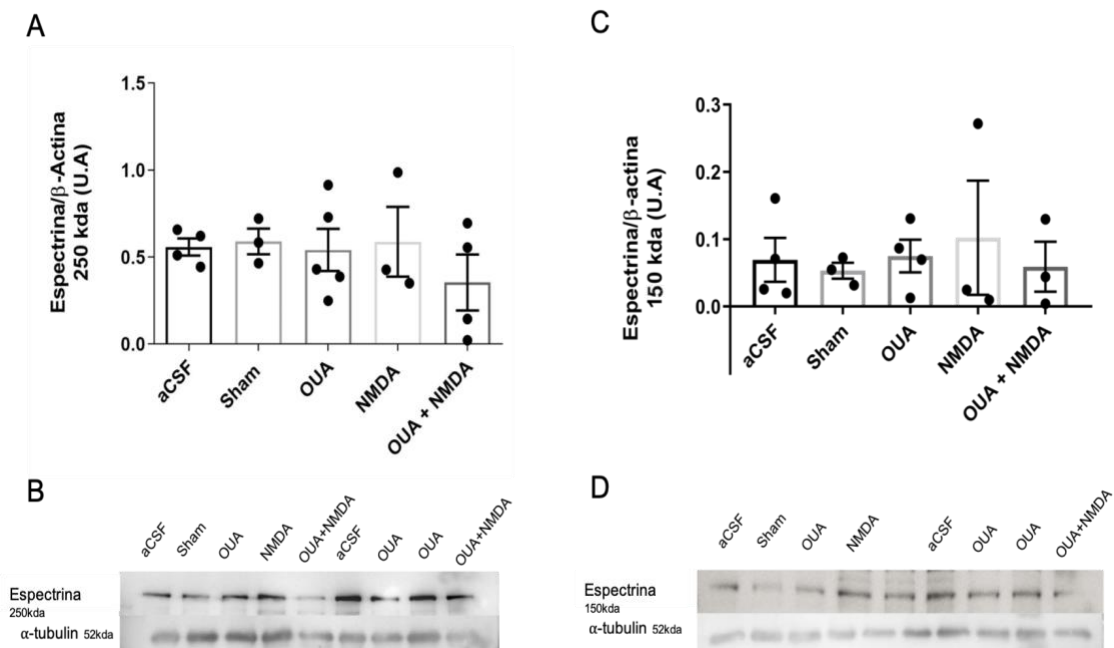


Figura 13. Modulação de Espectrina nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA 10 nM + NMDA 100 μ M ao longo de 6 horas. Imagem digital do ensaio de Western Blot (B e D) e Teste de Variância de uma via seguido de pós-teste Bonferroni (A e C), normalizados pela relação entre os fragmentos de 250 kDa e 150 kDa de Espectrina e α -tubulina. Os dados não mostram diferença significativa na modulação da expressão de Espectrina por nenhum dos grupos tratados. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Grupos aCSF n=4; Sham n=3; OUA n=4/5; NMDA=3; OUA+NMDA N=3/4.

5.4 Análise da mobilidade eletroforética de CREB

É descrito na literatura que concentrações nanomolares e não inibitórias de OUA podem ativar vias clássicas de sinalização como EGFR/Src-Ras-ERK e PI3K-AKT e assim, podem levar a ativação de fatores de transcrição. Para verificar a ocorrência da ativação do fator de transcrição CREB ao longo do decurso de 6 h de tratamento, foi realizado ensaio de desvio de mobilidade eletroforética (EMSA) com extrato nuclear das amostras de hipocampo, o que nos permite observar interações de complexos protéicos com ácidos nucléicos. A figura 14 sugere ausência de diferença estatística significativa entre os grupos na ativação do fator de transcrição CREB.

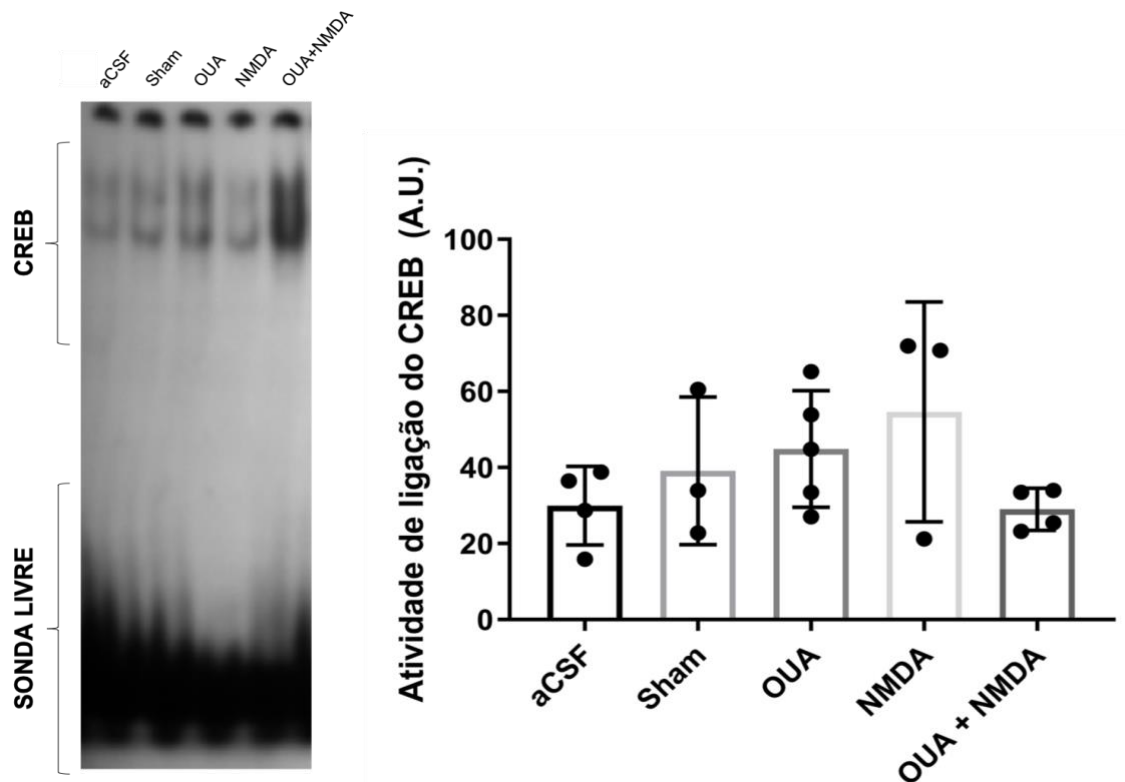


Figura 14. Perfil de ativação do CREB por Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA) nos grupos controle, OUA 10 nM, NMDA 100 µM e OUA 10 nM + NMDA 100µM ao longo de 6 horas. Autorradiografia de ensaio de EMSA (A); análise densitométrica das bandas (B). Os dados não mostram diferença significativa na ativação de CREB em nenhum dos grupos tratados. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média por teste de variância ANOVA de uma via seguido do pós-teste Bonferroni. Grupos aCSF n=4; Sham n=3; OUA n=5; NMDA=3; OUA+NMDA N=4.

5.5 Ação anti-apoptótica da OUA em modelo *in vitro*

Após análise do conjunto de resultados iniciais mostrados até o presente momento, não observamos indícios diretos ou indiretos significativos nos ensaios de Western Blot, EMSA e TUNEL, sugerindo ausência de fenômenos relacionados a excitotoxicidade e de efeitos da OUA frente ao tratamento com NMDA na concepção desse modelo em particular, apesar do procedimento cirúrgico, injeção e tratamento terem sido realizados no lugar e coordenada corretos.

Portanto, decidimos propor um modelo mais simplificado, controlado e direto para observação inicial do fenômeno desejado, assim como para explorar os mecanismos de proteção, caso a OUA venha a apresentar ação anti-apoptótica. Tal modelo *in vitro* utiliza a cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal. Resultados estes serão discutidos nas sessões abaixo.

5.5.1 Caracterização da cultura primária de neurônios hipocampais

A primeira etapa realizada nos ensaios *in vitro* foi verificar a constituição fenotípica das subpopulações existentes nas culturas primárias de hipocampo de ratos pós-natal. Para isso, foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-NeuN (*neuronal nuclear protein*, marcação de neurônios), anti-GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, marcação de astrócitos), IBA-1 (*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*, marcação de micróglia) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, marcação de núcleo celular) após 21 dias de cultivo.

Por meio das figuras, é possível observar que as culturas primárias de neurônios hipocampais constituem, em média, de 62,5% de neurônios, 19% de astrócitos e 18,5% de micróglia. A quantificação dos resultados das marcações por imunofluorescência está representada na figura 15.

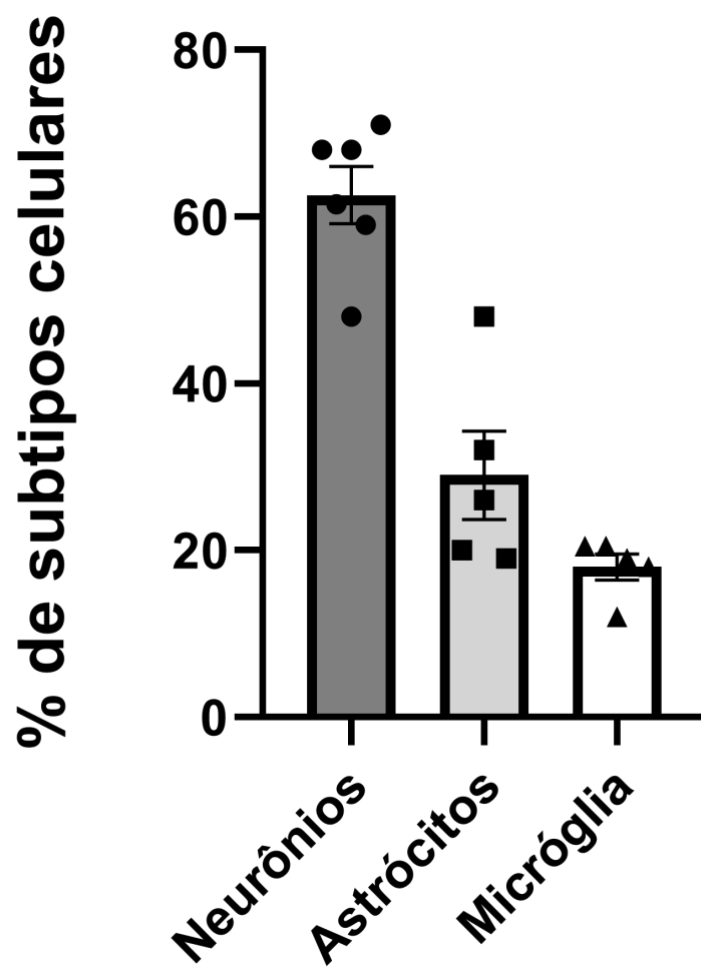


Figura 15. Quantificação dos diferentes tipos celulares em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal. As culturas de neurônios hipocâmpais se constituíram, em média, em 62,5% de neurônios, 19% de astrócitos e 18,5% de micrógliia. Foram realizados 5 experimentos individuais.

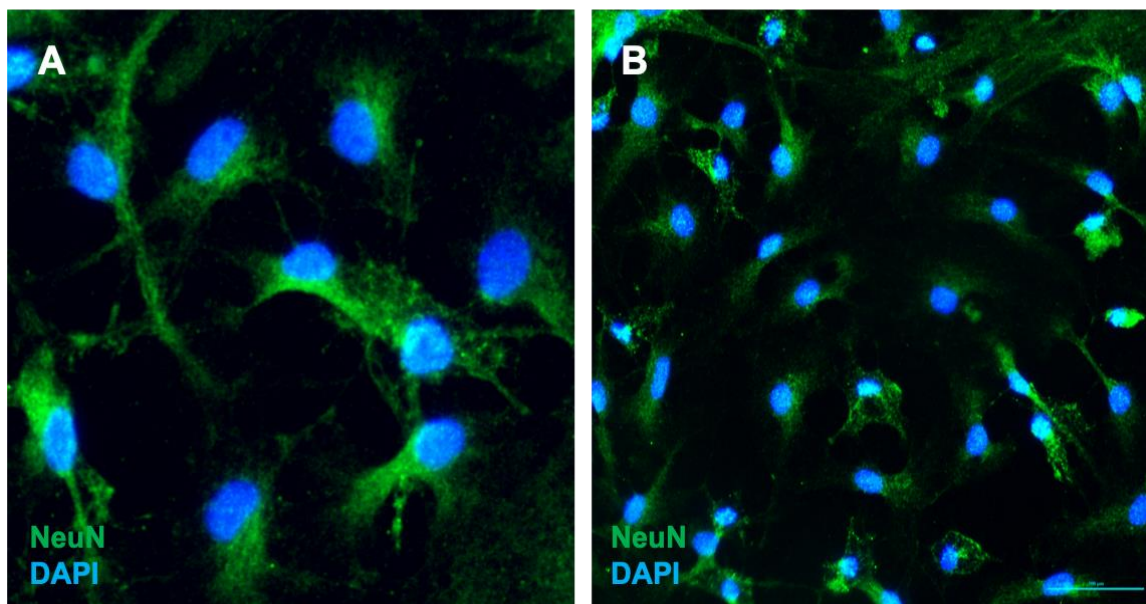


Figura 16. Caracterização de células neuronais em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal. Imagem representativa de neurônios em cultura de neurônios hipocâmpais sob aumento de 40x (A) e 20x (B) por DAPI (azul) representando marcação para núcleo celular e NeuN (verde) para neurônios. (n=5).

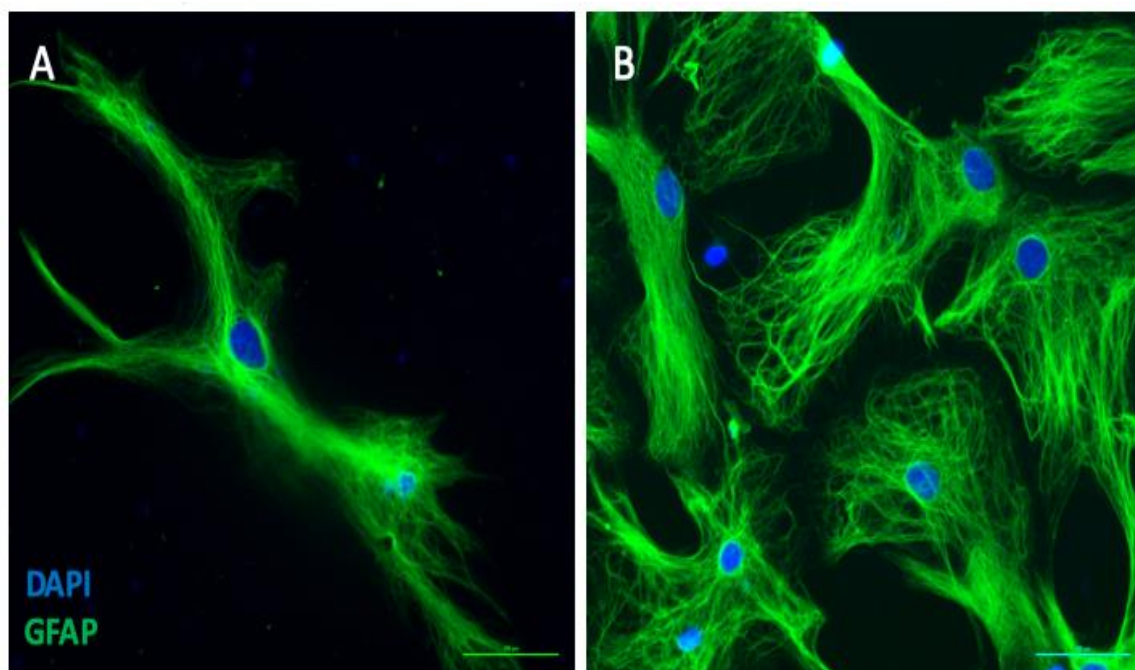


Figura 17. Caracterização de astrócitos em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal. Imagem representativa de astrócitos em cultura de neurônios hipocâmpais sob aumento de 40x (A) e 20x (B) por DAPI (azul) representando marcação para núcleo celular e GFAP (verde) para astrócitos (n=5).

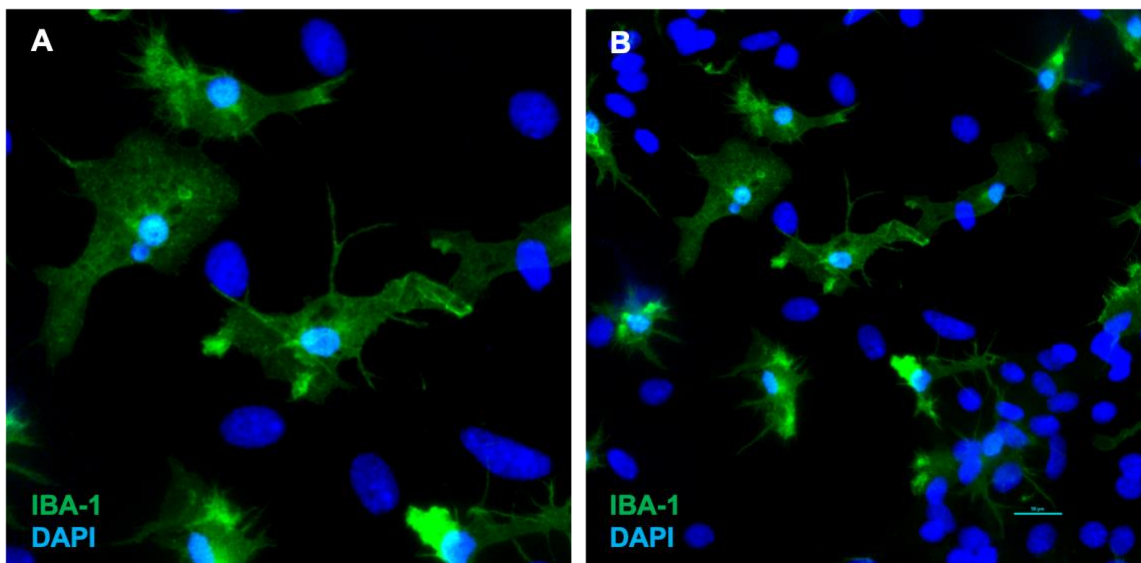


Figura 18. Caracterização de micróglia em cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal. Imagem representativa de micróglia em cultura de neurônios hipocâmpais sob aumento de 40x (A) e 20x (B) por DAPI (azul) representando marcação para núcleo celular e IBA-1 (verde) para micróglia (n=5).

5.5.2 Perfil anti-apoptótico da OUA após insulto excitotóxico em cultura primária de neurônios hipocâmpais maduros

Para avaliar o efeito anti-apoptótico da OUA *in vitro*, as culturas de neurônios hipocâmpais já maduros após 21 dias de cultivo foram expostas ao NMDA 100 μ M por 5 min, com ou sem OUA 10 nM, mimetizando assim o processo de excitotoxicidade proposto e previamente padronizado por D'ORSI et al., 2015. O esquema ilustrativo dos grupos e tratamentos utilizados se encontram na figura 4. Após o decurso da exposição inicial, os grupos que receberam OUA 10 nM com ou sem NMDA 100 μ M foram incubados por 6 h com meio de manutenção contendo OUA 10 nM. O grupo aCSF e NMDA 100 μ M foram incubados apenas com meio de manutenção a 37° C, sendo levados e mantidos na estufa para a detecção de núcleos apoptóticos por meio dos ensaios de imunofluorescência e TUNEL.

Na figura 19, observamos que os neurônios do grupo controle tratado apenas com aCSF não apresentam resposta e que após a exposição de 5 min com NMDA 100 μ M para estímulo excitotóxico, essa média sobe para 44,3% . Após adição de OUA, essa média é reduzida para 39,3 %, enquanto os neurônios tratados apenas com OUA mostraram média de 0% de morte. Houve diferença estatística entre os grupos aCSF e NMDA, porém não houve diferença

significativa entre os grupos NMDA e OUA+NMDA. Foram realizados 6 experimentos individuais, porém o protocolo de marcação não funcionou nos três primeiros. Após aquisição de novo kit, conseguimos obter dados de apenas 3 ensaios. Futuramente será necessário aumentar o número experimental para publicação.

Nas figuras 20 e 21 observamos as imagens representativas dos ensaios de imunofluorescência para as marcações de células neuronais com co-localização dos núcleos celulares com núcleos apoptóticos em células TUNEL positivas.

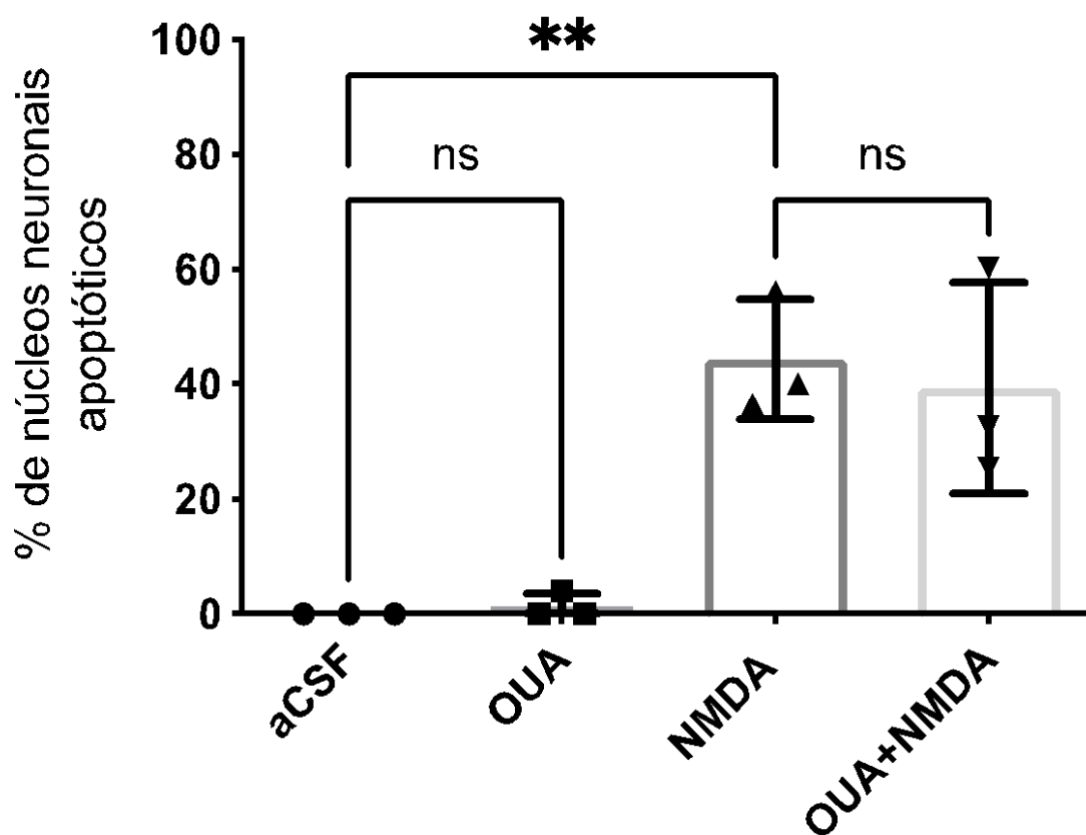


Figura 19. Análise estatística do ensaio de apoptose TUNEL em neurônios hipocâmpais após 5 minutos de exposição excitotóxica ao NMDA 100 μ M. Gráfico representativo da análise de morte por apoptose em cultura de neurônios hipocâmpais de ratos pós-natal nos grupos controle (aCSF), OUA, NMDA e OUA + NMDA. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média em 3 experimentos individuais.

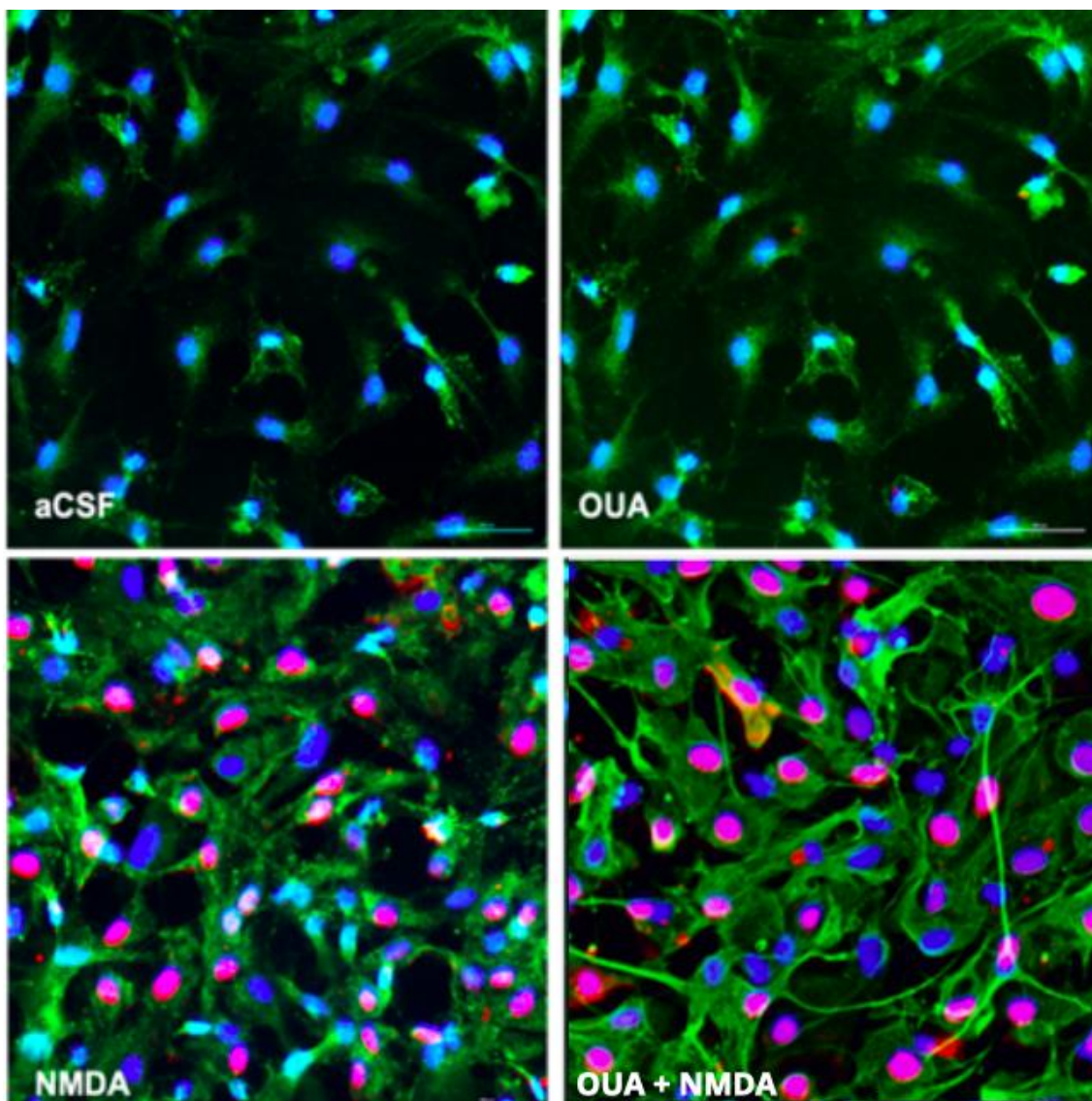


Figura 20. Fotomicrografia representativa da marcação de neurônios para TUNEL nos diferentes grupos tratados após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocâmpais. Imagens representativas de marcação para neurônio (verde), DAPI (azul), TUNEL (vermelho) e co-localização de TUNEL+DAPI (rosa) em cultura primária de neurônios hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo aCSF (A), OUA 10 nM (B), NMDA 100 μ M (C) e OUA+NMDA (D). Aumento de 20x.

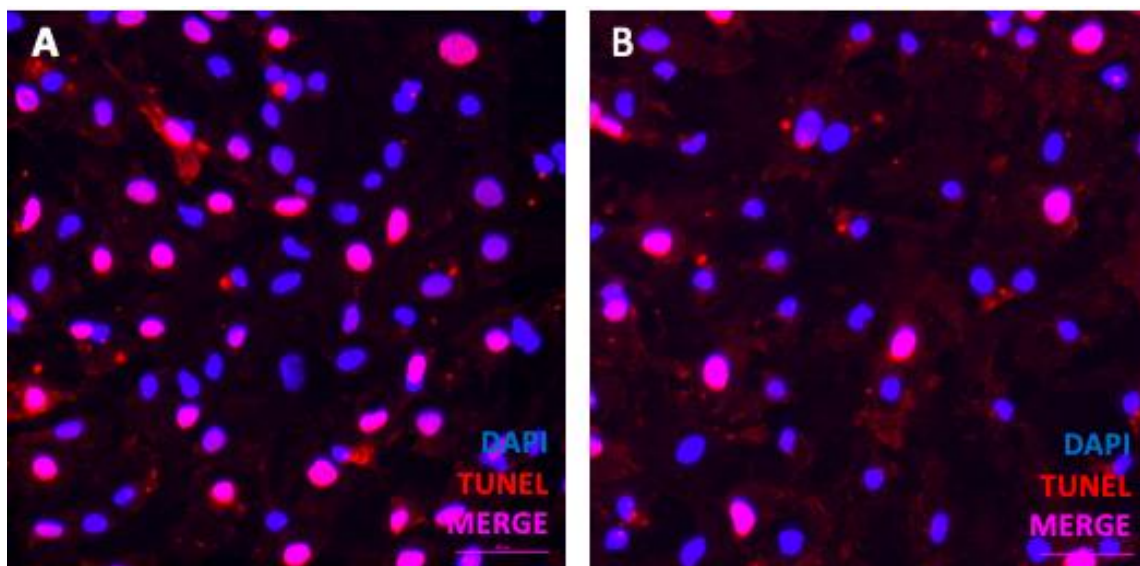


Figura 21. Fotomicrografia da colocação de marcação para núcleos celulares e apoptóticos no grupo NMDA e OUA+NMDA. Imagem representativa de cultura primária de células hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo NMDA 100 μ M (A) e com OUA 10 nM + NMDA 100 μ M (B). Marcação para núcleo celular com DAPI (azul), TUNEL (vermelho) e merge para co-localização (rosa). Aumento de 20x.

5.5.3 Perfil fenotípico da micróglia após insulto excitotóxico moderado em cultura neurônios hipocâmpais maduros

Visto que a micróglia é a primeira linha de defesa perante um insulto no SNC, resolvemos analisar a morfologia celular e verificar se nosso modelo de excitotoxicidade era capaz de alterar os estados típicos dessas células. Na figura 22, podemos observar que no grupo controle a micróglia se encontra em estado de repouso M0 com sua caracterização fenotípica clássica, com soma reduzida, bastante ramificação e até braços terciários. Porém, quando as culturas mistas de neurônios hipocâmpais já maduros foram expostas ao NMDA 100 μ M mimetizando assim um processo de excitotoxicidade, o padrão fenotípico da micróglia se altera para um estado reativo semelhante ao M1.

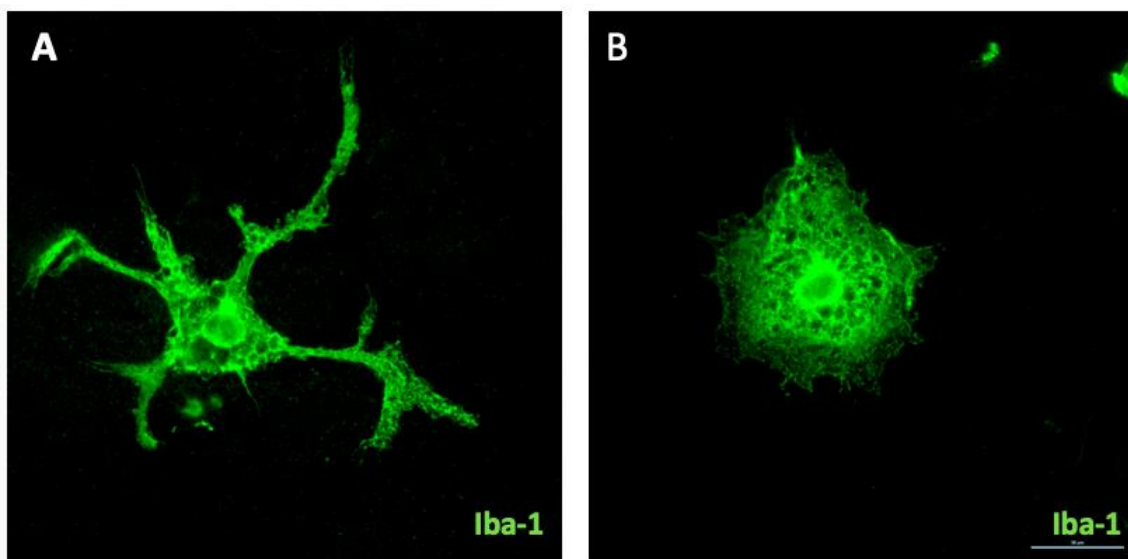


Figura 22. Fotomicrografia da mudança fenotípica da micróglia por insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocampais. Imagem representativa da morfologia celular de micróglia com marcação por iba-1 (verde) em cultura primária de neurônios hipocampais após 21 dias de cultivo. Observa-se a presença de micróglia ramificada no grupo aCSF (A) e micróglia reativa no grupo NMDA 100 μ M (B). Aumento de 40x.

Na figura 23, quando realizamos essa mesma comparação de mudança no fenótipo microglial com todos os grupos de tratamento, podemos observar que tanto o grupo controle quanto o grupo OUA apresentam uma maior robustez em quantidade de células, assim como uma caracterização típica da micróglia em estado de repouso M0. Quando observamos os grupos NMDA e OUA+NMDA, ambos parecem ter uma quantidade celular reduzida, provavelmente devido ao insulto excitotóxico, entretanto o grupo que foi pós-tratado com OUA por 6 horas parece conseguir reverter essa mudança de fenótipo de uma micróglia reativa em M1 para um estado de repouso em M0.

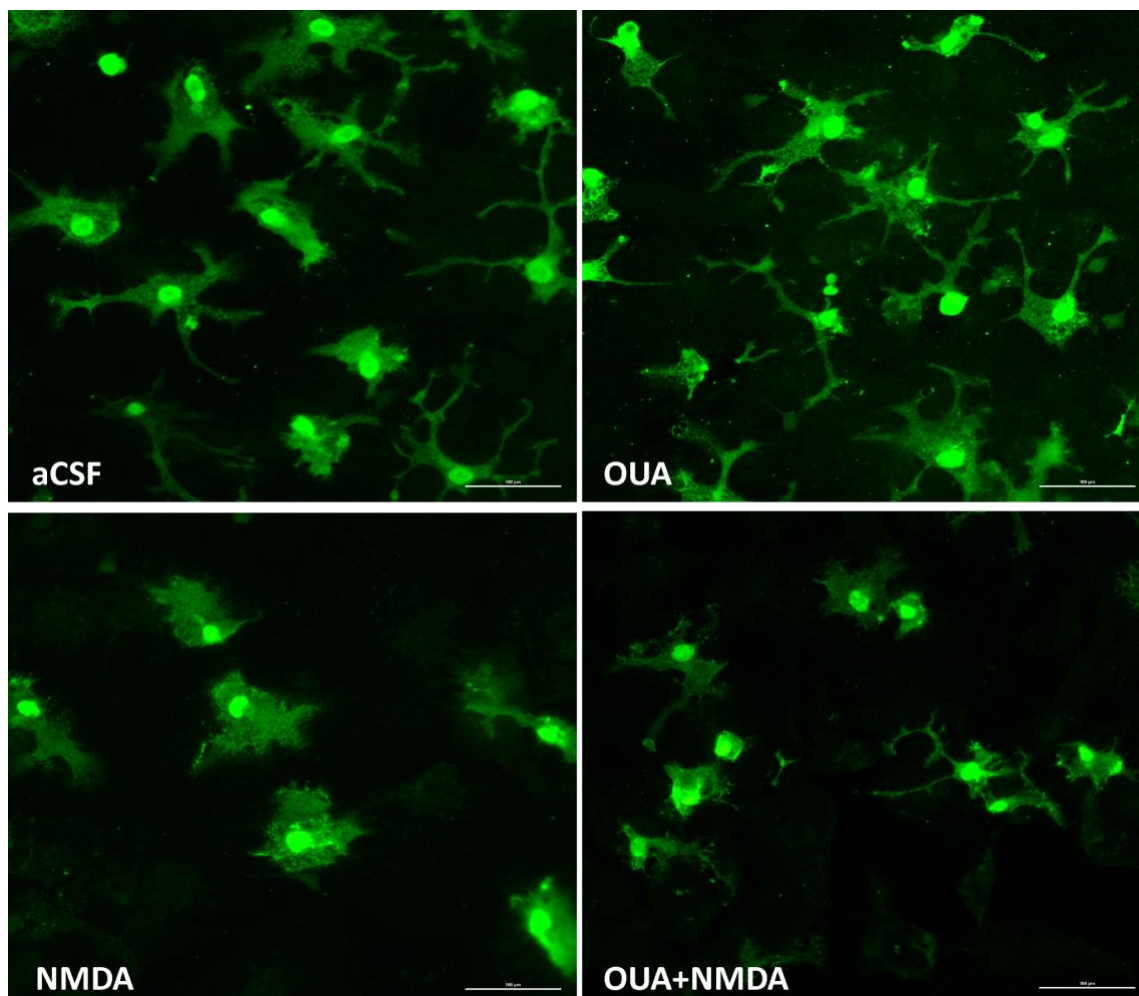


Figura 23. Fotomicrografia da reversão de mudança fenotípica da micróglia por OUA após insulto excitotóxico em neurônios hipocampais. Imagem representativa da morfologia celular de micróglia com marcação por IBA-1 (verde) em cultura primária mista de neurônios hipocampais após 21 dias de cultivo nos grupos controle (aCSF), OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA+NMDA. Nos grupos controle e OUA é possível observar a presença de micróglia bem ramificada típico do estado M0 em repouso, enquanto no grupo NMDA 100 μ M observamos uma micróglia em estado reativo M1 com menos ramificação, soma aumentado e típico aspecto amebóide no grupo. No grupo que sofreu insulto excitotóxico seguido de tratamento com OUA 10 nM (OU+NMDA), observa-se uma reversão desse fenótipo reativo de M1 para M0. Aumento de 20x.

5.5.4 Efeitos do tratamento com OUA nos receptores das neurotrofinas após insulto com NMDA 100 μ M em cultura primária de neurônios hipocampais maduros

Para observar os efeitos do tratamento da OUA na expressão dos receptores de neurotrofinas após insulto moderado excitotóxico com NMDA foram realizados ensaios de imunofluorescência para marcação dos seguintes receptores: p75NTR, TrkA, TrkB e TrkC.

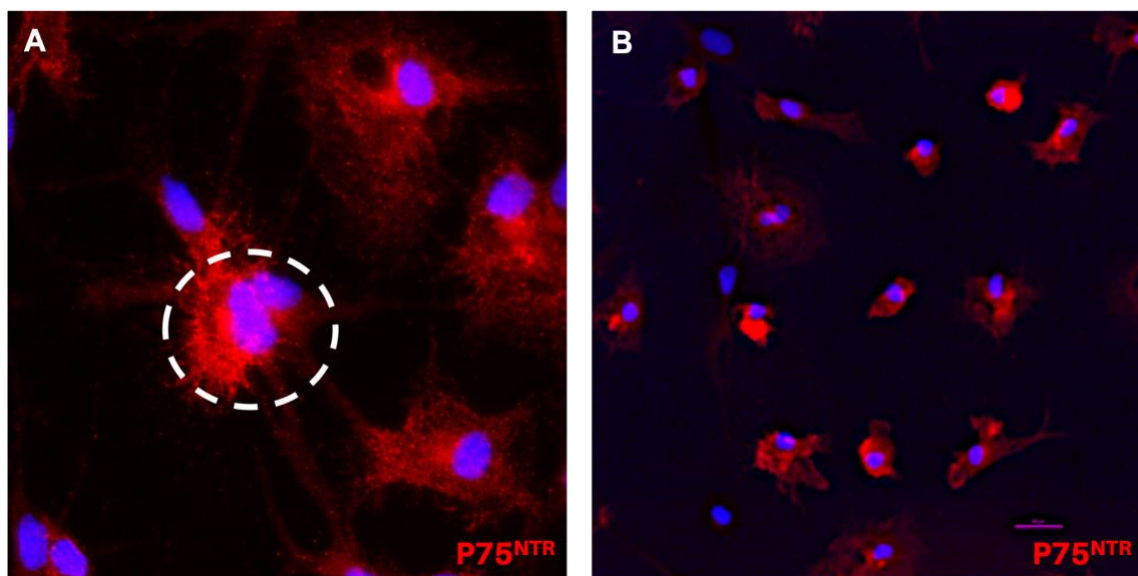


Figura 24. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de p75NTR após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocâmpais. Imagem representativa de marcação para p75NTR (vermelho) e DAPI (azul) em cultura primária de neurônios hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo aCSF (A) e NMDA 100 μ M (B). Aumento de 40x (A) e 20x (B).

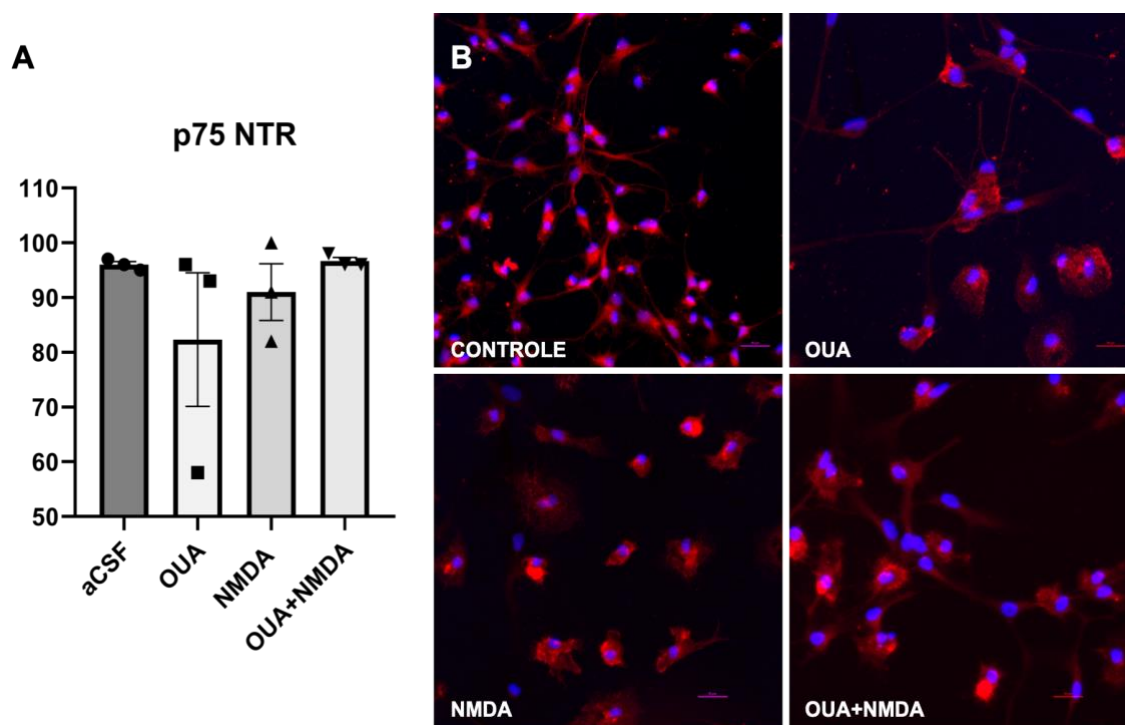


Figura 25. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de p75NTR após insulto excitotóxico moderado em cultura de neurônios hipocâmpais. (A) Gráfico representativo das médias de todos os grupos referente as quantificações do receptor por imunofluorescência (B) Imagens de imunofluorescência para marcação de p75NTR (verde e vermelho) e DAPI (azul) em cultura primária de neurônios hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo aCSF (controle), OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA+NMDA. Aumento de 20x (n=3).

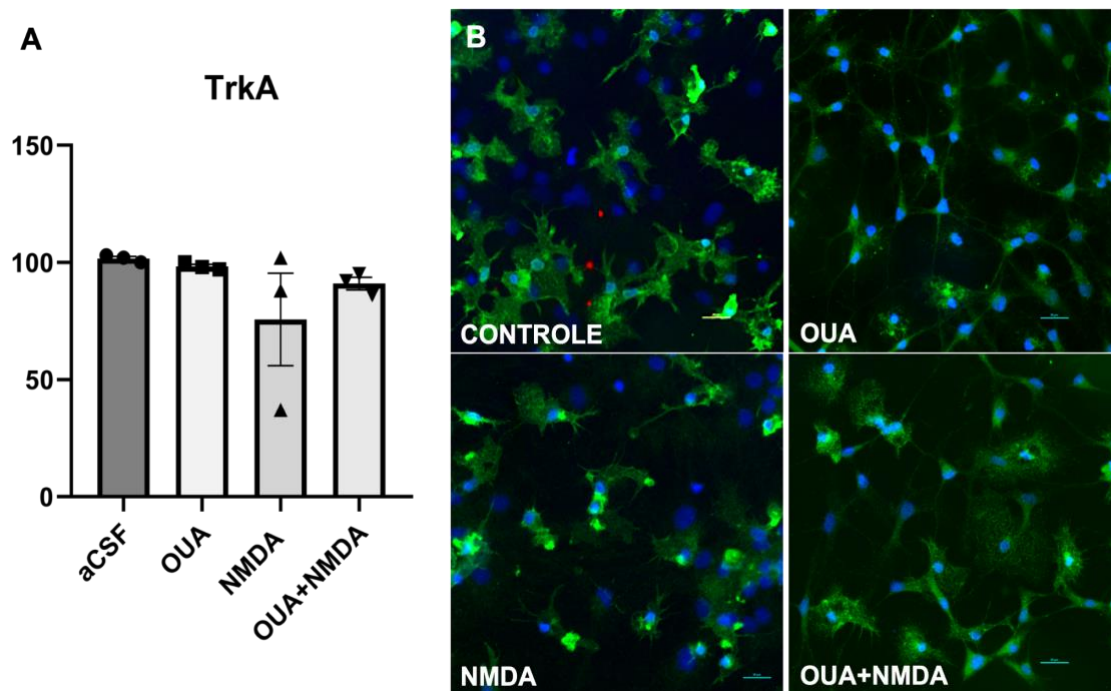


Figura 26. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de TrkA após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocâmpais. (A) Gráfico representativo das médias de todos os grupos referente as quantificações do receptor por imunofluorescência (B) Imagens de imunofluorescência para marcação de TrkA (verde) e DAPI (azul) em cultura primária de neurônios hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo aCSF (controle), OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA+NMDA. Aumento de 20x (n=3).

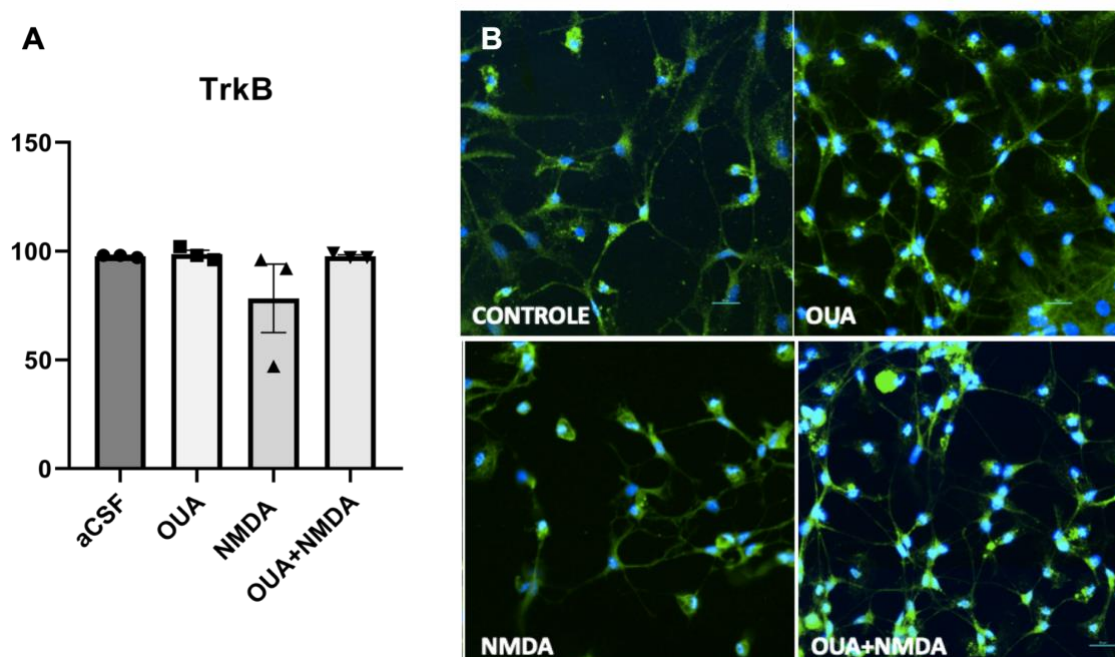


Figura 27. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de TrkB após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocâmpais. (A) Gráfico representativo das médias de todos os grupos referente as quantificações do receptor por imunofluorescência (B) Imagens de imunofluorescência para marcação de TrkB (verde) e DAPI (azul) em cultura primária de neurônios hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo aCSF (controle), OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA+NMDA. Aumento de 20x (n=3).

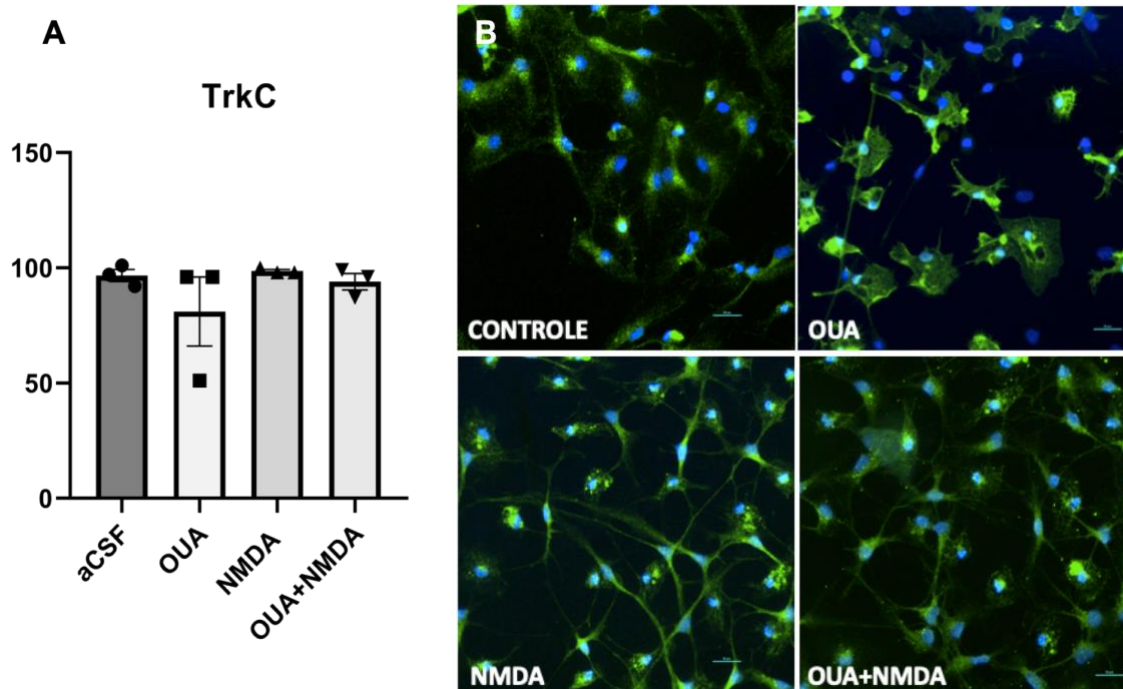


Figura 28. Fotomicrografia representativa do ensaio de imunofluorescência para marcação de TrkC após insulto excitotóxico em cultura de neurônios hipocâmpais. (A) Gráfico representativo das médias de todos os grupos referente as quantificações do receptor por imunofluorescência (B) Imagens de imunofluorescência para marcação de TrkC (verde) e DAPI (azul) em cultura primária de neurônios hipocâmpais após 21 dias de cultivo no grupo aCSF (controle), OUA 10 nM, NMDA 100 μ M e OUA+NMDA. Aumento de 20x (n=3).

5.5.5 Efeitos do tratamento com OUA na expressão de RNAm dos genes *Bdnf*, *Ngf*, *Il-1 β* e *Tnf- α* após insulto com NMDA 100 μ M em cultura primária de neurônios hipocâmpais maduros

Para verificar a expressão dos genes *Bdnf* e *Ngf* foram realizados ensaios de RT-PCR nos diferentes grupos tratados. Os resultados obtidos sugerem ausência de modulação da OUA sozinha e/ou após insulto excitotóxico com 100 μ M de NMDA para esses genes, após 6 horas dos tratamentos

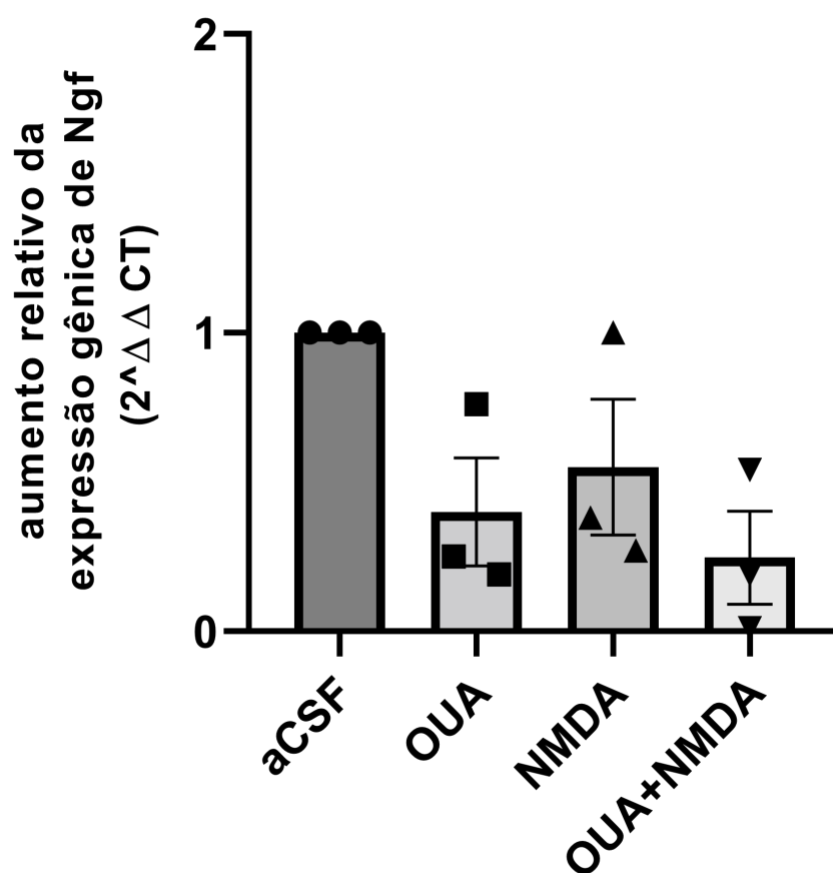


Figura 29. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Ngf após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de RT-PCR de RNAm para o gene Ngf. Os dados foram normalizados pela intensidade das bandas relativas à expressão de RNAm de controle endógeno HPRT. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média para $n=3$ em 3 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA não-paramétrico de uma via, seguida de pós-teste Kruskal-Wallis. $p<0,05^*$

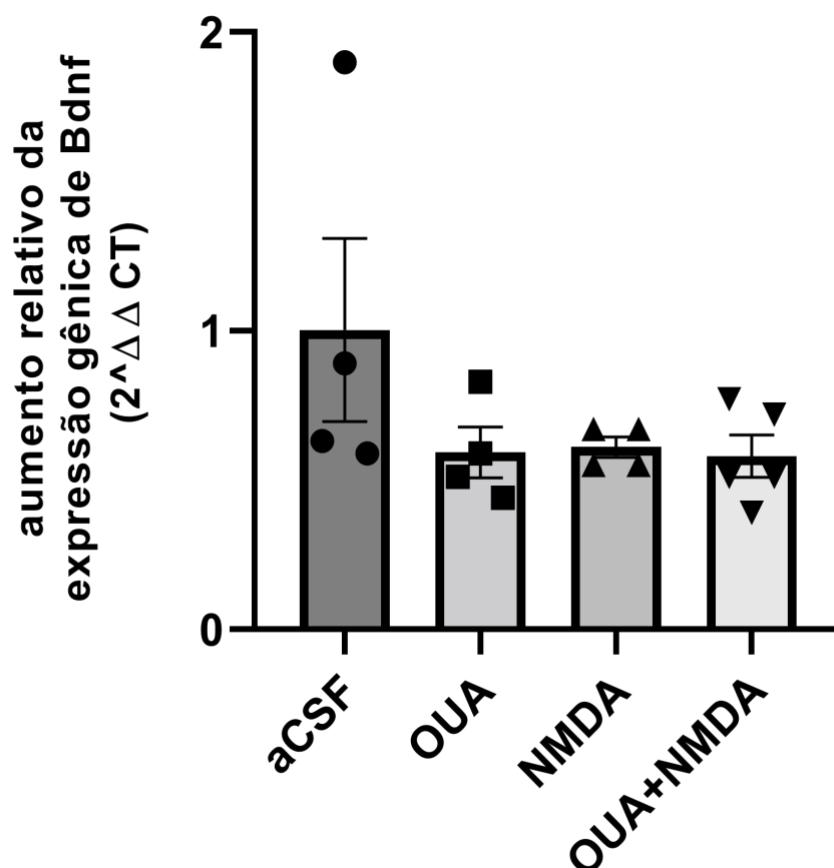


Figura 30. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene *Bdnf* após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de RT-PCR de RNAm para o gene *Bdnf*. Os dados foram normalizados pela intensidade das bandas relativas à expressão de RNAm de controle endógeno HPRT. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média para $n=4$ em 3 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA não-paramétrico de uma via, seguida de pós-teste Kruskal-Wallis. $p<0,05^*$

Devido ao seu papel de defesa imunológica no SNC, a micróglia é capaz de responder rapidamente às mudanças no ambiente local, o que a permite secretar importantes mediadores de neuroinflamação, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-23, e IL-18 em resposta a sinais moleculares associados a danos (PRINZ; JUNG; PRILLER, 2019). Após mudança fenotípica da micróglia nos grupos tratados observado nas figuras 22 e 23, verificamos a expressão dos genes Il-1 β e Tnf- α por ensaios de qPCR nos diferentes grupos tratados. Os resultados obtidos sugerem ausência de modulação da OUA sozinha e/ou após insulto excitotóxico com 100 μ M de NMDA para esses genes.

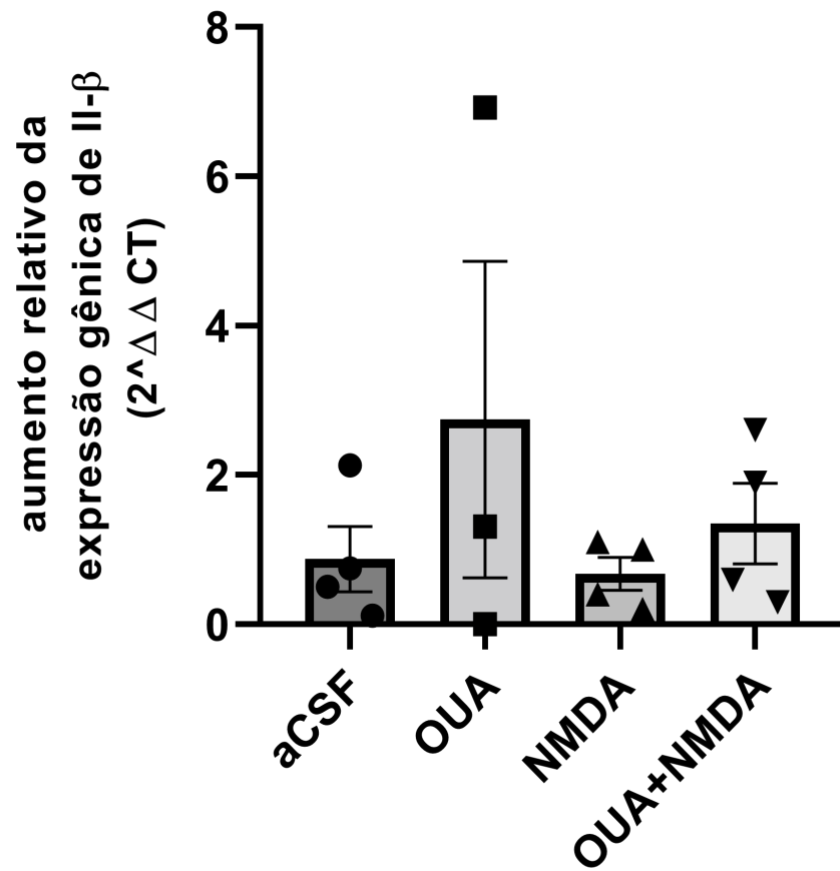


Figura 31. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Il- β após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de RT-PCR de RNAm para o gene Il- β . Os dados foram normalizados pela intensidade das bandas relativas à expressão de RNAm de controle endógeno Gapdh. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média para $n=4$ em 3 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA não-paramétrico de uma via, seguida de pós-teste Kruskal-Wallis. $p<0,05^*$

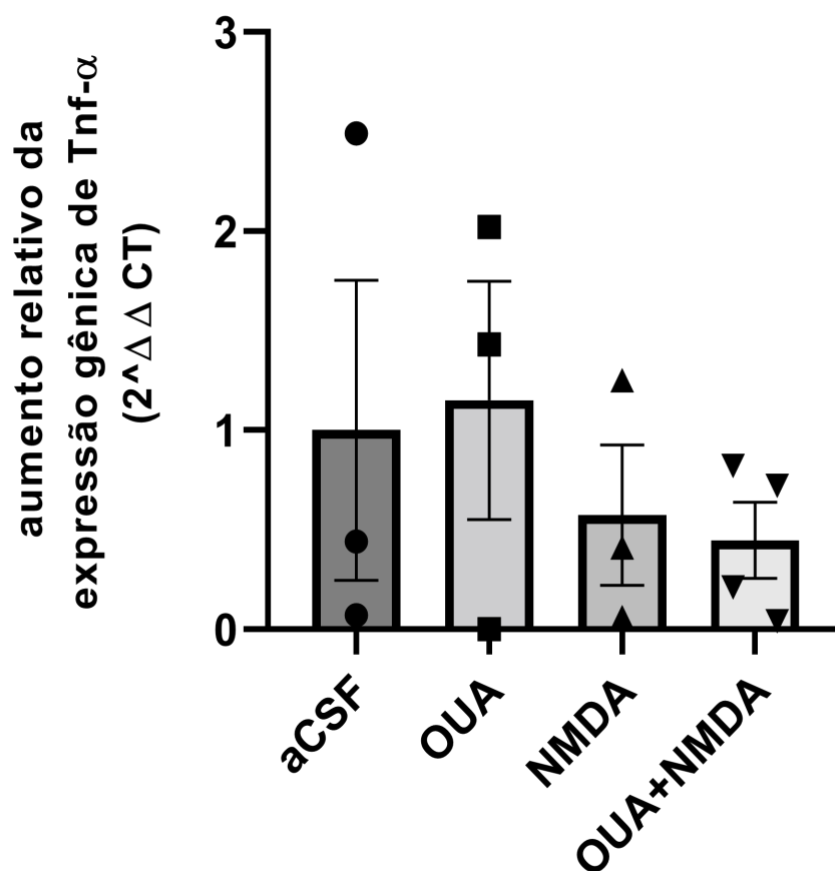


Figura 32. Efeitos do tratamento com OUA na expressão do RNAm do gene Tnf- α após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de RT-PCR de RNAm para o gene Tnf- α . Os dados foram normalizados pela intensidade das bandas relativas à expressão de RNAm de controle endógeno Gapdh. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média para $n=4$ em 3 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA não-paramétrico de uma via, seguida de pós-teste Kruskal-Wallis. $p<0,05^*$

5.5.6 Efeitos do tratamento com OUA na modulação dos níveis de neurotrofinas após insulto com NMDA 100 μ M em cultura primária de neurônios hipocampais maduros

Para quantificar os níveis de expressão de neurotrofinas foram realizados ensaios de ELISA para BDNF, NGF, NT-3 e NT-4 por meio da coleta do meio de cultura dos diferentes grupos após 6 horas de tratamento. Os resultados obtidos sugerem ausência de modulação da OUA sozinha e/ou após insulto excitotóxico com 100 nM de NMDA para NGF e NT-4. No entanto, é possível observar um aumento nos níveis de expressão de BDNF no grupo OUA (16,4%) em

comparação com o grupo NMDA 100 nM (6,2%) (figura 35), assim como um aumento nos níveis de expressão de NT-3 do grupo OUA (59,5%) quando comparado ao grupo controle (31%) e ao grupo NMDA 100 μ M (22,5%) (figura 36).

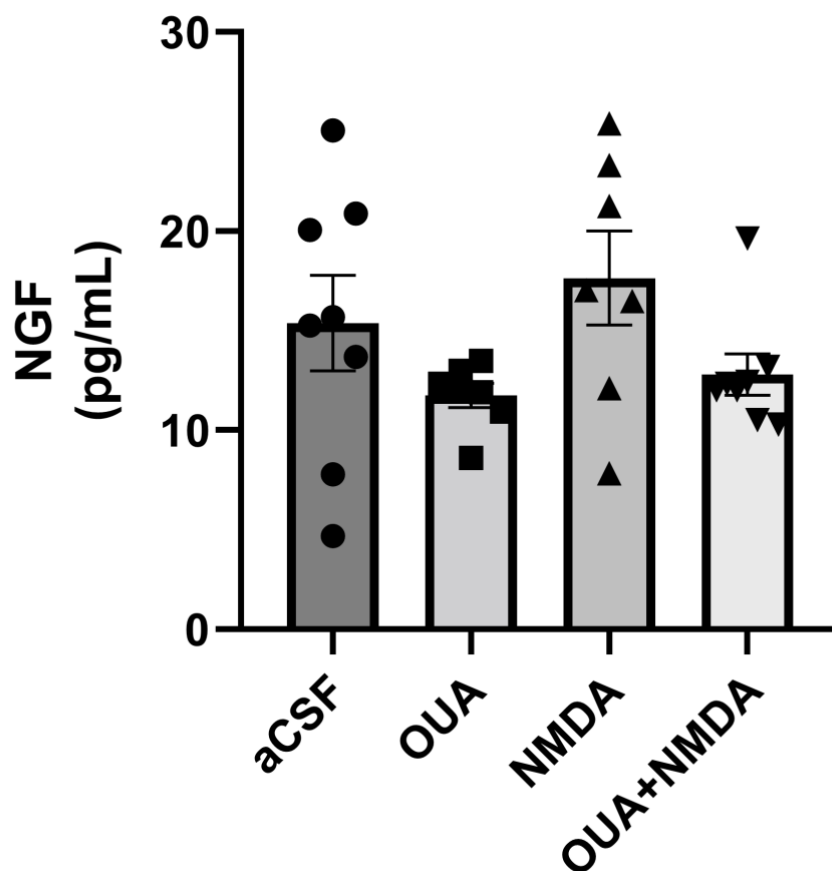


Figura 33. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do NGF após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg de NGF por mL de proteínas totais das amostras e mostra mostra a média \pm erro padrão da média para $n=7-8$ em 4 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. $p<0,05^*$.

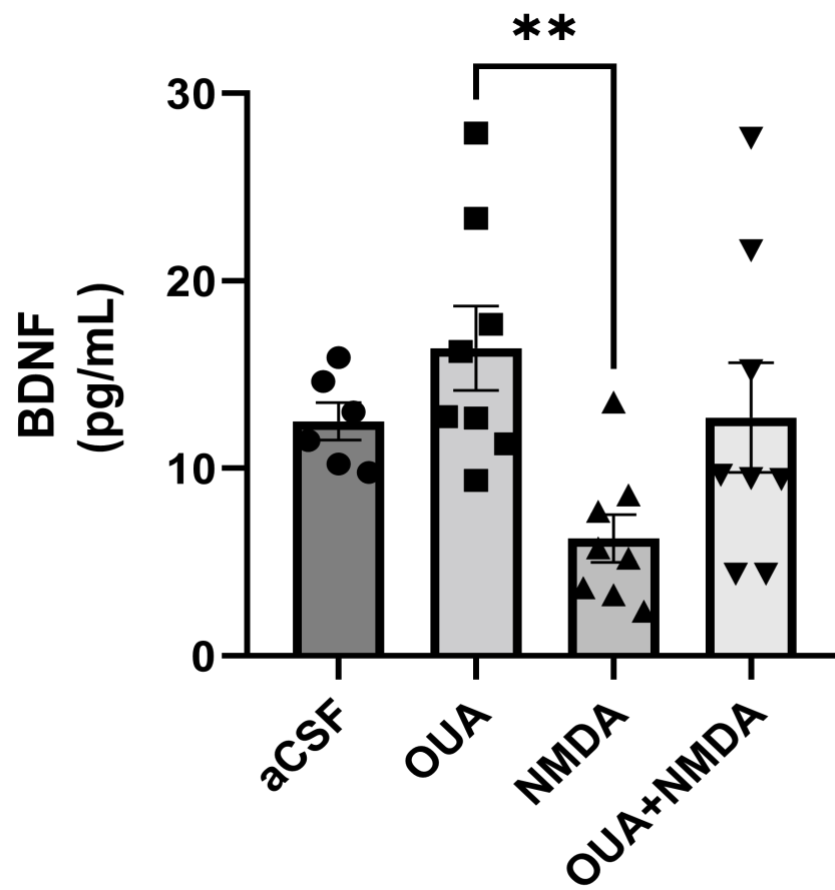


Figura 34. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do BDNF após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg de BDNF por mL de proteínas totais das amostras e mostram a média \pm erro padrão da média para $n=6-8$ em 4 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. $p<0,05^*$.

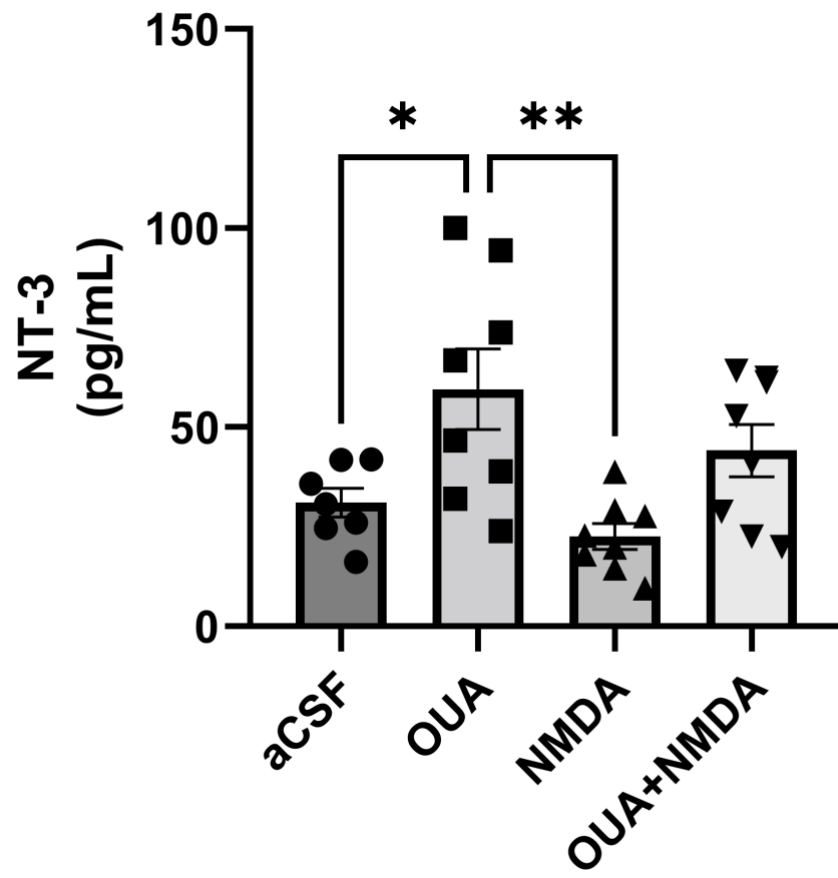


Figura 35. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do NT-3 após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg de NT-3 por mL de proteínas totais das amostras e mostram a média \pm erro padrão da média para $n=7-8$ em 4 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. $p<0,05^*$.

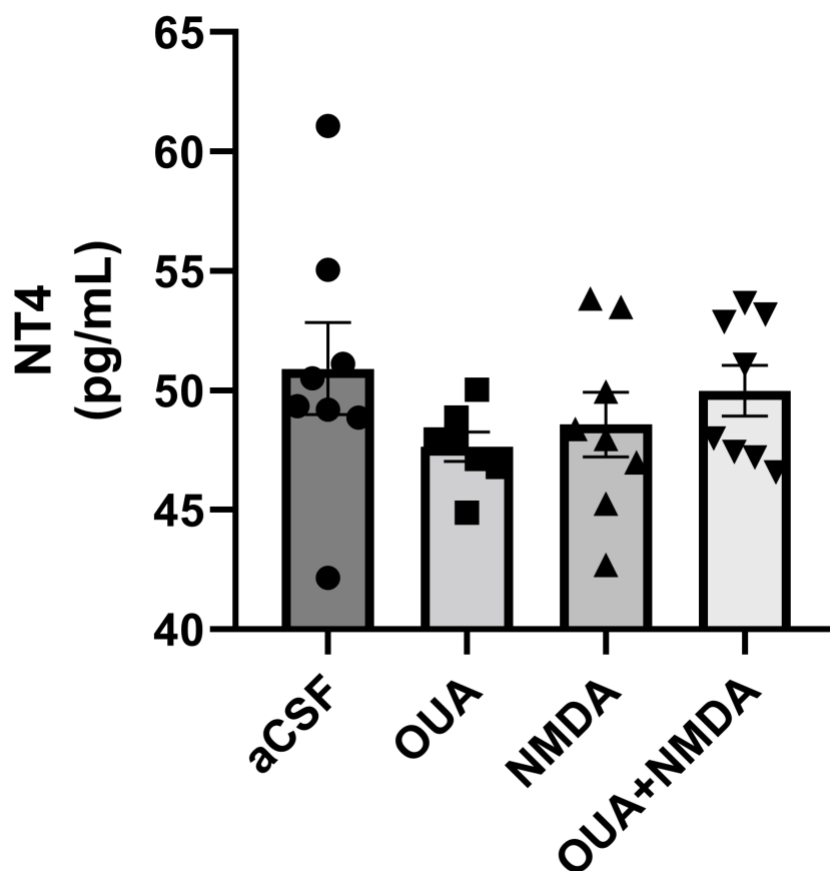


Figura 36. Efeitos do tratamento com OUA nos níveis de expressão do NT-4 após insulto com NMDA em cultura primária de hipocampo de ratos. Gráfico representativo da média de todos os grupos após o ensaio de ELISA. Os resultados foram expressos em pg de NT-4 por mL de proteínas totais das amostras e mostram a média \pm erro padrão da média para $n=7-8$ em 4 experimentos individuais. Teste de Variância ANOVA de uma via, seguida de pós-teste Tukey. $p<0,05^*$.

6 DISCUSSÃO

OUA como agente anti-apoptótico frente a um insulto excitotóxico moderado

O hipocampo é uma estrutura bem caracterizada que apresenta funções cerebrais críticas nos processos de aprendizagem, formação e consolidação de memória, assim como na navegação espacial. Por possuir uma estrutura que permite fácil localização e isolamento de populações celulares, além de deter uma organização celular bem definida, essa região se tornou relevante para estudos relacionados a neuroplasticidade e doenças neurodegenerativas, assim como também para investigação de sensibilidade a neurotoxicidade em diferentes modelos experimentais (BARTSCH; WULFF, 2015).

Apesar de ser notório o fato de que a ativação dos receptores glutamatérgicos de NMDA regula respostas intracelulares relacionadas a sobrevivência neuronal, a sua hiperativação pode causar excitotoxicidade e morte celular, contribuindo como potencial mecanismo envolvido na neurodegeneração (WANG; REDDY, 2017).

Os neurônios são células pós-mitóticas quiescentes que assim devem permanecer para manutenção da homeostasia. A literatura mostra que, quando uma cultura de neurônios corticais recebe tratamento por um período de 5 minutos com NMDA, ocorre uma tentativa de reentrada aberrante de neurônios no ciclo celular, promovendo assim um acúmulo de ciclinas, em especial a ciclina D1, que aumenta no final da fase G2 e início da mitose, tanto no núcleo dos neurônios quanto nas mitocôndrias, levando a morte celular por apoptose (MAESTRE et al., 2008). Estudos mostram que a ciclina D1 se acumula em regiões degeneradas do cérebro, como na doença de Alzheimer (PETERS, 2006).

Seguindo esse mesmo ponto, um estudo realizado em linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) sugeriu que o tratamento de 7 dias com 50 nM de OUA pode atuar como um agente anti-mitótico, sendo capaz de induzir um estágio similar a quiescência em células de neuroblastoma maligno (HIYOSHI et al., 2012). Num segundo momento, a proliferação tumoral reduziu drasticamente em 45% quando os tumores foram implantados em camundongos imunossuprimidos tratados com OUA, nesse mesmo estudo. Os resultados desse trabalho mostraram que a OUA induziu inicialmente a parada do ciclo celular entre a fase S e G2-M (20%-40%), levando as células tumorais a posteriormente entrar na fase G0 sem aumentar a taxa de morte celular por apoptose. Esses achados revelam assim um novo papel para o complexo OUA-NKA como supressor tumoral e indutor de quiescência em células de neuroblastoma maligno. Frente a essas evidências, ensaios foram realizados para verificar se a OUA era capaz de interferir nos níveis de expressão da Ciclina D1. No entanto, não observamos nenhuma modulação dessa expressão em nosso modelo (Figura 11).

Ademais, trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa observaram aumento de BDNF e de Bcl-2 no hipocampo de ratos após tratamento com OUA (KAWAMOTO, E.M. et al., 2012; ORELLANA et al., 2018). De acordo com o estudo

de Boutahar e colaboradores, o tratamento com 2 mM de NMDA por 6 h levou a morte neuronal por excitotoxicidade em cultura primária embrionária de neurônios corticais de camundongo, no entanto houve redução nas taxas de morte quando essas culturas foram tratadas conjuntamente com 100 nM de BDNF devido ao aumento de fosforilação da AKT (BOUTAHAR et al., 2010). Um outro estudo realizado em cultura de célula embrionária de retina de galinha (DCRNs) mostrou que quando essas células foram tratadas com BDNF (2 ng/mL) observou-se parada do ciclo celular entre G2/M (OVEJERO-BENITO; FRADE, 2013).

Assim, após extensas referências na literatura e resultados prévios no nosso grupo de pesquisa que demonstraram efeito protetor do pós-tratamento com OUA 10 nM frente a um insulto moderado com NMDA 100 μ M (resultados não publicados), buscamos revalidar e investigar esse mecanismo de ação *in vivo*. A partir disso, levantamos as hipóteses de que esse mecanismo poderia ser devido a modulação de alguma neurotrofina pela OUA, em particular o BDNF, visto que um trabalho anterior do nosso laboratório já havia demonstrado aumento de BDNF hipocampal após 10 horas da infusão de OUA 10 nM (ORELLANA et al., 2018). Outra possibilidade a investigar é a de que a OUA pudesse modular proteínas do ciclo celular, pois de acordo com a literatura, esperava-se que a hiperestimulação dos receptores NMDA promovesse o aumento de ciclinas relacionada ao ciclo, levando a morte dos neurônios hipocampais em CA1. Já o tratamento com a OUA poderia induzir uma diminuição ou inibição da atividade dessas ciclinas por meio do aumento de BDNF, promovendo aumento da expressão de Bcl-xL nos neurônios e evitando assim o processo de morte por apoptose. No entanto, não observamos nenhuma modulação da expressão de Bcl-xL em nosso modelo (Figura 12).

Em relação a apoptose, se tratando de eventos neurodegenerativos, a espectrina é uma família de proteínas associadas à manutenção de membrana/citoesqueleto e o seu metabolismo tem uma relevância muito interessante nesse contexto. Em face a condições de dano, estresse ou morte celular, ocorre um aumento do catabolismo das proteínas de membrana/citoesqueleto e, portanto, elevação da formação dos seus subprodutos (ZHANG et al., 2013). Em particular, o processo de proteólise da espectrina pode estar associado a múltiplas condições de estresse, visto que ela

se apresenta como um substrato para a calpaína e caspase-3, proteases essenciais na detecção do processo de morte celular (WILLIAMS et al., 2003).

O resultado advindo da quebra e formação dos fragmentos dos seus subprodutos é um indicativo molecular prático para observação e diferenciação do tipo de morte celular: necrose, pela observação de fragmentos clivados por calpaína ou apoptose, pela clivagem por caspase-3. Fragmentos estes específicos, distintos e facilmente observáveis por meio de diferentes pesos moleculares (YAN; JEROMIN; JEROMIN, 2012).

Além disso, a intensa estimulação de receptores de NMDA leva a formação de subprodutos advindos da quebra da espectrina (SEUBERT et al., 1988; VANDERKLISH; BAHR, 2000) e quando se trata da intensidade com que esses receptores são estimulados, os níveis de formação dos subprodutos e neurodegeneração se correlaciona com a quantidade de NMDA administrada (SIMAN; NOSZEK; KEGERISE, 1989).

No entanto, conforme mostrado na figura 13, no modelo *in vivo*, não houve aumento estatisticamente significativo nas taxas de apoptose pela espectrina, nem aumento nas taxas de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-xL (figura 12) e nem aumento da expressão de proteínas do ciclo celular como a Ciclina D1 (figura 13) após tratamento com NMDA. Ademais, em 6 h não ocorre aumento da ativação de CREB (figura 14), indicando provável ausência de modulação de BDNF nesse modelo.

Em relação ao modelo utilizado para induzir a excitotoxicidade, um estudo publicado por Rambousek et al., 2016, que fez a administração intrahipocampal de NMDA em ratos, mostrou que a lesão se restringe a região próxima ao sítio de injeção. Isso talvez possa justificar a grande variabilidade de resposta observada e a ausência de diferença significativa. Por outro lado, para verificar alterações cognitivas nos animais submetidos a infusão de NMDA, aumento da neuroinflamação e alterações na expressão de receptores glutamatérgicos, foi necessário a injeção intrahipocampal de 25 e 50 mM de NMDA (RAMBOUSEK et al., 2016), ou seja, concentrações muito acima da utilizada no presente projeto. Ademais, o intervalo de tempo para se observar alterações moleculares também foi inadequado, se nos basearmos no estudo acima citado.

De fato, estudo publicado por Fachim e colaboradores, sugere que a injeção intrahipocampal de 80 mM de NMDA levou ao déficit cognitivo e a

redução na população neuronal após 1 ou 2 semanas de tratamento, embora tenham observado redução nos neurônios positivos para GluR2 após 24 horas na região CA1 do hipocampo (FACHIM et al., 2016). Isso nos leva a acreditar que o efeito excitotóxico em nosso modelo deva ter ocorrido nas imediações da injeção, sendo necessário a padronização de uma nova estratégia, como a inserção de múltiplas cânulas para conseguir um efeito mais pronunciado ou ainda a mudança no local de injeção, como no ventrículo por exemplo, garantindo assim um efeito mais homogêneo. Outro fator importante pode ter sido o tempo analisado, insuficiente para verificarmos os efeitos desejados *in vivo*. O fato de que o efeito anti-apoptótico da OUA na presença de um estímulo excitotóxico ter sido inicialmente observado em culturas celulares majoritariamente neuronais *in vitro*, ou seja, em um sistema altamente isolado com maior controle de variáveis e com maior porcentagem de células neuronais, nos leva a acreditar que a concentração utilizada de NMDA e os tempos de observação, nos sistemas vivos que contam com a interferência de um sistema biológico complexo, revela a capacidade compensatória do mesmo, e portanto exige ajustes de modelo para que os mesmos fenômenos possam ser reproduzíveis.

A análise de tais dados não indica necessariamente que as hipóteses propostas no referido projeto não sejam válidas, mas sim que por ora o modelo *in vivo* utilizado ainda não esteja completamente adequado a simular os dados descritos na literatura na mesma condição excitotóxica *in vitro* mostrada em resultados prévios pelo nosso grupo e portanto, careça de maior tempo de padronização para adequação no futuro.

Ademais, ao deixarmos de lado uma visão mais neurocêntrica, podemos refletir sobre o fato de que processos moleculares realizados por outras células residentes no sistema nervoso, como as células da glia, poderiam exercer algum tipo de mecanismo compensatório frente a essa condição moderada de insulto excitotóxico. No caso específico da hiperestimulação de receptores glutamatérgicos, a recaptação do glutamato pelos astrócitos é algo crucial na ação protetora contra excitotoxicidade induzida, numa tentativa de conter e proteger as células neurais (SATTLER; TYMIANSKI, 2001).

Portanto, um reajuste de modelo se fez necessário para que a proposta pudesse ser novamente testada. Após análise, e frente a realidade pandêmica

de um tempo limitado para a conclusão do mestrado, optamos por um modelo *in vitro* com cultura primária pós-natal de células neuronais do hipocampo de ratos, visto que já haviam resultados prévios do nosso grupo que sugerem ação anti-apoptótica da OUA nesse contexto. Porém, com o propósito de explorar os mecanismos da interação dos neurônios com células da glia, optamos por uma cultura pós-natal predominantemente neuronal.

A literatura confirma a importância que o modelo *in vitro* de culturas hipocâmpais tem nos estudos acerca da excitotoxicidade glutamatérgica há mais de 20 anos e essa nova perspectiva trazida por essa mudança de modelo torna possível cogitar a futura relevância e transposição dos resultados para um sistema nervoso em desenvolvimento, maduro ou em condições de insulto.

Sob uma perspectiva celular, os neurônios piramidais correspondem a maior parte da população neuronal encontrada no hipocampo, algumas variedades de interneurônios e células gliais também, porém em menor proporção quando comparado com outras regiões cerebrais (KAECH; BANKER, 2006). Na caracterização e padronização das culturas primárias de neurônios hipocâmpais obtivemos o resultado esperado como demonstrado na porcentagem de células neuronais, astrócitos e micróglia nas culturas obtidas (figuras 15, 16, 17 e 18).

Após a caracterização, buscamos avaliar se a OUA exerce ação protetora frente a um estímulo excitotóxico, como anteriormente observado em nosso grupo (dados não publicados). Para isso, culturas primárias com neurônios hipocâmpais já maduros foram expostas por 5 min ao NMDA 100 μ M e a detecção de células apoptóticas foi analisada pelo perfil morfológico dos núcleos apoptóticos fragmentados nas células TUNEL-positivas. Os resultados obtidos pela quantificação dos ensaios de TUNEL denotam que não foi possível observar um efeito protetor da OUA frente a morte celular por apoptose, quando adicionada juntamente ao NMDA 100 μ M por 5 min, mesmo as células permanecendo expostas a OUA no meio de manutenção por 6 h posteriores (figuras 19,20 e 21).

Fato curioso é que a concentração de NMDA 100 μ M quando adicionada por 5 minutos em culturas embrionárias primárias de neurônios corticais leva a aproximadamente 20% dos neurônios à morte, sendo considerado um estímulo tóxico moderado (D'Orsi et al., 2012). Taxa semelhante foi observada em cultura

primária embrionária de hipocampo, em estudo realizado pela Dra. Ana Maria Orellana durante estágio sanduíche no Karolinska Institute (dados não publicados). No entanto, ao contrário do que esperávamos, a cultura primária de neurônios pós natais na qual coexistem predominantemente neurônios e astrócitos, embora se observe uma pequena parcela de micróglia, as taxas de apoptose ficaram em torno de 40% (figura 19), o que não mais caracteriza esse estímulo excitotóxico como moderado. Em concordância com nossos achados, um estudo publicado por Hewett e colaboradores, mostrou que em culturas primárias mistas de astrócitos e neurônios corticais, a exposição ao NMDA 100 μ M por 5 minutos levou a morte de 35% dos neurônios por apoptose após 4 horas, existindo um aumento importante na liberação de prostaglandinas após 90 minutos do estímulo (HEWETT et al., 2000)

Entretanto, para uma análise futura mais robusta de tal fenômeno, compreendendo o papel dos astrócitos nessa maior taxa de morte neuronal, e a ausência de proteção pela OUA frente a esse estímulo mais intenso. Também reiteramos o fato de que um número amostral maior se faz necessário, principalmente para avaliar se a tendência observada no gráfico se concretiza em um maior número de experimentos individuais, visto que existem várias condições patológicas no qual é observado altas taxas de apoptose e que poderiam se beneficiar enormemente de inibidores artificiais de apoptose.

Mudança fenotípica microglial é revertida pela OUA após insulto excitotóxico

As micróglia são células imunes residentes no SNC, tidas como a primeira linha de defesa frente a qualquer tipo de dano neuronal e respondendo de imediato por meio da sua ativação, fagocitando células danificadas por contato direto ou liberando variadas substâncias possivelmente tóxicas, como óxido nítrico (THAMEEM DHEEN; KAUR; LING, 2007). Em condições saudáveis com ausência de sinais patológicos no ambiente, as micróglia se encontram em estado de quiescência ou repouso. Porém, apesar dessa denominação, as células estão em constante movimento a vigiar o ambiente através de seus longos prolongamentos e por isso são caracterizadas como micróglia ramificadas. Essas células possuem corpos celulares pequenos e redondos com

pouco citoplasma e intensos processos de ramificação (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005).

A partir do momento em que essas micróglia quiescentes detectam quaisquer tipos de sinais ou moléculas potencialmente perigosas, ou até mesmo uma falha de comunicação normal de neurónios e/ou outras células gliais, elas sofrem uma mudança tanto morfológica quanto funcional para um outro estado ativo de formato ameboide (DAS SARMA et al., 2013). Fenotipicamente, as células nesse estado mantêm o formato esférico do corpo celular, entretanto com pseudopodia curta e espessa para assim poderem avançar rapidamente para a zona em que são recrutadas, liberar substâncias tóxicas para matar o patógeno, e realizar fagocitose (DIHNÉ et al., 2001). Em minutos após lesões agudas, processos microgliais convergem para o local dos danos do SNC, e após horas e/ou dias, às micróglia reativas retraem os seus processos, formando novas protuberâncias móveis, e transformam-se assim nesse outro estado de formato ameboide (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). As células da micróglia são capazes de transitar por diferentes estados até atingir sua maturação, assim como para o bom desempenho de sua função. Nessa sua primeira fase do estado ameboide, ela compartilha semelhanças imunológicas, histoquímicas e morfológicas com os macrófagos, apresentando formato arredondado com processos curtos e amplos (CUADROS; NAVASCUÉS, 1998). Por isso, essas células são muitas vezes denominadas de macrófagos do cérebro.

Um ponto relevante observado foi a diferença morfológica que o grupo OUA+NMDA apresenta em relação ao grupo NMDA (figura 23) sugerindo uma possível reversão desse fenótipo de M1/M2 para M0 no grupo tratado com OUA após o insulto excitotóxico, ambos os resultados acerca da mudança fenotípica da micróglia com OUA e NMDA (figura 22) até então inéditos na literatura.

É bem descrito na literatura que as células da microglia expressam tanto os receptores metabotrópicos glutamatérgicos quanto os receptores ionotrópicos como AMPA e NMDA. Assim, a resposta microglial à exposição ao agonista do receptor NMDA (10 μ M por 24 hr) induz sua proliferação e alteração morfológica favorecendo sua transformação para o estado ativado com morfologia hipertrófica ou ameboide (RAGHUNATHA et al., 2020). Esses achados são condizentes com a observação prévia, da participação da ativação de astrócitos

e células da glia já em várias doenças neurodegenerativas. Entretanto, sugere-se que a ativação dos astrócitos facilite o *clearance* de proteínas envolvidas em processos patológicos, inibindo ou amenizando a condição (PENG; TROJANOWSKI; LEE, 2020).

Alguns estudos realizados por Knut Biber e colegas relataram um significativo papel neuroprotetor exercido pela micróglia frente a uma excitotoxicidade induzida por NMDA em culturas organotípicas hipocampais (VINET et al., 2012), no entanto, quando comparado à região CA3 ou ao giro dentado (GD), os neurônios da região CA1 se mostraram mais susceptíveis à toxicidade induzida por NMDA, apesar de tal mecanismo não ser bem elucidado. Vinet descreve que existe uma maior densidade de micróglia morfológicamente ativada em CA1, fator este que pode ser sugerido como um possível motivo para essa diferença de vulnerabilidade entre as regiões. Assim, é possível que o tratamento com NMDA em nosso modelo, aumente a ativação da micróglia e a liberação de fatores pró-inflamatórios, que aumentam a vulnerabilidade desses neurônios à morte por apoptose.

Ademais, já foi descrito em estudos realizados em nosso grupo a ação anti-inflamatória da OUA (Kinoshita et al., 2014, Kinoshita et al., 2017), o que pode justificar o fenômeno da reversão fenotípica observada na micróglia tratada com NMDA+OUA (Figura 23), que mostra alteração na morfologia celular da micróglia no grupo exposto ao insulto excitotóxico por NMDA, quando comparado ao controle. Observamos a saída da micróglia de um fenótipo ramificado clássico de repouso (M0) para um estado ativo, onde ocorre a retração de suas ramificações e adoção de um formato ameboide com soma aumentada de aspecto “inchado”, que pode ser M1 (pró-inflamatória e citotóxica) ou M2 (anti-inflamatória e neuroprotetora). Porém tal efeito, parece não ser capaz de impedir a morte por apoptose causada por hiperativação direta dos receptores NMDA.

Tais indícios reiteram a importância da identificação dos estados fenotípicos da micróglia e outras células gliais em condições normais e patológicas, visto que evidências recentes demonstram perfis neuroprotetores e benéficos desses diferentes estados. Segundo DAS SARMA et al., 2013, uma das grandes questões ainda não resolvidas sobre a micróglia é elucidar se a inibição destas respostas será de fato uma tentativa segura e eficaz de reverter

ou retardar o curso de uma doença. Portanto, a atenuação precoce dessas respostas microgliais de modo que estas já não sejam mais deletérias seria uma abordagem terapêutica ideal, ao invés da sua eliminação completa. Por consequência, o fenômeno de mudança fenotípica observado na micróglia (Figuras 22 e 23) após insulto excitotóxico é algo pertinente a ser explorado no futuro, buscando assim a identificação de qual perfil ativado a micróglia observada antes e após o insulto se encontra.

OUA como modulador dos níveis de NT-3 em neurônios hipocampais maduros

Trabalhos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa, observaram aumento da expressão de BDNF pela OUA tanto em hipocampo de ratos como em culturas cerebelares (DE SÁ LIMA et al., 2013; KAWAMOTO, E. M. et al., 2012), entretanto até então não existem dados extensos na literatura acerca da modulação da expressão de outras neurotrofinas, como a NT-3 e NT-4.

Dentre as neurotrofinas, o BDNF e a NT-3 desempenham papéis-chave nos mecanismos neurobiológicos relacionados com a aprendizagem e a memória. No SNC de mamíferos adultos, o hipocampo é um local de proeminente expressão de NT-3 e do seu receptor, TrkC (FRIEDMAN; ERNFORS; PERSSON, 1991; MAISONPIERRE et al., 1990) Ademais, também foi demonstrado que a expressão do gene NT-3 no cérebro adulto está altamente confinada ao GD (LAUTERBORN; ISACKSON; GALL, 1994; ZHANG et al., 2007). A sobreposição entre os efeitos de BDNF e NT-3 já foi observada em alguns estudos em culturas de tecidos com diferentes populações neuronais, refletindo assim uma possível colocalização de alta afinidade não apenas dos receptores dessas neurotrofinas (trkB e trkC, respectivamente) como também do fato de que o NT-3 pode interferir na ação do receptor de BDNF (DISTEFANO et al., 1992; MAISONPIERRE et al., 1990).

Ao contrário de outros membros da família das neurotrofinas, a expressão da NT-3 no SNC parece atingir o seu auge no momento do desenvolvimento fetal, durante o qual a NT-3 desempenha um forte papel na sobrevivência neuronal, e na diferenciação (ERNFORS et al., 1990; GHOSH; GREENBERG, 1995; MAISONPIERRE et al., 1990).

A regulação trófica que a NT-3 exerce nas fases iniciais de desenvolvimento levou à ideia de que esta neurotrofina também estaria implicada na neurogênese de adultos. Embora a evidência continue a ser escassa, existem alguns estudos que indicam o papel da NT-3 na proliferação neuronal no hipocampo (SHIMAZU et al., 2006), bem como a diferenciação dos precursores neurais na medula espinal (GUA et al., 2009). Em 2006, Shimazu e colaboradores observaram o modo como a eliminação do gene NT-3 poderia afetar a proliferação ou sobrevivência das células precursoras neuronais (NPCs) no giro denteado de camundongos adultos. Tais resultados sugerem que, para além da sobrevivência celular, essa neurotrofina é capaz de afetar a maturação, ou a determinação do destino dessas células (tornar-se um neurônio ou um astrócito).

Visto que a literatura sugere que a NT-3 interfere na neurogênese (GHOSH; GREENBERG, 1995; VICARIO-ABEJÓN et al., 1995), os dados obtidos acerca da descoberta da OUA como um modulador dessa neurotrofina (figura 35) é capaz de abrir um enorme leque de novas possibilidades de hipóteses sobre quais os possíveis efeitos que essa modulação provoca no hipocampo adulto. A atividade neuronal como a indução de LTP pode modular a expressão de RNAm de NT-3 e de seu receptor TrkC no hipocampo (BRAMHAM et al., 1996; PATTERSON et al., 1992), o que sugere que a OUA poderia também desempenhar um papel significativo na promoção de plasticidade sináptica juntamente com o BDNF em neurônios hipocámpais maduros. Contudo, evidências diretas sobre o efeito conjunto com outras neurotrofinas como BDNF e o papel do NT-3 na plasticidade sináptica de adultos *in vivo* ainda são escassas.

Assim, é preciso aprofundar o estudo acerca do mecanismo pelo qual a OUA é capaz de promover o aumento da expressão da NT-3 e qual a relevância dessa modulação. Até o presente momento, nossos resultados sugerem que na vigência de um estímulo excitotóxico de tamanha magnitude, conforme observamos, a OUA não é capaz de impedir a morte neuronal pelo aumento de NT-3 ou BDNF (figuras 35 e 34, respectivamente).

7 CONCLUSÃO

É indiscutível a relevância clínica de estudos que abordam processos de morte neuronal. A morte de neurônios hipocâmpais e corticais, por exemplo, são responsáveis pelos sintomas da doença de Alzheimer (MATTSON, 2000). Nesse cenário, a identificação de elementos que promovam a sobrevivência neuronal e possam contrapor essas cascatas moleculares de morte são de grande valia para tal processo.

Como observado nesta coletânea de resultados, a OUA se configura como um elemento que, além de possuir um papel bem estabelecido na literatura como promotor de sinalização celular por meio da NKA, demonstra um efeito protetor na medida em que aumenta a liberação de neurotrofinas como BDNF e NT-3. O aumento da liberação de NT-3 pela OUA em células neurais hipocâmpais é um achado inédito obtido no presente trabalho. Esse achado possui grande relevância em estudos da neurogênese no cérebro adulto, uma vez que a NT-3 atua na proliferação das células precursoras neurais e favorece a diferenciação em neurônios. Esse achado foi confirmado no projeto atual de pós-doutorado da Dra. Ana Maria Orellana, no qual colaboro, que expôs células precursoras neurais obtidas do GD de ratos a OUA 10 nM, verificando aumento da neurogênese (dados não publicados).

Ademais, no presente projeto a OUA foi capaz de reverter um fenótipo pró-inflamatório da microglia a um estado morfológico associado a efeitos anti-inflamatórios, o que reforça dados obtidos anteriormente no laboratório que mostram o efeito anti-inflamatório da OUA. No entanto, com o número amostral analisado até o presente momento, vimos que o co e pós-tratamento com OUA foi incapaz de impedir a morte dos neurônios expostos ao NMDA. Vale ressaltar que o tratamento com NMDA em culturas mistas de neurônios e células da glia de fato parece atuar como um estímulo mais lesivo do que o que se observa com a mesma concentração de NMDA em culturas primárias puras de neurônios, o que talvez represente uma lesão acima da qual os efeitos benéficos da OUA sejam capazes de proteger

É notório que vários resultados aqui descritos nesta dissertação necessitam de complementação, seja por um maior número amostral ou aprofundamento da análise de vias moleculares, entretanto é imprescindível que

o cenário de isolamento social decorrente da pandemia global pela COVID-19 seja considerado, uma vez que a limitação de acesso ao laboratório prejudicou em grande o andamento do projeto e atrasou o cronograma previsto. Concomitantemente, também se faz necessário relembrar os danos sofridos pelas instituições de ensino superior e os inegáveis ataques à ciência durante esse período tortuoso no país e por isso, diversos experimentos idealizados nesse projeto não conseguiram ser devidamente finalizados.

Podemos concluir que a continuidade da investigação dos mecanismos da OUA se faz necessária sob uma nova ótica e abordagem na elucidação do processo de excitotoxicidade, um dos principais mecanismos relacionados a desordens neurológicas. É notável que a NKA possui a vantagem de ter um arcabouço molecular grandioso e praticamente inesgotável que perdura sob investigação há mais de um século, o que denota potencial de inovação e enorme contribuição científica na área.

Ademais, estudos acerca de elementos direta ou indiretamente envolvidos em doenças tão debilitantes carregam a esperança de facilitar a descoberta, tratamento ou prevenção, visando sempre buscar o melhor cuidado possível para todos aqueles que são acometidos por elas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOWITZ, Joel; DAI, Cuiping; HIRSCHI, Karen K.; DMITRIEVA, Renata I.; DORIS, Peter A.; LIU, Lijun; ALLEN, Julius C. **Ouabain- and Marinobufagenin-Induced Proliferation of Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells and a Rat Vascular Smooth Muscle Cell Line, A7r5.** *Circulation, [S. l.]*, v. 108, n. 24, p. 3048–3053, 2003. DOI: 10.1161/01.CIR.0000101919.00548.86.
- AIZMAN, O.; UHLEN, P.; LAL, M.; BRISMAR, H.; APERIA, A. **Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, [S. l.]*, v. 98, n. 23, p. 13420–13424, 2001. DOI: 10.1073/pnas.221315298.
- AKKURATOV, Evgeny E.; WESTIN, Linda; VAZQUEZ-JUAREZ, Erika; DE MAROTHY, Minttu; MELNIKOVA, Aleksandra K.; BLOM, Hans; LINDSKOG, Maria; BRISMAR, Hjalmar; APERIA, Anita. **Ouabain Modulates the Functional Interaction Between Na,K-ATPase and NMDA Receptor.** *Molecular Neurobiology, [S. l.]*, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1007/s12035-020-01984-5.
- ARENDS, MARK J.; WYLLIE, ANDREW H. **Apoptosis: Mechanisms and Roles in Pathology.** *International Review of Experimental Pathology, [S. l.]*, v. 32, p. 223–254, 1991. DOI: 10.1016/B978-0-12-364932-450010-1.
- ARVIDSSON, Andreas; COLLIN, Tove; KIRIK, Deniz; KOKAIA, Zaal; LINDVALL, Olle. **Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.** *Nature Medicine, [S. l.]*, v. 8, n. 9, p. 963–970, 2002. DOI: 10.1038/nm747.
- AYDEMIR-KOKSOY, Aslihan; ABRAMOWITZ, Joel; ALLEN, Julius C. **Ouabain-induced Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation.** *Journal of Biological Chemistry, [S. l.]*, v. 276, n. 49, p. 46605–46611, 2001. DOI: 10.1074/jbc.M106178200.
- BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. **NF-kappa B: ten years after.** *Cell, [S. l.]*, v. 87, n. 1, p. 13–20, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858144>.
- BAEUERLE, P.; BALTIMORE, D. **I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor.** *Science, [S. l.]*, v. 242, n. 4878, p. 540–546, 1988. DOI: 10.1126/science.3140380.
- BARTSCH, T.; WULFF, P. **The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability.** *NeuroscienceUnited States*, 2015. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.084.
- BAZARGANI, Narges; ATTWELL, David. **Astrocyte calcium signaling: the third wave.** *Nature neuroscience, United States*, v. 19, n. 2, p. 182–189, 2016. DOI: 10.1038/nn.4201.
- BERRIDGE, M. J. **Neuronal calcium signaling.** *Neuron, United States*, v. 21, n. 1, p. 13–26, 1998. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80510-3.
- BLANCO, Gustavo. **Na⁺,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation.** *Seminars in Nephrology, [S. l.]*, v. 25, n. 5, p. 292–303, 2005. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2005.03.004.
- BLANCO, Gustavo; MERCER, Robert W. **Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function.** *Am. J. Physiol. Am J Physiol.* 1998;275(5): F633-F650. doi:10.1152/ajprenal.1998.275.5. F633
- BONIZZII, Giuseppina; KARIN, Michael. **The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.** *Trends in Immunology, [S. l.]*, v. 25, n. 6, p. 280–288, 2004. DOI:

10.1016/j.it.2004.03.008.

BOUTAHAR, Nadia; REYNAUD, Evelyne; LASSABLIERE, François; BORG, Jacques. **Brain-derived neurotrophic factor inhibits cell cycle reentry but not endoplasmic reticulum stress in cultured neurons following oxidative or excitotoxic stress.** *Journal of neuroscience research*, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 2263–71, 2010. DOI: 10.1002/jnr.22384.

BURLAKA, Ievgeniia; LIU, Xiao Li; REBETZ, Johan; ARVIDSSON, Ida; YANG, Liping; BRISMAR, Hjalmar; KARPMAN, Diana; APERIA, Anita. **Ouabain protects against Shiga toxin-triggered apoptosis by reversing the imbalance between Bax and Bcl-xL.** *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 1413–23, 2013. DOI: 10.1681/ASN.2012101044.

CAMANDOLA, Simonetta; MATTSON, Mark P. **NF- κ B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 123–132, 2007. DOI: 10.1517/14728222.11.2.123.

CASTEDO, Maria; PERFETTINI, Jean-Luc; ROUMIER, Thomas; ANDREAU, Karine; MEDEMA, Rene; KROEMER, Guido. **Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition.** *Oncogene*, England, v. 23, n. 16, p. 2825–2837, 2004. DOI: 10.1038/sj.onc.1207528.

CAVALCANTE-SILVA, Luiz H. A.; LIMA, Éssia de Almeida; CARVALHO, Deyse C. M.; SALES-NETO, José M. De; ALVES, Anne K. de Abreu; GALVÃO, José G. F. M.; SILVA, Juliane S. de França Da; RODRIGUES-MASCARENHAS, Sandra. **Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain.** *Frontiers in Physiology*, [S. l.], v. 8, p. 895, 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00895.

CHOI, D. W. **Ionic dependence of glutamate neurotoxicity.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 369–79, 1987.

CHOI, D. W.; KOH, J. Y.; PETERS, S. **Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 185–96, 1988. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.08-01-00185.1988.

CHOI, D. W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A. R. **Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 357–68, 1987. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.07-02-00357.1987.

CUI, Xiaoyu; XIE, Zijian. **Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction.** *Molecules*, [S. l.], v. 22, n. 6, 2017. DOI: 10.3390/molecules22060990.

DE SÁ LIMA, L.; KAWAMOTO, E. M.; MUNHOZ, C. D.; KINOSHITA, P. F.; ORELLANA, A. M. M.; CURI, R.; ROSSONI, L. V.; AVELLAR, M. C. W.; SCAVONE, C. **Ouabain activates NF κ B through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells.** *Neuropharmacology*, [S. l.], v. 73, p. 327–36, 2013. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.06.006

DOLMETSCH, Ricardo E.; XU, Keli; LEWIS, Richard S. **Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression.** *Nature*, [S. l.], v. 392, n. 6679, p. 933–936, 1998. DOI: 10.1038/31960.

ELMORE, Susan. **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicologic pathology*, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007. DOI: 10.1080/01926230701320337.

ERNFORS, P.; WETMORE, C.; OLSON, L.; PERSSON, H. **Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family.**

Neuron, [S. I.], v. 5, n. 4, p. 511–26, 1990.

FEATHERSTONE, David E. **Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond.** ACS chemical neuroscience, [S. I.], v. 1, n. 1, p. 4–12, 2010. DOI: 10.1021/cn900006n.

FINKBEINER, S.; TAVAZOIE, S. F.; MALORATSKY, A.; JACOBS, K. M.; HARRIS, K. M.; GREENBERG, M. E. **CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses.** Neuron, [S. I.], v. 19, n. 5, p. 1031–47, 1997.

FOLCH, Jaume; JUNYENT, Felix; VERDAGUER, Ester; AULADELL, Carme; PIZARRO, Javier G.; BEAS-ZARATE, Carlos; PALLÀS, Mercè; CAMINS, Antoni. **Role of cell cycle re-entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death.** Neurotoxicity research, United States, v. 22, n. 3, p. 195–207, 2012. DOI: 10.1007/s12640-011-9277-4.

GERONDAKIS, S.; GROSSMANN, M.; NAKAMURA, Y.; POHL, T.; GRUMONT, R. **Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts.** Oncogene, [S. I.], v. 18, n. 49, p. 6888–95, 1999. DOI: 10.1038/sj.onc.1203236.

HAAS, M.; ASKARI, A.; XIE, Z. **Involvement of Src and Epidermal Growth Factor Receptor in the Signal Transducing Function of Na⁺/K⁺-ATPase.** Journal of Biological Chemistry, [S. I.], v. 275, n. 36, p. 27832–7, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M002951200.

HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DUCHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H. **Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [S. I.], v. 88, n. 14, p. 6259–63, 1991.

HAMMANN, Jens; BASSETTI, Davide; WHITE, Robin; LUHMANN, Heiko J.; KIRISCHUK, Sergei. **α2 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase via Na⁺,Ca²⁺ exchanger modulates myelin basic protein synthesis in oligodendrocyte lineage cells in vitro.** Cell calcium, Netherlands, v. 73, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1016/j.ceca.2018.03.003.

HARDINGHAM, Giles E.; BADING, Hilmar. **Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders.** Nature Reviews Neuroscience, [S. I.], v. 11, n. 10, p. 682–696, 2010. DOI: 10.1038/nrn2911.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, Sankar. **Signaling to NF- B.** Genes & Development, [S. I.], v. 18, n. 18, p. 2195–2224, 2004. DOI: 10.1101/gad.1228704.

HETMAN, M.; KANNING, K.; CAVANAUGH, J. E.; XIA, Z. **Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase.** The Journal of biological chemistry, [S. I.], v. 274, n. 32, p. 22569–80, 1999.

HIYOSHI, H. et al. **Quiescence and γH2AX in neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase.** British Journal of Cancer, [S. I.], v. 106, n. 11, p. 1807–1815, 2012. DOI: 10.1038/bjc.2012.159.

HOFER, M.; PAGLIUSI, S. R.; HOHN, A.; LEIBROCK, J.; BARDE, Y. A. **Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain.** The EMBO journal, [S. I.], v. 9, n. 8, p. 2459–64, 1990.

IGNEY, Frederik H.; KRAMMER, Peter H. **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** Nature Reviews Cancer, [S. I.], v. 2, n. 4, p. 277–288, 2002. DOI: 10.1038/nrc776.

KAECH, Stefanie; BANKER, Gary. **Culturing hippocampal neurons.** Nature protocols,

England, v. 1, n. 5, p. 2406–2415, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.356.

KALTSCHMIDT, C.; KALTSCHMIDT, B.; BAEUERLE, P. A. **Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B.** *Mechanisms of development, [S. l.]*, v. 43, n. 2–3, p. 135–47, 1993.

KAWAMOTO, E. M. et al. **Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor-kB in the rat hippocampus.** *Journal of neuroscience research, [S. l.]*, v. 90, n. 1, p. 213–28, 2012. DOI: 10.1002/jnr.22745.

LARRE, Isabel; CEREIJIDO, Marcelino. **Na⁺,K⁺-ATPase is the membrane receptor of hormone ouabain.** *Communicative & Integrative Biology, [S. l.]*, v. 3, n. 6, p. 625–628, 2010. DOI: 10.4161/cib.3.6.13498.

LEAL, Graciano; COMPRIDO, Diogo; DUARTE, Carlos B. **BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity.** *Neuropharmacology, [S. l.]*, v. 76, p. 639–656, 2014. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005.

LI, J.; ZELENIN, Sergey; APERIA, Anita; AIZMAN, Oleg. **Low Doses of Ouabain Protect from Serum Deprivation-Triggered Apoptosis and Stimulate Kidney Cell Proliferation via Activation of NF- B.** *Journal of the American Society of Nephrology, [S. l.]*, v. 17, n. 7, p. 1848–1857, 2006. DOI: 10.1681/ASN.2005080894.

LIANG, Man; CAI, Ting; TIAN, Jiang; QU, Weikai; XIE, Zi Jian. **Functional characterization of Src-interacting Na/K-ATPase using RNA interference assay.** *Journal of Biological Chemistry, [S. l.]*, v. 281, n. 28, p. 19709–19719, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M512240200.

LINGREL, Jerry B. **The Physiological Significance of the Cardiotonic Steroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase.** *Annual Review of Physiology, [S. l.]*, v. 72, n. 1, p. 395–412, 2010. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135725.

LIU, Xiao Li; MIYAKAWA, Ayako; APERIA, Anita; KRIEGER, Patrik. **Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes.** *NeuroReport, [S. l.]*, v. 18, n. 6, p. 597–600, 2007. a. DOI: 10.1097/WNR.0b013e3280b07bc9.

LIU, Zhaohui; MA, Dongliang; FENG, Gaifeng; MA, Yanbing; HU, Haitao. **Recombinant AAV-mediated expression of human BDNF protects neurons against cell apoptosis in Aβ-induced neuronal damage model.** *Journal of Huazhong University of Science and Technology, [S. l.]*, v. 27, n. 3, p. 233–236, 2007. b. DOI: 10.1007/s11596-007-0304-x.

MAESTRE, Carolina; DELGADO-ESTEBAN, Maria; GOMEZ-SANCHEZ, Jose C.; BOLAÑOS, Juan P.; ALMEIDA, Angeles. **Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity.** *EMBO Journal, [S. l.]*, v. 27, n. 20, p. 2736–2745, 2008. DOI: 10.1038/emboj.2008.195.

MATTSON, Mark P. **Apoptosis in neurodegenerative disorders.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology, [S. l.]*, v. 1, n. 2, p. 120–130, 2000. DOI: 10.1038/35040009.

MOSELEY, Amy E. et al. **The Na,K-ATPase α 2 Isoform Is Expressed in Neurons, and Its Absence Disrupts Neuronal Activity in Newborn Mice.** *[S. l.]*, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M211315200.

O'RIORDAN, Kenneth J. et al. **Regulation of nuclear factor kappaB in the hippocampus by group I metabotropic glutamate receptors.** *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, [S. l.]*, v. 26, n. 18, p. 4870–9, 2006. DOI:

10.1523/JNEUROSCI.4527-05.2006.

ORELLANA, Ana Maria; LEITE, Jacqueline Alves; KINOSHITA, Paula Fernanda; VASCONCELOS, Andrea Rodrigues; ANDREOTTI, Diana Zukas; DE SÁ LIMA, Larissa; XAVIER, Gilberto Fernando; KAWAMOTO, Elisa Mitiko; SCAVONE, Cristoforo. **Ouabain increases neuronal branching in hippocampus and improves spatial memory.** *Neuropharmacology*, [S. l.], v. 140, n. July, p. 260–274, 2018. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.008.

OVEJERO-BENITO, María C.; FRADE, José M. **Brain-derived neurotrophic factor-dependent cdk1 inhibition prevents G2/M progression in differentiating tetraploid neurons.** *PloS one*, [S. l.], v. 8, n. 5, p. e64890, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0064890.

PASPARAKIS, M.; LUEDDE, T.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M. **Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice.** *Cell Death and Differentiation*, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 861–872, 2006. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401870.

PENG, Chao; TROJANOWSKI, John Q.; LEE, Virginia M. Y. **Protein transmission in neurodegenerative disease.** *Nature Reviews Neurology*, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 199–212, 2020. DOI: 10.1038/s41582-020-0333-7. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41582-020-0333-7>. Acesso em: 29 jun. 2020.

PETERS, Jan-Michael. **The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy.** *Nature reviews. Molecular cell biology*, England, v. 7, n. 9, p. 644–656, 2006. DOI: 10.1038/nrm1988.

POST, R. L.; KUME, S.; TOBIN, T.; ORCUTT, B.; SEN, A. K. **Flexibility of an Active Center in Sodium-Plus-Potassium Adenosine Triphosphatase.** *The Journal of General Physiology*, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 306–326, 1969. DOI: 10.1085/jgp.54.1.306.

REINER, Andreas; LEVITZ, Joshua. **Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert.** *Neuron*, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 1080–1098, 2018. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.05.018.

SASI, Manju; VIGNOLI, Beatrice; CANOSSA, Marco; BLUM, Robert. **Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling.** *European Journal of Physiology*, [S. l.], v. 469, n. 5–6, p. 593–610, 2017. DOI: 10.1007/s00424-017-1964-4.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. **Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death.** *Molecular neurobiology*, United States, v. 24, n. 1–3, p. 107–129, 2001. DOI: 10.1385/MN:24:1-3:107.

SEWARD, Matthew E.; SWANSON, Eric; NORAMBUENA, Andrés; REIMANN, Anja; COCHRAN, J. Nicholas; LI, Rong; ROBERSON, Erik D.; BLOOM, George S. **Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease.** *Journal of cell science*, [S. l.], v. 126, n. Pt 5, p. 1278–1286, 2013. DOI: 10.1242/jcs.1125880.

SIBAROV, D. A.; BOLSHAKOV, A. E.; ABUSHIK, P. A.; KRIVOI, I. I.; ANTONOV, S. M. **Na⁺,K⁺-ATPase Functionally Interacts with the Plasma Membrane Na⁺,Ca²⁺ Exchanger to Prevent Ca²⁺ Overload and Neuronal Apoptosis in Excitotoxic Stress.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, [S. l.], v. 343, n. 3, p. 596–607, 2012. DOI: 10.1124/jpet.112.198341.

SIEBENLIST, U. NF kappa B/I kappa B proteins. **Their role in cell growth, differentiation and development.** *Biochimica et biophysica acta*, [S. l.], v. 1332, n. 1, p. R7-13, 1997.

SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W. **Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of Electrophorus electric organ. IV. Modification of responses to sodium and potassium by**

arsenite plus 2,3-dimercaptopropanol. The Journal of biological chemistry, United States, v. 242, n. 21, p. 4972–4979, 1967.

SILVA, Josiane N.; LUCENA, Elvis V; SILVA, Talita M.; DAMASCENO, Rosélia S.; TAKAKURA, Ana C.; MOREIRA, Thiago S. **Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus reduces genioglossal activity elicited by stimulation of the retrotrapezoid chemoreceptor neurons.** Neuroscience, [S. l.], v. 328, p. 9–21, 2016. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.028.

SKOU, Jens Chr. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochimica et Biophysica Acta, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 394–401, 1957. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90343-8.

SWEADNER, Kathleen J. **Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase.** Reviews on Biomembranes Elsevier, 1989. DOI: 10.1016/0304-4157(89)90019-1.

TAO, X.; FINKBEINER, S.; ARNOLD, D. B.; SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. **Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism.** Neuron, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 709–26, 1998.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. **Death through a tragedy: mitotic catastrophe.** Cell death and differentiation, England, v. 15, n. 7, p. 1153–1162, 2008. DOI: 10.1038/cdd.2008.47.

VAN PRAAG, Henriette; SCHINDER, Alejandro F.; CHRISTIE, Brian R.; TONI, Nicolas; PALMER, Theo D.; GAGE, Fred H. **Functional neurogenesis in the adult hippocampus.** Nature, [S. l.], v. 415, n. 6875, p. 1030–4, 2002. DOI: 10.1038/4151030a.

VEAS-PÉREZ DE TUDELA, Miguel; DELGADO-ESTEBAN, María; MAESTRE, Carolina; BOBO-JIMÉNEZ, Verónica; JIMÉNEZ-BLASCO, Daniel; VECINO, Rebeca; BOLAÑOS, Juan P.; ALMEIDA, Angeles. **Regulation of Bcl-xL-ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1-Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal Survival.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, [S. l.], v. 35, n. 25, p. 9287–301, 2015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4712-14.2015.

VINET, Jonathan et al. **Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity.** Journal of Neuroinflammation, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 515, 2012. DOI: 10.1186/1742-2094-9-27.

WANG, Rui; REDDY, P. Hemachandra. **Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease.** Journal of Alzheimer's disease: JAD, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 1041–1048, 2017. DOI: 10.3233/JAD-160763.

WETMORE, C.; ERNFORS, P.; PERSSON, H.; OLSON, L. **Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization.** Experimental neurology, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 141–52, 1990.

WRIGHT, Stephen H. **Generation of resting membrane potential.** Advances in physiology education, United States, v. 28, n. 1–4, p. 139–142, 2004. DOI: 10.1152/advan.00029.2004.

WU, Chia-Lin; HWANG, Chi-Shin; CHEN, Shang-Der; YIN, Jiu-Haw; YANG, Ding-I. **Neuroprotective mechanisms of brain-derived neurotrophic factor against 3-nitropropionic acid toxicity: therapeutic implications for Huntington's disease.** Annals of the New York Academy of Sciences, [S. l.], v. 1201, n. 1, p. 8–12, 2010. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05628.

XIE, Z.; CAI, Ting. **Na⁺-K⁺-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction**

to **Cellular Function**. *Molecular Interventions*, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 157–168, 2003. DOI: 10.1124/mi.3.3.157.

XIE, Zijian; ASKARI, Amir. **Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer**. *European journal of biochemistry*, [S. l.], v. 269, n. 10, p. 2434–9, 2002.

YAN, Xiao-Xin; JEROMIN, Andreas; JEROMIN, A. **Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases**. *Current translational geriatrics and experimental gerontology reports*, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 85–93, 2012. DOI: 10.1007/s13670-012-0009-2.

YU, Hui; CUI, Xiaoyu; ZHANG, Jue; XIE, Joe X.; BANERJEE, Moumita; PIERRE, Sandrine V; XIE, Zijian. **Heterogeneity of signal transduction by Na-K-ATPase α -isoforms: role of Src interaction**. *American journal of physiology. Cell physiology*, [S. l.], v. 314, n. 2, p. C202–C210, 2018. DOI: 10.1152/ajpcell.00124.2017.

ZAMZAMI, Naoufal; KROEMER, Guido. **The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 67–71, 2001. DOI: 10.1038/35048073.

ZHANG, Jingyu; YU, Zhigang; YU, Zhiqiang; YANG, Zichao; ZHAO, Hong; LIU, Luran; ZHAO, Jiexu. **rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model**. *International journal of clinical and experimental pathology*, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 496–504, 2011.

ZHOU, Qiang; SHENG, Morgan. **NMDA receptors in nervous system diseases**. *Neuropharmacology*, [S. l.], v. 74, p. 69–75, 2013. DOI: 10.1016/J.NEUROPHARM.2013.03.030.