Universidade Federal
de São João del-Rei

CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU – CCO

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Gisele Silva Maia

Avaliação de proteínas associadas à sinalização de cálcio e apoptose em hipocampo de ratos tratados com ouabaína e induzidos a neuroinflamação por lipopolissacarídeos

DIVINÓPOLIS-MG
Agosto/ 2020

Universidade Federal
de São João del-Rei

CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU – CCO

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Gisele Silva Maia

Avaliação de proteínas associadas à sinalização de cálcio e apoptose em hipocampo de ratos tratados com ouabaína e induzidos a neuroinflamação por lipopolissacarídeos

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito parcial para a obtenção de grau de mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho

DIVINÓPOLIS-MG
2020

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M217a

Maia, Gisele Silva.
Avaliação de proteínas associadas à sinalização de cálcio e apoptose em hipocampo de ratos tratados com ouabaína e induzidos a neuroinflamação por lipopolissacarídeos / Gisele Silva Maia ; orientadora Luciana Estefani Drumond de Carvalho. -- Divinópolis, 2020.
63 p.

Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2020.

1. Neuroinflamação. 2. LPS. 3. Ouabaína. 4. Cálcio. 5. Mitocôndria e retículo endoplasmático.. I. Drumond de Carvalho, Luciana Estefani , orient. II. Título.

UFSJ
Universidade Federal de São João del-Rei

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ
INSTITUIDA PELA LEI Nº.10.425 DE 19/04/2002 – D.O.U. DE 22/04/2002
CAMPUS CENTRO-OESTE DONA LINDU
Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

DISCENTE: GISELE SILVA MAIA

NÍVEL: MESTRADO

DATA DA DEFESA: 28/08/2020

HORÁRIO DE INÍCIO: 9h e 15mim LOCAL: PLATAFORMA REMOTA - GOOGLE MEET

MEMBROS DA BANCA		FUNÇÃO	TÍTULO	INSTITUIÇÃO DE ORIGEM
NOME COMPLETO	CPF			
Luciana Estefani D. de Carvalho	038.709.566-74	Presidente	Dr.	UFSJ
Vanessa Faria Cortes	082.598.157-37	Membro	Dr.	UFSJ
André Ricardo Massensini	844.544.236- 87	Membro	Dr.	UFMG

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação de proteínas associadas a sinalização de cálcio e apoptose em hipocampo de ratos tratados com Ouabaína e induzidos a neuroinflamação por lipopolissacarídeos".

Em sessão pública, após apresentação da tese durante 40mim minutos, a discente foi arguida oralmente pelos examinadores. Reunida em sessão secreta, às 12h e 25mim, a banca considerou a mestranda **aprovada.**
Para constar, foi lavrada a presente ata, que é abaixo assinada pelos membros da banca e pela doutoranda.

Divinópolis, 28 de agosto de 2020.

Dra. Luciana Estefani Drumond de Carvalho _____

Dra. Vanessa Faria Cortes _____

Dr. André Ricardo Massensini _____

Gisele Silva Maia _____

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – CAPES

Dedico esse trabalho

A meu exemplo, minha amada irmã, Grazielle Maia.

AGRADECIMENTO

Durante esse ciclo chamado mestrado, aprendi o significado de GRATIDÃO, compreendendo que é muito além de um obrigado que ouvimos constantemente.

Gratidão à força superior, Deus, o qual por muitas vezes não acreditei, mas esteve presente em toda a minha caminhada, nos dias de fé ou sem ela. Agradeço também aos amigos de luz, que estiveram presentes me guiando e auxiliando a acreditar em mim.

Gratidão aos meus amados pais, pela educação primária e princípios, durante esta caminhada me ensinaram muito a ressignificar os valores da vida. Gratidão à minha estrelinha, Vovó Leonor, que por tantas vezes me convidava para sentar na beirada de sua cama e me dizia para ter calma e fé que um dia as coisas iriam melhorar! Gratidão a quem eu tenho um amor incondicional, meus sobrinhos, João e Iuri, que sempre me trouxeram paz, arrancaram meus maiores sorrisos e incansáveis beijos melados.

Gratidão à minha segunda orientadora, Professora Luciana, que me aceitou pelo caminho para realizar este trabalho, me ensinando a Ciência, com tamanha paciência.

Gratidão à FAPEMIG E CAPES, pelo apoio financeiro e bolsa.

Gratidão ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular.

Gratidão à USP, em especial ao Professor Cristóforo.

Gratidão à UFSJ, minha primeira orientadora, Professora Nayara Delgado, todos os professores os quais tive a oportunidade de aprender com eles, técnicos, em especial a Letícia e Michael, pelo auxílio sempre. Aos alunos do PET Bioquímica, que me proporcionaram a participação efetiva de seus projetos. A Produção do álcool em gel, que me proporcionou novos conhecimentos e possibilidade de ajudar ao próximo nesta pandemia.

Gratidão aos professores do LABIC, Professor Leandro, o qual tenho tamanha admiração por sua compreensão pela ciência, seus conselhos sempre foram valiosos para este trabalho. A Professora Hérica, pelo carinho e grande auxílio em meu projeto, suas considerações foram sempre muito importantes neste trabalho. E a Professora Vanessa, que sempre me auxiliou, desde o início, nas mudanças, na bolsa, no projeto e nas considerações pertinentes. A sua empatia é admirável.

Gratidão aos quatro Professores deste Laboratório, que me ensinaram a Ciência, tenho como exemplo e grande admiração por estes grandes pesquisadores.

Gratidão ao melhor “Laboratório” dos laboratórios do mundo: LABIC - Membranas/ATPases! Lugar onde me senti muito bem acolhida, no qual convivi com pessoas de grandes corações, sempre dispostas a ajudar. Neste lugar, redescobri um “eu” diferente na bancada.

Gratidão à melhor técnica do mundo, Grazielle, sempre disponível a ajudar e auxiliar na resolução dos problemas de uma maneira simples e leve. E aos que também seguraram a minha mão quando eu decidi desistir, Israel, Duane, Vitória, Ítalo, Duda e Carol Ramos, dispostos a ajudar em uma “Força Tarefa” caso fosse preciso começar um novo projeto em meio a tantos. Gratidão à companhia e ensinamentos de todos os dias, Carol Ramos, Duane, Duda, Israel, Ítalo, Leilis, Lilian, Jéssikinha e Vitória.

Tamanha é a gratidão a um ser de tanta luz e grande coração, Israel. Pessoa que sabe tão bem economizar, que me doou suas metades. Que me auxiliou a aprender técnicas, conteúdos bioquímicos, desenhava para eu entender as sinalizações, me direcionou sobre resultados, sempre disponível a tirar as dúvidas mais bobas possíveis, a comemorar os resultados, a assistir as minhas apresentações e fazer considerações necessárias e importantes. Sorte a minha de ter um grande amigo.

Gratidão ao nosso grupo de neuro, Vitória, Ítalo e Duda, tão sincronizado, engraçado e leal. Gratidão à Vitorinha, que me ensinou e ajudou a aprender as técnicas bioquímicas, que esteve presente com a sua mochilinha nas costas, escutava minhas lamúrias, e inclusive decorou minha apresentação do Steroids, ela que pacientemente me ouvia apresentar, “*My name is hipocamppus!”* Ao Ítalozinho, que me ajudou a executar os experimentos, me ensinou sobre o tratamento de animais, e sempre transformava tudo em alegria. Dudinha, minha companheira blogueira- cientista, a alegria do grupo, sempre esteve ali para nos fazer rir, sim, de qualquer coisa! Nós quatro sempre incendiávamos o laboratório! Gratidão as nossas comemorações semanais com açaís e em dias sofisticados, churros!

Gratidão ao Espaço de Acompanhamento Pedagógico que esteve presente durante a caminhada. Em especial à Lili, que dividiu comigo as angústias e ansiedades de nossos mestrados.

Gratidão à Escola Crescer Podium, em especial à diretora, Eleonora Amábili,

meu exemplo pedagógico, que me ensina a ser uma professora construtivista e me torna uma profissional com um olhar e postura diferente do convencional. Gratidão à minha Coordenadora, Cris Penha, sempre com muita paciência, soube respeitar meus tempos complicados e juntamente com a Valéria, sempre ajustaram o meu horário para que eu pudesse fazer as disciplinas do mestrado. Gratidão a todos os colegas de trabalho da escola.

Gratidão aos meus amigos, que a Crescer trouxe, SQGDP, Cris, Jaque, Ketry, Otávia, Pércia e Winícius, que de maneira leve e saudável seguimos juntos durante TODO o tempo. O apoio, o companheirismo e o acalento de vocês durante este ciclo foi muito importante.

Gratidão às minhas amigas, que sempre respeitaram a minha falta de tempo, que enxugaram as minhas lágrimas, seguraram a minha mão e que de alguma maneira sempre trouxeram leveza aos meus dias, nas conversas, nos conselhos, no karaokê, nas festas, no simples ato de estarem perto ou de um abraço apertado, Aline, Ana Laura, Carol Oliveira, Carol Prates, Carol Ramos, Jéssikinha, Jaque, Joyce, Lu, Maria Clara Tedesco, Katlen, Naiara e Pércia.

Gratidão aos que sempre cuidaram de mim antes e durante a caminhada. Ao meu amigo e professor de inglês Bernardo, a melhor acupunturista que sempre cuidou da minha ansiedade, do meu personal/guia Marquinho, que me ajudava a liberar os neurotransmissores do bem e a diminuir minhas dores neurais e ao meu psicólogo Edgar, que não me deixou enlouquecer e ajudando com várias estratégias necessárias nesta caminhada.

Em especial, GRATIDÃO a pessoas essenciais neste ciclo, que sem vocês não sei se teria chegado aqui. Novamente, a minha amada e amiga irmã, Grazielle, que sempre me escutou, ajudou, apoiou, acolheu, ensinou, puxou a orelha, é referência, e segurou a minha mão em tantos momentos vividos durante esta caminhada tão difícil. A minha amada tia, madrinha Lenir, que me acolheu antes de iniciar o mestrado em sua casa, para os treinamentos em BH, que sempre me ouviu, aconselhou, acolheu e me auxiliou a buscar neste caminho a fé em Deus. A minha "*best*", confidente, alto astral, Helô, que sempre esteve presente em todos os momentos, me fez rir, me ajudou a sempre achar uma luz no fim do túnel e trazer leveza nos dias difíceis.

Enfim, gratidão ao meu combustível para seguir estudando, buscando ser melhor que um dia eu fui, os meus alunos. Meu termômetro do ensino/aprendizagem. A todos que passaram, antes e durante esta caminhada, aos alunos do CEFET, da Crescer, das salas de Química da Gi, das aulas particulares, meus afilhados, e aos meus alunos do “*Mundo Azul*” que me ensinam que é preciso tratar o mundo com equidade e não com igualdade.

Minha eterna GRATIDÃO a todos os pontinhos de luz a quem me referi aqui!

Amor e Luz!

A mente é tudo. O que você pensa, você se torna!
Sidarta Gautama (Buddha)

RESUMO

As doenças neurodegenerativas são enfermidades incuráveis e debilitantes, que afetam a função dos neurônios, podendo culminar em morte neuronal e prejuízos importantes ao indivíduo. O processo inflamatório tem sido relatado como fator presente em várias doenças neurológicas, que podem comprometer a função do retículo endoplasmático e mitocôndria, desregulando a homeostase de cálcio, em células neurais. Em estudos anteriores vimos que, a ouabaína quando administrada em concentrações nanomolares é capaz de atenuar o estresse oxidativo, protegendo a membrana celular da neuroinflamação promovida por lipopolissacarídeos (LPS), em hipocampo de ratos Wistar. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da ouabaína sobre componentes da sinalização e homeostase do cálcio e apoptose em modelo de neuroinflamação induzida por LPS, a fim de esclarecer os possíveis mecanismos de ação da ouabaína que possam justificar seus efeitos protetores na célula neuronal. Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos os quais receberam uma administração intraperitoneal (i.p) de salina ou ouabaína (1,8 µg. kg $^{-1}$), e após 20 minutos foi administrada uma segunda injeção de salina ou de LPS (200 µg. kg $^{-1}$). Passadas 2 horas os animais foram eutanasiados e os hipocampos foram removidos. A neuroinflamação foi analisada pelo estresse nitrosativo através da expressão da proteína iNOS. Para a expressão proteica da via de sinalização de cálcio foram analisadas a NCS-1, IP3R, MCU e a subunidade GluR1 do receptor de glutamato AMPA. Para analisar a disfunção mitocondrial e morte celular foi analisada a via de apoptose mitocondrial independente de caspase, através da expressão de AIF. Nosso trabalho demonstrou que a OUA em baixa concentração, administrada isoladamente, não altera nenhum dos parâmetros avaliados. Além disso, houve um aumento na expressão de IP3R em ratos administrados com LPS e para as proteínas NCS-1 e MCU houve aumento significativo para o grupo OUA + LPS, quando comparados ao grupo controle. Para as proteínas iNOS, AIF e GluR1 não houve diferença entre os grupos. Sendo assim, os resultados demonstram que há alterações em fatores que contribuem com a homeostase do cálcio, em ratos tratados com ouabaína e induzidos a neuroinflamação pelo do LPS, sugerindo que a ouabaína pode estar interferindo nos parâmetros citados impedindo a instalação dos danos ocasionados pelo LPS.

Palavras-chaves: neuroinflamação, LPS, ouabaína, apoptose, cálcio, mitocôndria, retículo endoplasmático.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are incurable and debilitating diseases, which affect the function of neurons, which can culminate in neuronal death and important damage to the individual. The inflammatory process has been reported as a factor present in several neurological diseases, which can compromise the function of the endoplasmic reticulum and mitochondria, disrupting calcium homeostasis in neural cells. In previous studies we have seen that, when administered in nanomolar concentrations, ouabain is able to attenuate oxidative stress, protecting the cell membrane from neuroinflammation promoted by lipopolysaccharides (LPS) in the hippocampus of Wistar rats. In this context, this study aimed to investigate the effect of ouabain on components of calcium signaling and homeostasis and apoptosis in a model of neuroinflammation induced by LPS, in order to clarify the possible mechanisms of action of ouabain that may justify its protective effects on the cell. neuronal. Male Wistar rats were divided into four groups which received an intraperitoneal (ip) administration of saline or ouabain (1.8 µg. Kg -1), and after 20 minutes a second injection of saline or LPS (200 µg. kg -1). After 2 hours the animals were euthanized and the hippocampi were removed. Neuroinflammation was analyzed by nitrosative stress through the expression of the iNOS protein. For protein expression of the calcium signaling pathway, NCS-1, IP3R, MCU and the GluR1 subunit of the AMPA glutamate receptor were analyzed. To analyze mitochondrial dysfunction and cell death, the pathway of mitochondrial apoptosis independent of caspase was analyzed through the expression of AIF. Our work demonstrated that the OUA in low concentration, administered in isolation, does not alter any of the evaluated parameters. In addition, there was an increase in the expression of IP3R in rats administered with LPS and for the NCS-1 and MCU proteins there was a significant increase for the OUA + LPS group, when compared to the control group. For iNOS, AIF and GluR1 proteins there was no difference between groups. Thus, the results demonstrate that there are changes in factors that contribute to calcium homeostasis in rats treated with ouabain and induced to neuroinflammation by LPS, suggesting that ouabain may be interfering with the parameters mentioned preventing the installation of damage caused by LPS .

Keywords: neuroinflammation, LPS, ouabain, apoptosis, calcium, mitochondria, endoplasmic reticulum.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO....4
1.1 Neuroinflamação....4
1.2 Sinalização e homeostase de cálcio....7
1.2.1 Proteína Neuronal Sensora de Cálcio (NCS-1)....10
1.2.2 Receptor de fosfatidil inositol (IP3R)....11
1.2.3 Canal Unipoter Mitocondrial (MCU)....12
1.2.4 Alfa – amino - 3 – hidroxi – metil – 5,4 – isoxazolpropiónico (AMPA)....15
1.3 Apoptose....17
1.4 Ouabaína (OUA)....20
2. JUSTIFICATIVA....26
3. OBJETIVOS....27
3.1 OBJETIVO GERAL....27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS....27
4. METODOLOGIA....28
4.1 Animais....28
4. 2 Tratamento com OUA e LPS....28
4. 3 Preparação de amostra....29
4. 4 Determinação de proteínas....29
4. 5 Análises da expressão das proteínas por Western Blotting....30
4.6 Análise estatística....31
5. RESULTADOS....32
5.1.1 Avaliação da expressão de iNOS....32
5.1.2 Avaliação da expressão de GLUR1....33
5.1.3 Avaliação da expressão de NCS-1....34
5.1.4 Avaliação da expressão de IP3R....35
5.1.5 Avaliação da expressão de MCU....36
5.1.6 Avaliação da expressão de AIF....37
6. DISCUSSÃO....38
7. CONCLUSÃO....44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....46
ANEXO - 1....62

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação estrutural do LPS 07
Figura 02: Componentes que contribuem para a homeostase do cálcio celular.....09
Figura 03: Representação esquemática do complexo MCU 13
Figura 04: Esquema de transferência de cálcio do RE para a mitocôndria 14
Figura 05: Receptores de glutamato.....16
Figura 06: Composição do receptor de glutamato AMPA e sua permeabilidade de cálcio 17
Figura 07: Vias apoptóticas.....18
Figura 08: Estrutura química da OUA 20
Figura 09: Via iônica versus vias de sinalização para efeitos de esteróides cardiotônicos 21
Figura 10: Esquema dos principais efeitos modulados de OUA e LPS no hipocampo de ratos.....24
Figura 11: Divisão dos grupos.....29
Figura 12: Efeito da OUA na expressão de iNOS em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS.....32
Figura 13: Efeito da OUA na expressão de GluR1 em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS.....33
Figura 14: Efeito da OUA na expressão de NCS-1 em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS.....34
Figura 15: Efeito da OUA na expressão de IP3R em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS.....35
Figura 16: Efeito da OUA na expressão de MCU em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS.....36
Figura 17: Efeito da OUA na expressão de AIF em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS.....37
Figura 18: Efeitos causados pelo LPS e OUA na sinalização de cálcio 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
AMPA	Alfa – amino - 3 – hidroxi – metil – 5,4 - isoxazolpropiónico
ATP	Adenosina trifosfatoAIF
Casp 3	Caspase 3
Casp 8	Caspase 8
Casp 9	Caspase 9
CD14	Receptor de superfície de membrana 14
CTR	Controle
DAG	Diacilglicerol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GluR1	Subunidade 1 do Receptor de glutamato AMPA
HCl	Ácido clorídrico
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Fosfatidil inositol
IP3R	Receptor de inositol trifosfato
LPS	Lipopolissacarídeo
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MCU	Canal mitocondrial unipoter
NaCl	Cloreto de sódio
NCS-1	Neuronal Calcium Sensor 1
NF-kB	Fator de necrose tumoral
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
PBS	Tampão fosfato

PMCA	ATPase de membrana plasmática transportadora de Ca^{2+}
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio SM- esfingomielina
SERCA	Ca-ATPase de retículo sarco/endoplasmático
SNC	Sistema nervoso central
SR	Sarcoplasmático
OUA	Ouabaína
TLR-4	Receptores toll-like 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neuroinflamação

Neuroinflamação é definida como uma resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC), a qual possui consequências imunes, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas. O nível da neuroinflamação depende da duração e curso do estímulo primário como, por exemplo, trauma no SNC e estresse (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). Quando esse processo ocorre de maneira exacerbada, acarreta diversos efeitos deletérios às células do SNC, como nos neurônios e nas células da glia (HANDEL; IRANI; HOLLÄNDER, 2018).

A resposta inflamatória inclui a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, tinfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos. Durante a infecção, a quimiotaxia é um importante evento para o recrutamento de células para o sítio de inflamação (ABBAS; JANEWAY, 2000).

As respostas de defesa, incluindo inflamação, são geralmente benéficas ao organismo, auxiliando para limitar a sobrevivência e proliferação dos agentes invasores, promovendo a sobrevivência do tecido, reparo e recuperação. Entretanto, uma inflamação extensiva, prolongada ou não regulada é altamente prejudicial ao organismo, sendoos processos pró-inflamatórios regulados por uma série equivalente de processos anti-inflamatórios teciduais (GOMES-LEAL, 2002).

O SNC controla toda nossa maquinaria biológica, sendo responsável por diversas funções muito importantes em nosso organismo, como o movimento, a cognição, os sentidos e as emoções (TULADHAR *et al.*, 2015).

Dentre as regiões do SNC, destaca-se o hipocampo, uma pequena estrutura de substância cinzenta, localizada simetricamente no lobo médio temporal de ambos os hemisférios do cérebro (HENEKA *et al.*, 2015). O hipocampo é responsável pelo processo da memória recente que é definido como a capacidade de reter e armazenar informações adquiridas, salvando os dados que o cérebro está processando em um determinado momento (SILVÉRIO; ROSAT, 2006).

Várias doenças neurológicas são causadas ou cursam com o desenvolvimento

de processo neuroinflamatório, como esclerose múltipla, lúpus eritematoso, epilepsia e também doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer, Parkinson e Huntington (LEWERENZ; MAHER, 2015; GILHUS; DEUSCHL, 2019), nas quais podem ocorrer alterações hipocampais, que levam ao comprometimento da função de memória (MOODLEY; CHAN, 2014).

As respostas neuroinflamatórias são mediadas por citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, e TNFα), quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL1), espécies reativas de oxigênio (ROS) e segundos mensageiros (NO e prostaglandinas). Muitos destes mediadores são produzidos por células do SNC incluindo as micróglias e os astrócitos (NORDEN *et al.*, 2016).

As citocinas causam modificações na célula alvo, como mudanças morfológicas, expressão de moléculas de adesão, produção de radicais livres e liberação de mais citocinas inflamatórias (J. M. DA SILVA; K. B. FERRARI, 2011).

O processo inflamatório também está associado à exacerbação do estresse oxidativo (BENNETTA *et al.*, 2019) e nitrosativo celular (XUEXIU *et al.*, 2017). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a concentração de agentes oxidantes e antioxidantes que, como saldo final há um excesso de radicais livres (LAI *et al.*, 2014). Os radicais livres possuem por natureza a característica de interagir com o DNA, proteínas e lipídeos causando graus variados de dano e disfunção, quando produzido em demasia (VIARO; NOBRE; EVORA, 2000).

No estresse nitrosativo ocorre a produção do óxido nítrico (NO), catalisado pela proteína óxido nítrico sintetase (NOS), que é transcrita através da ativação da proteína NF- kB (XUEXIU *et al.*, 2017).

As NOSs exibem uma estrutura de dois domínios, em que há um domínio de oxigenase N-terminal contendo locais de ligação para heme, BH_4 e L-arginina e ligados pelo CaM, que se liga a um domínio redutase C-terminal que contém locais de ligação para FAD, FMN e NADPH (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Existem três isoformas da NOS, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), as quais são constitutivas e ativadas pelo aumento de cálcio intracelular, e a induzida (iNOS), cuja ativação é independente de cálcio intracelular e pouco sensível à autoinibição pelo NO (NEGRÃO R G D, 2011).

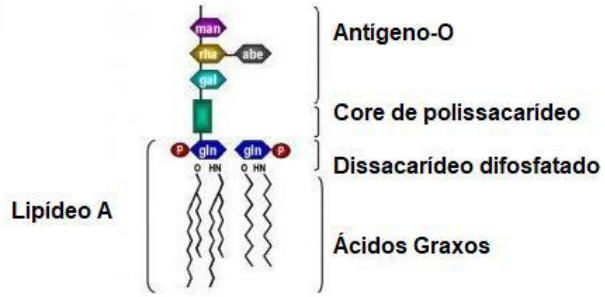
A produção de NO é importante e desejável durante o processo inflamatório, uma vez que promove vasodilatação e é essencial para atividade microbicida dos fagócitos. No entanto, sua produção excessiva pode levar a danos teciduais locais e sistêmicos, em situações mais graves (PENG *et al.*, 2012).

Alterações da iNOS podem ser observadas em modelos experimentais que cursam com a neuroinflamação. Em roedores, a inflamação sistêmica induzida por Lipopolissacarídeos (LPS), ativa p65, NF-κB e p53, aumentando a acetilação de fatores de transcrição, acarretando um aumento da nitrosilação, levando à ativação de iNOS. Desta maneira, a iNOS potencializa uma resposta inflamatória, gerando alterações metabólicas (GLEZER *et al.*, 2000). Em células de astrócitos, BV-2 estimuladas por LPS, observa-se que a neuroinflamação leva a expressão de iNOS (KIM *et al.*, 2018). Já em camundongos induzidos a isquemia cerebral por oclusão da arterial cerebral média foi possível observar um aumento na expressão de TRL4 (Receptores toll-like 4), CD14 (receptor de superfície de membrana) e um aumento nos níveis de iNOS no sangue (PENG *et al.*, 2012).

Estímulos externos, como os lipopolissacarídeos (LPS), podem ser utilizados para induzir a neuroinflamação (BATISTA *et al.*, 2019). O LPS é um componente das paredes celulares externas das bactérias gram-negativas (AN *et al.*, 2019). Embora o LPS esteja firmemente ligado na parede celular bacteriana, ele é continuamente liberado ao meio ambiente, esta liberação ocorre durante o seu crescimento, divisão celular e morte (PETSCH; ANSPACH, 2000).

A estrutura do LPS (Figura 01) é composta por três partes principais, lipídio A (hidrofóbico), oligossacarídeo central (hidrofílico) e um o antígeno O (MAGALHÃES *et al.*, 2011). O lipídeo A contém duas unidades de glucosamina com cadeias hexa-acil e dois grupos fosfato e é responsável por muitas de suas atividades biológicas, como por exemplo, a toxicidade e a estimulação de células do sistema imune (AN *et al.*, 2019).

Figura 01- Representação estrutural do LPS.



Fonte: adaptado de South Carolina School of Medicine, disponível em: https://microbeonline.com/lipopolysaccharide-lps-of-gram-negative-bacteria-characteristics-and-functions/

O mecanismo de ação do LPS ocorre pela sua associação a uma proteína ligadora de LPS, a CD14, formando assim um complexo LPS-CD14 que promove a ativação de TLR-4 (AN *et al.*, 2019). Esta ativação faz com que ocorra uma resposta inflamatória que pode ser caracterizada pela produção de citocinas como: TNF-α, IL-1, IL-6 tanto *in vivo* como *in vitro*. As citocinas pró-inflamatórias atuam como moduladores tanto na transmissão neuronal normal quanto anormal no cérebro (TYAGI *et al.*, 2008; Arias-SALVATIERRA *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013).

Na indução à neuroinflamação por LPS observa-se, em hipocampo de ratos adultos, estresse oxidativo e a apoptose neural, mediando a disfunção sináptica (MUHAMMAD *et al.*, 2019). Em córtex, observou-se a liberação de citocinas pró-inflamatórias, acentuando significativamente a expressão de p-NF-κB, TNF-α e IL-1β (XIA; YAMAGATA; KRUKOFF, 2006). Em modelo *in vitro*, com células microgliais da linhagem BV-2, observou-se um aumento da produção de citocinas inflamatórias e iNOS (SHENG *et al.*, 2011).

1.2 Sinalização e homeostase de cálcio

Dentre as modificações provocadas na célula, a utilização do LPS para induzir a neuroinflamação, pode alterar a concentração de cálcio provocando alterações na

homeostase celular (CALVO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017), prejudicando o funcionamento e até mesmo podendo provocar anormalidades na sinalização celular (YAN *et al.*, 2016).

O cálcio é a molécula de sinalização mais mutável em todos os organismos eucarióticos (BATISTIČ; KUDLA, 2012). A concentração intracelular de cálcio livre é fortemente regulada através de múltiplos mecanismos nos neurônios e alterações na concentração do cálcio possui papel crucial no controle da função neuronal normal (YAN *et al.*, 2016).

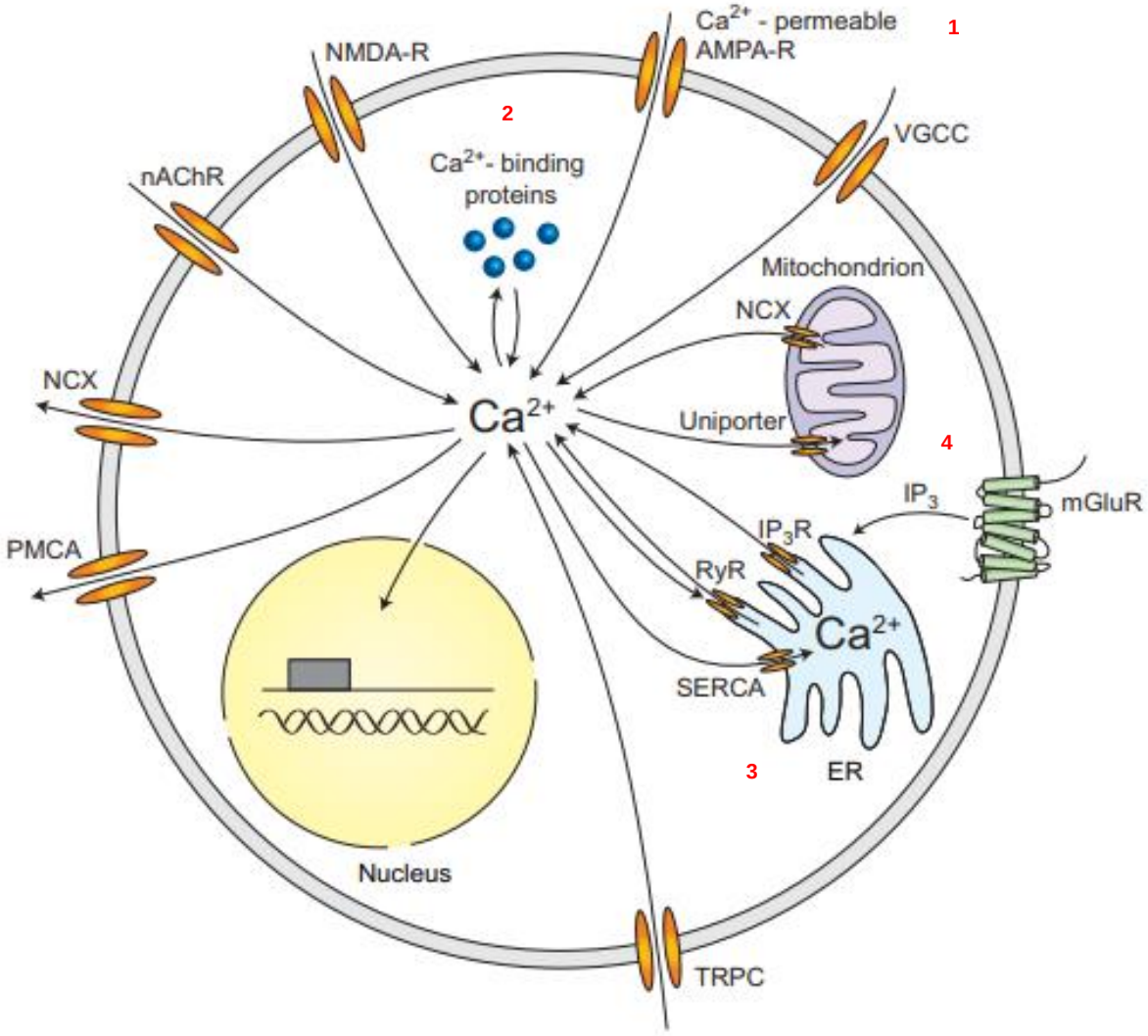
No meio intracelular o cálcio atua como segundo mensageiro, abrangendo respostas de curta duração como contração muscular e secreção de hormônios, bem como respostas de longa duração como transcrição gênica, proliferação e morte celular (ALONSO; GARCÍA-SANCHO, 2011).

Os níveis de cálcio podem mudar de forma ordenada ao longo do ciclo celular (HUMEAU *et al.*, 2018). Em geral, a concentração intracelular de cálcio livre varia muito dependendo de sua localização. No citoplasma, o cálcio, em condições de repouso é aproximadamente 10^{-7}M, 10^{4} vezes menor que cálcio no meio extracelular, aproximadamente 10^{-3}M (BURGOYNE; HAYNES, 2015). Entretanto, os níveis de cálcio na matriz nuclear e na matriz mitocondrial são maiores que do citoplasma (MURPHY; EISNER, 2010).

A natureza do sinal de cálcio, é determinado pela atividade coordenada de um conjunto de canais de cálcio, bombas, permutadores e proteínas de ligação que, orientam o destino de uma célula (STEWART; YAPA; MONTEITH, 2015). Desta forma, a homeostase deste íon depende da ação de vários componentes celulares, (Figura 02) como as proteínas ligadoras de cálcio, bombas como a Ca-ATPease (PMCA) e SERCA, os canais receptor de fosfatidil inositol (IP3R), canal unipoter mitocondrial (MCU) e o receptor de glutamato, AMPA (Alfa – amino - 3 – hidroxi – metil – 5,4 – isoxazolpropiónico) (GRIENBERGER; KONNERTH, 2012). Além disso, organelas intracelulares, conhecidas como depósitos de cálcio, podem acumular e manter uma concentração de cálcio maior que o citoplasma, os principais depósitos interno de cálcio são a mitocôndria e o retículo endoplasmático, existindo mecanismos nestas organelas que desempenham função no controle da

concentração de cálcio celular (Figura 02) (BAGUR; HAJNÓCZKY, 2017).

Figura 02- Componentes que contribuem para a homeostase do cálcio celular.1- canal receptor de glutamato AMPA. 2- Proteínas ligadoras de cálcio, como por exrmplo a NCS1. 3- RE, e sua a bomba SERCA, que participa no processo de influxo de cálcio para dentro do RE e o seu receptor IP3R, que participa no processo de efluxo de cálcio para o meio intracelular. 4- Mitocôndria, com o seu canal MCU que participa no processo de influxo de cálcio para dentro da mitocôndria.



Fonte: (GRIENBERGER; KONNERTH, 2012)

A seguir, considerando a importância da sinalização de cálcio nos processos de neuroinflamação, serão descritas estruturas/componentes, que podem auxiliar no controle e homeostase do cálcio neste contexto.

1.2.1 Proteína Neuronal Sensora de Cálcio (NCS-1)

O cálcio intracelular regula uma variedade de processos de transdução de sinal neuronal no cérebro (AUGUSTINE *et al.*, 2003). Os efeitos das alterações no cálcio neuronal são mediados principalmente por uma classe emergente de proteínas sensoras de cálcio neuronal (NCS) (BOECKEL; EHRLICH, 2018), que pertencem à superfamília EF-hand. O genoma humano codifica 14 membros da família NCS (NAKAYAMA; MONCRIEF; KRETSINGER, 1992).

As sequências de aminoácidos das proteínas NCS são altamente conservadas em humanos (BOECKEL; EHRLICH, 2018). As características comuns dessas proteínas são uma cadeia de aproximadamente 200 resíduos contendo quatro motivos EF-hand, a sequência CPXG na primeira EF-hand (NAKAYAMA; MONCRIEF; KRETSINGER, 1992), contendo 2-3 domínios funcionais de ligação ao cálcio (BOECKEL; EHRLICH, 2018).

Uma maneira melhor de descrever a NCS-1 é como um facilitador que para a rápida transdução de sinais de cálcio (SNCHEZ-GRACIA; ROMERO-POZUELO; FERRS, 2010). Seus efeitos incluem a regulação de receptores, canais iônicos e enzimas que intervêm em múltiplas funções neuronais (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019).

NCS-1 é uma importante proteína no contexto de estresse de cálcio relacionado à atividade e vulnerabilidade de neurônios em doenças neurodegenerativas, com Doença de Alzeheimer (DA), bipolaridade e autismo (BANDURA; FENG, 2019). Em geral, foi demonstrado que o NCS-1 estimula a função mitocondrial e a promoção da sobrevivência neuronal (ANGEBAULT *et al.*, 2018). Em neurônios a NCS-1 inibe sua atividade estressante de uma forma dependente de cálcio (KABBANI *et al.*, 2002).

A NCS-1 pode interagir com o IP3R, que aciona uma cascata de sinalização intracelular e modula a atividade dos canais de cálcio. Esta proteína pode regular a atividade do receptor IP3, um canal iônico de cálcio intracelular, presente no retículo endoplasmático, que é crucial na regulação da homeostase do cálcio (SÁNCHEZ; GARCÍA, 2018).

Em células saudáveis, a NCS-1 forma um complexo com IP3R1 ativando a transferência de cálcio do RE para as mitocôndrias, para promover a adequada função mitocondrial. O VDAC1, presente na membrana externa da mitocôndria, por sua vez quando ativado, possibilita a passagem de cálcio do RE para as mitocôndrias (ANGEBAUL T *et al.*, 2018), favorecendo a ativação do canal unipoter mitocondrial (MCU) (XU *et al.*, 2018) e ativação do ciclo TCA e as vias respiratórias mitocondriais (ANGEBAULT *et al.*, 2018).

Muitas funções celulares diferentes são reguladas pela NCS- 1, incluindo exocitose, neuroproteção, regeneração axonal, regulação nuclear de cálcio, estando implicado também no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BOECKEL; EHRLICH, 2018), visto que a diminuição de sua expressão, diminui a interação com o IP3R, o que pode desregular a homeostase de cálcio (NGUYEN *et al.*, 2019). Foi observado também um aumento na expressão de NCS-1 em hipocampo de ratos após o tratamento com potencial elétrico de alta tensão, aumentando a fosforilação de CaMK-II e a transcrição de BDNF, podendo então auxiliar na melhora da plasticidade (NAKAMURA *et al.*, 2017).

1.2.2 Receptor de fosfatidil inositol (IP3R)

O RE é uma das organelas que desempenha função no controle da concentração de cálcio celular (BAGUR; HAJNÓCZKY, 2017), possuindo bombas e canais que auxiliam neste controle (FEHER, 2017), como a SERCA, uma bomba pertencente as ATPases, que possui a atividade de influxo de cálcio para dentro da organela (RAHATE; BHATT; PRABHAVALKAR, 2020). E o IP3R é um canal iônico permeável ao cálcio, localizado no retículo endoplasmático, que medeia o efluxo de cálcio desta organela (ZHAO *et al.*, 2019).

A proteína IP3R pode ser subdividida em quatro regiões funcionais: uma região de ligação a IP3 compreendendo aproximadamente 600 resíduos no terminal N da proteína receptora, uma região modulatória central com locais para interação com moléculas regulatórias, uma região formadora de canal C-terminal contendo seis domínios transmembranares e uma cauda C-terminal incluindo os últimos 160 resíduos (S *et al.*, 1992). Três isoformas de IP3R foram identificados em células de

mamíferos e a isoforma predominante nos neurônios é o IP3R tipo 1 (KERKHOFS *et al.*, 2018).

A disfunção do IP3R desempenha um papel fundamental em muitas doenças neurodegenerativas, incluindo Huntington, esclerose múltipla e Doença de Alzheimer. Perturbação das funções IP3R leva a desregulação da sinalização de cálcio (Higo et al., 2010). O IP3R representa um eficaz alvo terapêutico para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, regulando a sinalização perturbada de cálcio em regiões cerebrais afetadas (EGOROVA; BEZPROZVANNY, 2018).

A liberação de cálcio do RE ocorre após estimulação por um segundo mensageiro, o 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3). O IP3 é gerado pela ativação da fosfolipase C, esta por sua vez cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato fosfolipídico em diacilglicerol (DAG) e IP3. O DAG permanece ancorado à membrana, e o IP3 é liberado no citosol. O IP3 se liga ao IP3R, levando à liberação de cálcio do RE, causando um aumento na concentração citosólica de cálcio, o que leva a uma cascata de respostas intracelulares (EGOROVA; BEZPROZVANNY, 2018).

A NCS-1 modula o IP3R aumentando a atividade do canal, essa modulação é dependente de cálcio, de modo que altos níveis de cálcio aumentam a probabilidade de abertura do canal. NCS-1 sozinha, sem IP3, não é suficiente para ativar o IP3R, mostrando que o NCS-1 atua como um modulador ao invés de agonista direto (KASRI *et al.*, 2004).

A desregulação da sinalização de cálcio neuronal resulta em distúrbios da homeostase celular, perda sináptica e disfunção, podendo levar à morte celular (KERKHOFS *et al.*, 2018). O aumento da expressão da proteína IP3R tipo 1, pode desempenhar um papel na patogênese de doenças neurodegenerativas (MENG *et al.*, 2019).

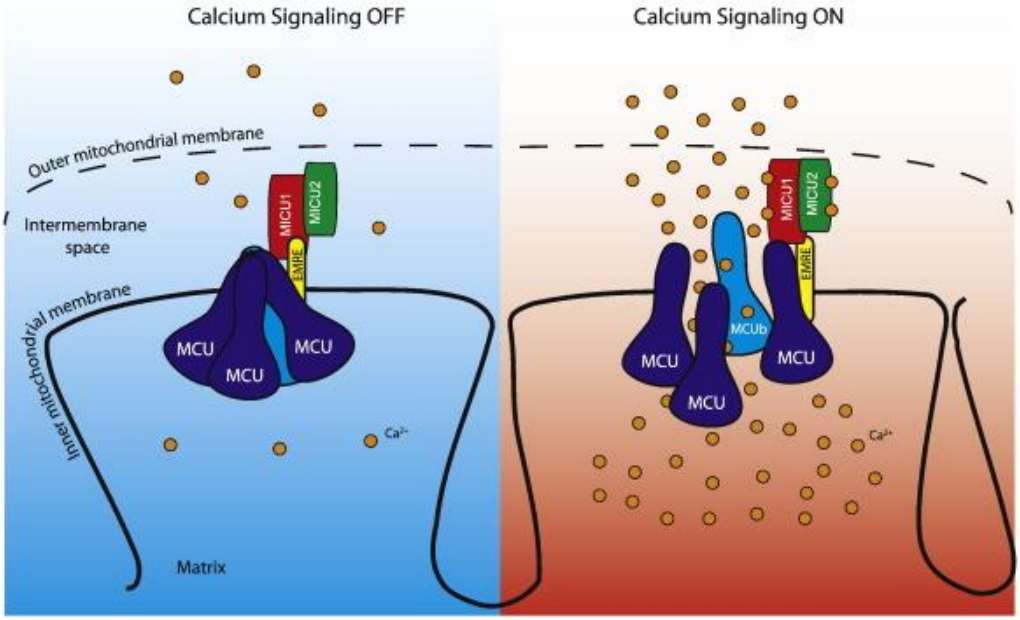
1.2.3 Canal Unipoter Mitocondrial (MCU)

O MCU é um canal presente na membrana interna da mitocôndria, encontrado em eucariotos (DE STEFANI *et al.*, 2011), que controla a captação de cálcio para a matriz mitocondrial (YAN *et al.*, 2016).

O MCU é um complexo macromolecular, denominado complexo MCU (DE STEFANI; PATRON; RIZZUTO, 2014), composto por dois domínios “coiled-coil” e dois

domínios transmembranares separados por uma pequena alça enriquecida em resíduos ácidos. As proteínas que exercem um papel regulador no canal incluem toda a família MICU's, MCUR1, MCU2 e EMRE, (figura 03) (DE STEFANI *et al.*, 2011). As subunidades MICU2 (EFHA1), MICU3 (EFHA2), MCUb (CCDC109B), MCUR1 (CCDC90A) e EMRE (Smdt1) interagem com MICU1 e formam um complexo que regula a homeostase do cálcio na mitocôndria, como observado na figura 03 (YAN *et al.*, 2016).

Figura 03- Representação esquemática do complexo MCU: em condição de repouso (esquerda) a captação mitocondrial de cálcio é controlada por um complexo multiprotéico que pode ser composto por MCU e MCUb (as subunidades formadoras de canal) junto com EMRE, MICU1 e MICU2. A sinalização de cálcio é ativada, o aumento extramitocondrial de cálcio (direita) induz uma mudança conformacional em todo o dímero que libera a inibição dependente de MICU2 e dispara o aumento mediado por MICU1 da atividade de canalização de MCU.



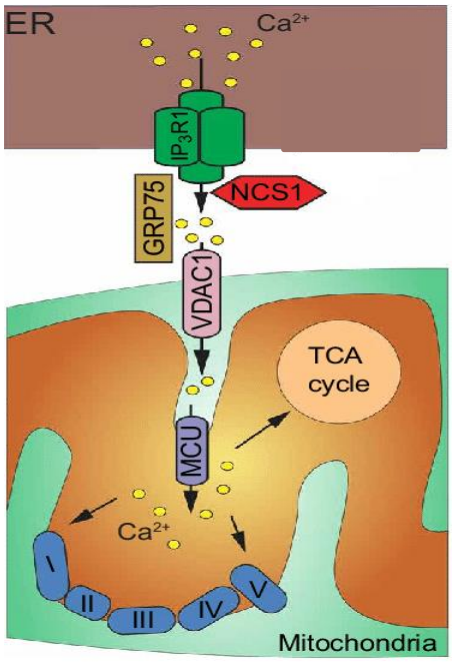
Fonte: (DE STEFANI; PATRON; RIZZUTO, 2014)

A captação de cálcio ocorre pela liberação do íon do RE, que é transportado para a mitocôndria através de canais de condutância, sendo um deles o MCU (figura 03). Esta comunicação ocorre devido a baixa afinidade entre o MCU e o cálcio (RIZZUTO *et al.*, 2012).

O IP3R possibilita a transferência de cálcio localizado na membrana do ER, modulado pela NCS-1 (KASRI *et al.*, 2004), para a mitocôndria através do canal aniônico VDAC1, localizado na membrana mitocondrial externa. A proteína Grp75 por sua vez, é uma proteína que interage fisicamente com IP3R e VDAC1, possibilitando a liberação do cálcio de uma organela para a outra em suas membranas. O influxo do cálcio para a matriz mitocondrial ocorre através da comunicação de VDAC e o MCU. Com base na modulação do IP3R pela NCS-1 (ANGEBAULT *et al.*, 2018) e na rota de transferência de cálcio IP3R- Grp75- VDAC1- MCU, estes possibilitam o eixo de regulação intracelular do cálcio do RE para a mitocôndria (XU *et al.*, 2018).

A figura 4 apresenta um esquema da transferência de cálcio do RE para a mitocôndria com a participação de três proteínas que serão avaliadas neste projeto, demostrando a modulação da atividade do receptor IP3 e regulação da homeostase de cálcio através da sinalização por NCS-1 e posterior ativação da MCU.

Figura 04 – Esquema da transferência de cálcio do RE para a mitocôndria. A NCS-1 modula o IP3R, este por sua vez ativo possibilita o efluxo de cálcio para o meio intracelular. A proteína GRP75 interage com o RE através do IP3R, e a mitocôndria, através de VDAC1, possibilitando a entrada de cálcio para dentro da desta, possibilitando influxo de cálcio para a membrana interna através do MCU.



Fonte:
Adaptado de (ANGEBAULT *et al.*, 2018)

Apesar da captação de cálcio pela mitocôndria ser um evento essencial ao bom funcionamento da célula, a captação excessiva de cálcio pelas mitocôndrias causa sobrecarga mitocondrial do íon, resultando na abertura do poro de permeabilidade transitória, por uma ação direta do cálcio, ou pela ligação de cálcio a cardiolipina (um lipídio da membrana mitocondrial), o que acarreta a produção de espécies reativas de oxigênio (MARCHI; PINTON, 2014). Esta abertura do poro de permeabilidade transitória leva ao inchaço mitocondrial, ruptura de sua membrana, e liberação de fatores pró-apoptóticos (YAN *et al.*, 2016), como citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF) (LIAO *et al.*, 2015), que podem ocasionar a apoptose (KERKHOFS *et al.*, 2018).

Em cultura de neurônios, foi observado que o aumento da expressão de MCU pode atuar de maneira benéfica, auxiliando na captação de cálcio quando tratadas com cálcio exógeno, auxiliando na homeostase do meio (CALVO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Em contrapartida, o MCU pode estar implicado em excitotoxicidade, inflamação e disfunção mitocondrial induzida por estresse oxidativo e morte celular (YAN *et al.*, 2016).

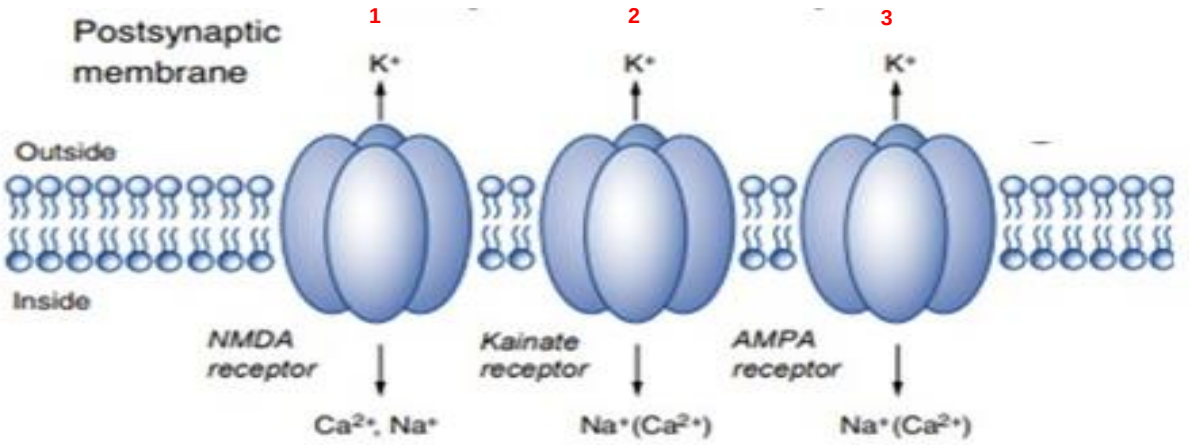
1.2.4 Alfa – amino - 3 – hidroxi – metil – 5,4 – isoxazolpropiónico (AMPA)

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro de mamíferos. Os receptores de glutamato são classificados em ionotrópicos ou metabotrópicos (CAROBREZ, 2003).

Os receptores de glutamato ionotrópicos estão envolvidos em uma variedade de processos durante o desenvolvimento das células neurais, incluindo proliferação, migração e plasticidade sináptica, bem como a modulação de mecanismos de aprendizado, memória e neurotoxicidade (BATISTIČ; KUDLA, 2012), podendo neste último caso levar a morte celular quando rompido seu estado homeostático (STEWART; YAPA; MONTEITH, 2015).

Entre os ionotrópicos (Figura 05) sabe se que os receptores NMDA medeiam sua resposta fisiológica principalmente através do influxo de cálcio extracelular, enquanto os canais receptores AMPA transportam geralmente o influxo de íons monovalentes, possibilitando também transportar cálcio (KELLER *et al.*, 1992).

Figura 05- Receptores de glutamato. 1- Receptor de glutamato NMDA. 2- Receptor de glutamato cainato. 3- Receptor de glutamato AMPA.



Fonte: (adaptado de SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004).

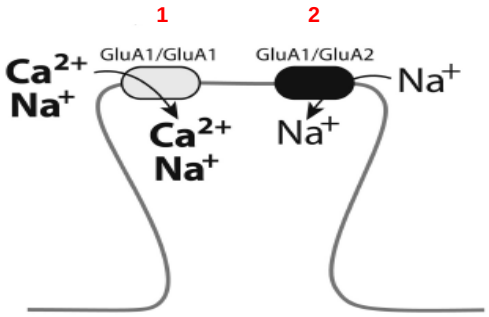
Muitas das ações deste neurotransmissor são mediadas via receptor AMPA, um canal dependente de íons, formados por subunidades GLUR1-4 (SUYAMA *et al.*, 2017), mediando rapidamente a transmissão excitatória em todo o SNC (HENEKA *et al.*, 2015), desempenhando um papel importante na plasticidade sináptica devido a permeabilidade do cálcio (SUYAMA *et al.*, 2017).

As quatro subunidades, GluR1-4, formam tetrâmeros, que podem ser homo ou heterotetrâmeros, sendo o segundo tipo mais comum, para dar origem ao núcleo funcional do canal iônico (DI BONAVENTURA *et al.*, 2017). Cada subunidade difere em sua contribuição para a cinética do canal, seletividade de íons e propriedades de tráfego de receptor, a heteromerização (GREGER; WATSON; CULL-CANDY, 2017).

Os complexos do receptor AMPA contendo as subunidades GluR1 e GluR2 estão envolvidos na transmissão relacionada à atividade sináptica em cérebros adultos. Os receptores contendo GluR2 e GluR3 mantêm um pool sináptico estável de receptores AMPA constitutivamente e são rapidamente substituídos por tipos contendo GluA1 de uma forma dependente da atividade. Os subtipos de GluA4 são expressos em estágios anteriores de desenvolvimento (LUO *et al.*, 2013).

Na região CA1 hipocampal aproximadamente 80% dos receptores AMPA em sinapses excitatórias são do tipo GluR1/2, (Figura 06) (LU *et al.*, 2009).

Figura 06- Composição do receptor de glutamato AMPA e sua permeabilidade de cálcio. 1- Subunidade GLUR1, que possibilita o influxo de sódio e cálcio. 2- Subunidade GLUR2, que possibilita o influxo de sódio.



Fonte: (EGBENYA *et al.*, 2018)

Em processos inflamatórios foi observado um aumento na expressão de mRNA e atividade da subunidade GluR1 do receptor de glutamato AMPA, em hipocampo de ratos Sprangue- Dawley, após 12 e 24 h de indução à neuroinflamação, através de uma microinjeção intracerebral de (CFA) (GUAN *et al.*, 2003).

1.3 Apoptose

O aumento no cálcio intracelular, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, causando danos no tecido através da avaliação de enzimas proteolíticas, endonucleares, lípases e outras enzimas que causam danos em vários locais da célula, levando- a à morte (MITANI *et al.*, 1993).

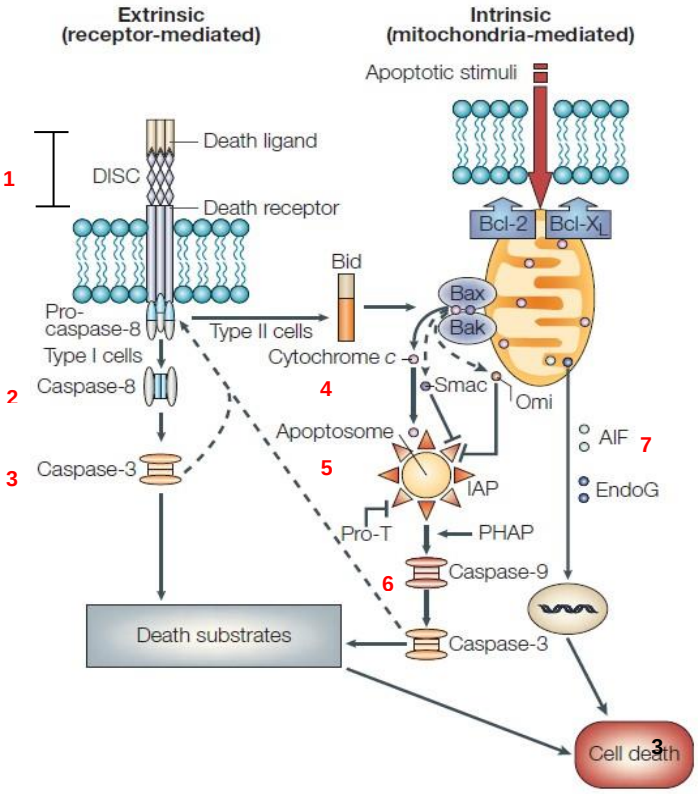
A morte celular apoptótica de neurônios e ou células da glia, pode resultar de respostas inflamatórias no SNC após alguma lesão. Isso ocorre devido a ativação da microglia e a regulação positiva significativa das citocinas proinflamatórias, TNF-α, IL-1β (TAKAHASHI *et al.*, 2008) e um aumento no estresse oxidativo (BENNETTA *et al.*, 2019) ou nitrosativo (XUEXIU *et al.*, 2017), podendo culminar em desregulação da homeostase de cálcio (HECKMANN; TUMMERS; GREEN, 2019) e consequentemente gerar morte celular (FATHI *et al.*, 2018).

A morte celular programada desempenha papéis críticos no desenvolvimento celular, homeostase, controle e progressão de processo de inflamação (HECKMANN; TUMMERS; GREEN, 2019). O processo neurodegenerativo e a lesão do sistema nervoso, desencadeiam perturbações na sinalização celular, que

levam a danos nos circuitos neuronais e nas conexões sinápicas, bem como na sinalização protetora que visa interromper o início da doença, podendo ocasionar morte celular (BAZAN, 2013).

A apoptose ocorre em uma sequência organizada de eventos, sendo iniciada por uma via de sinalização tanto extrínseca, mediada por receptores, quanto intrínseca mediada pela mitocôndria, (Figura 07), estando ambos os processos associados à atividade proteolítica e/ou nucleolítica (ANKARCRONA *et al.*, 1995; ASWETO *et al.*, 2017).

Figura 07- Vias apoptóticas – Extrínseca dependente de caspase (1- ligante de morte, 2- caspase 8 e 3- caspase 3), Intrínseca mitocondrial dependente (4- citocromo C, 5- apoptossoma, 6- caspase 9, 3- caspase 3) e independente (7- AIF) de caspase.



Fonte: **(**adaptado de: Orrenius, Zhivotovsky*et al.*, 2003).

A via extrínseca é modulada a partir da ligação de um ligante de morte (1) ao seu respectivo receptor, com formação do complexo de ativação e consequente ativação de caspase-8 (2), que posteriormente ativa caspase-3 (3) (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003 ; ASWETO *et al.*, 2017).

Essa via é ativada por receptores de morte da família do fator de necrose tumoral (TNF); dentre eles estão: TNFR1 e TNFR2 (receptores TNF), CD95 (Apo-1/Fas) e *TRAIL R1/DR4 e TRAIL R2/DR5* (FATHI *et al.*, 2018). Quando estes são estimulados por seus agonistas (FasL e TRAIL), eles conduzem à trimerização do receptor e ao recrutamento de proteínas adaptadoras com o domínio de morte e o domínio efetor de morte. Essa ligação recruta as caspases iniciadoras, como a caspase-8, e promove a formação de uma estrutura multimolecular. A oligomerização da caspase-8 induz à sua ativação por autoclivagem e, em seguida, à ativação de caspases efetoras, como a caspase-3, 6 e 7. As caspases executoras atuam em diversos substratos no citoplasma e no núcleo, resultando na morte da célula por apoptose (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013).

A via intrínseca, de forma geral, é mediada por sinais de morte, como: estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica e diminuição de fatores neurotróficos, que atuam diretamente ou indiretamente na mitocôndria (FATHI *et al.*, 2018). Em resposta aos estímulos apoptóticos a mitocôndria libera diversas proteínas de seu espaço intermembranoso para o citoplasma que incluem citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF) e endonuclease G (OFFENBURGER; JONGSMA; GARTNER, 2017).

Na via intrínseca, o citocromo C (4) liberado associa-se com Apaf-1 e pro-caspase-9, na presença de ATP ou dATP, formando um largo complexo protéico denominado apoptossoma (5), que resulta no recrutamento da pro-caspase-9, seguida da ativação da caspase-9 (6), que leva a ativação da pro-caspase-3 a qual cliva proteínas em seu trajeto, levando a apoptose (LI *et al.*, 1997; FATHI *et al.*, 2018).

O AIF (7), uma flavoproteína intermembranar mitocondrial importante, que possui o gene conhecido como AIFM1 e PCDC8, foi mapeado para a região A6 do cromossomo X em camundongos e Xq25-26 região em humanos (DAUGAS *et al.*, 2000). A transcrição e tradução do gene codificado pelo núcleo origina um precursor de 67 kDa, com resíduos 1-613 (1-612 em camundongos), contendo a sequência principal mitocondrial N terminal (MLS), dois núcleos sequências principais (NLS), e a ligação NAD e FAD(SUSIN; LORENZO; ZAMZAMI, 1999).

O precursor se encontra nas mitocôndrias apenas em uma forma nativa, o que significa que o dobramento no citoplasma é prevenido ou retardado. Quando AIF se encontra no citoplasma pode ser considerado apoptogênico independentemente se o FAD está ligado ou não (SUSIN; LORENZO; ZAMZAMI, 1999).

O AIF está implicado em processos diversos, que incluem manutenção da função da cadeia de transporte de elétrons, regulação reativa de espécies de oxigênio, morte celular e neurodegeneração. Na lesão cerebral aguda, o AIF, independente de caspase, adquire um papel pró-morte após a sua translocação das mitocôndrias para o núcleo, onde inicia a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA em larga escala (POLSTER, 2013).

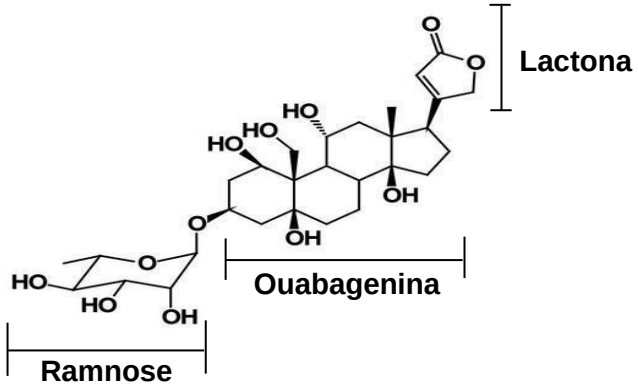
O processo encerra-se com eventos morfológicos distintos, ocorrendo a condensação nuclear e citoplasmática, seguindo com o rompimento em fragmentos delimitados pela membrana, conhecidos como corpos apoptóticos, que são engolfados rapidamente pelas células vizinhas ou macrófagos (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003; OFFENBURGER; JONGSMA; GARTNER, 2017).

1.4 Ouabaína (OUA)

A neuroinflamação está associada a doenças neurológicas e neurodegenerativas (GONZÁLEZ-SCARANO; BALTUCH, 1999; AGUIAR *et al.*, 2010). Desta forma, a comunidade científica se empenha na procura de fármacos com possíveis aplicações terapêuticas nos diversos processos neuroinflamatórios. Neste contexto, este estudo propõe a utilização da OUA.

A OUA é um esteróide cardiotônico, derivado da casca do ouabaio (*Acokantheraouabaio*) e das sementes do estrofanto (*Strophantusgratus*), que pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais (BLAUSTEIN, 1993). A estrutura química da OUA compreende uma ramnose, uma ouabagenina e uma lactona, como é possível observar na Figura 08 (HENEKA *et al.*, 2015).

Figura 08- Estrutura química da ouabaína. Composta po lactona, ramnose e ouabagenina.

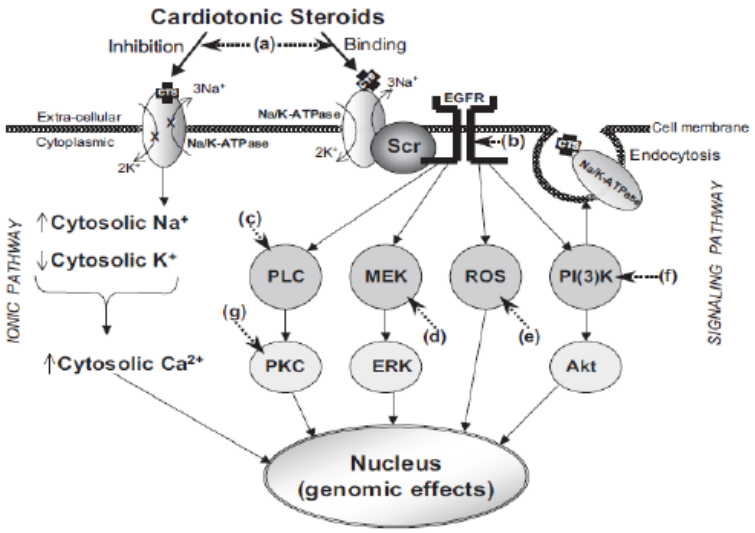


Fonte: **(**adaptado de: Orrenius, Zhivotovsky*et al.*, 2003).

Os esteróides cardiotônicos são amplamente usados em casos de insuficiências cardíacas congestiva, sendo capazes de inibir a Na,K-ATPase (CALVO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017), gerando um aumento intracelular de íons Na^+, provocando uma perda do gradiente de concentração. O trocador de sódio/cálcio por sua vez reduz a a sua atividade, não possibilitando o efluxo de cálcio para o meio extracelular, aumentando a concentração intracelular do cálcio e consequentemente favorecendo ao aumento da contractilidade cardíaca (FÜRSTENWERTH, 2010).

Ainda que a OUA possua uma clássica ação relacionada ao efeito inibidor sobre o transporte ativo de Na^+ e de K^+ realizado pela enzima Na, K-ATPase (HENEKA *et al.*, 2015), ela em baixas concentrações, pode desencadear uma cascata de sinalização intracelular capaz de afetar o metabolismo celular em níveis de regulação da expressão gênica, tanto da própria Na,K-ATPase quanto de proteínas-chaves que controlam o mecanismo do ciclo celular, esses efeitos são altamente dependentes da concentração de OUA como também do tipo celular (Figura 09) (XIE e ASKARI, 2001).

Figura 09- Via iônica *versus* vias de sinalização para efeitos de esteroides cardiotônicos. (a) imunoneutralização ou neutralização farmacológica, (b) interferência com a ativação de Src e transativação de EGFR, (c) ativação de PLC, (d) ativação de MEK, (E) geração ou eliminação de ROS, (f) ativação de PI3K (g) via sinalização de PKC. Ativação de ERK e Akt também são possíveis.



Fonte: (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; XIE; LI; XIE, 2013).

Alguns trabalhos demonstarm o efeito de diferentes esteróides cardiotônicos no SNC (ORELLANA *et al.*, 2016), destacando-se a OUA (HENEKA *et al.*, 2015).

O tratamento com OUA promove uma diminuição da expressão dos receptores de glutamato, NMDA, indicando uma possível neuroproteção mediada por este digitálico (GOLDEN; MARTIN, 2006). Uma vez que podem ser induzidos efeitos regulatórios biológicos, como a proliferação celular, hipertrofia (XIE; LI; XIE, 2013) e plasticidade (ORELLANA *et al.*, 2018).

Receptores NMDA coprecipitam com a Na, K- ATPase, indicando uma interação entre elas. Observado em cultura celular de hipocampo de ratos, que os receptores NMDA e as subunidades catalíticas da Na, K- ATPase, α_1 e α_3, existem em um mesmo complexo proteico e que a OUA em concentração nanomolar reduz de forma consistente a resposta do cálcio ao NMDA. A resposta NMDA não está associada à internalização do receptor ou a alterações em seu estado de fosforilação de Src e sim proteína- proteína. Este estudo sugere que a ligação da OUA a uma fração de moléculas de Na, K- ATPase, que se agrupam com os

receptores NMDA, por meio de um efeito conformacional dos receptores NMDA, causa redução moderada, mas consistente da resposta do receptor NMDA na ativação sináptica (AKKURATOV *et al.*, 2020).

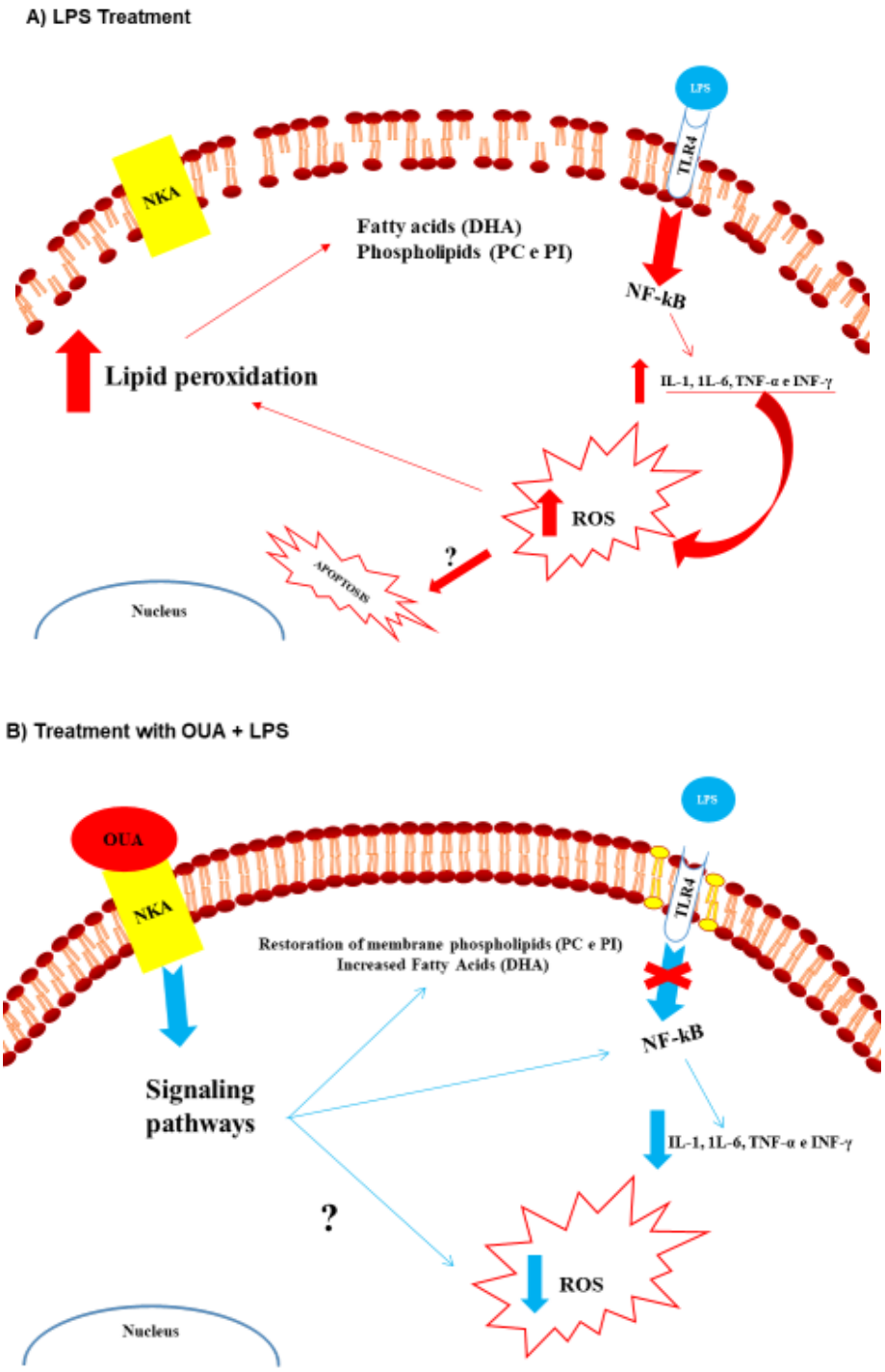
A injeção intra-hipocampal de OUA, em concentrações nanomolares, ativou a via de sinalização Wnt/β-Catenina e aumentou os níveis de CREB/BDNF e NFκB, levando a melhora no desempenho da memória espacial de ratos Wistar (ORELLANA *et al.*, 2018).

Estudos do nosso grupo de pesquisa, utilizando OUA administrada (via i.p) contra os efeitos da neuroinflamação provocada pelo LPS observou que, em baixa concentração, não houve inibição na atividade da enzima Na,K-ATPase. Entretanto alterações bioquímicas foram observadas, como a ativação da via de sinalização da NFkB, que levou ao aumento de citocinas próinflamatórias e de iNOS (mRNA). A OUA foi capaz de reverter os efeitos do LPS no aumento da citocina TNF-α e de iNOS (KINOSHITA *et al.*, 2014).

Outros trabalhos também do nosso grupo de pesquisa, mostraram que o tratamento com OUA provoca modulação da composição de fosfolipídios e gangliosídeos totais de membrana de hipocampo de ratos (GARCIA *et al.*, 2015), bem como a atenuação de estresse oxidativo em cerebelo de ratos induzidos a neuroinflamação por LPS (GARCIA *et al.*, 2017). Observado também que o LPS causa dano à célula, aumentando a peroxidação lipídica no hipocampo e o pré-tratamento com OUA atenua este efeito (Figura 10- A e B) (GARCIA *et al.*, 2019).

Em conjunto, estes estudos Indicam a OUA, em baixas concentrações, como um possível agente neuroprotetor no modelo de neuroinflamação mediado pelo LPS.

Figura 10: Esquema dos principais efeitos modulados de OUA e LPS no hipocampo de ratos. Tratamento A: Efeitos causados por LPS, levando ao aumento de ROS e diminuição de fosfolipídios da membrana. Tratamento B: Efeitos causados pelo tratamento com OUA em ratos induzidos a neuroinflamação de LPS, causando redução de ROS e restaurando fosfolipídios de membrana.



Fonte: (GARCIA *et al.*, 2019).

Outro dado interessante indica que a OUA reverte o aumento da atividade da SERCA, bomba responsável pelo influxo de cálcio para dentro do RE (RAHATE; BHATT; PRABHAVALKAR, 2020), no modelo de neuroinflamação por LPS (GARCIA, 2020), sugerindo que a OUA possa modular os efeitos do LPS atuando no controle do cálcio.

Assim, faz- se necessário o estudo de fármacos que possam atenuar processos inflamatórios no SNC, auxiliando além de processos de estresse oxidativo e produção de citocinas proinflamatórias, na sinalização e homeostase de cálcio, sendo a OUA um fármaco promissor.

2. JUSTIFICATIVA

A neuroinflamação é um fator importante em muitas doenças do SNC e acredita-se que a melhora no processo inflamatório reduz a severidade e melhora os resultados na maioria dos casos (T.HOPPER *et al.*, 2012).

Considerando-se que a neuroinflamação induzida por LPS, pode alterar a concentração de cálcio, provocando alterações na homeostase celular (CALVO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017), e que estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (LABIC) demostraram a capacidade da OUA, quando administrada em concentrações nanomolares, de proteger o dano na membrana celular da inflamação induzida pelo LPS (GARCIA *et al.*, 2019), além de observar que a OUA reverte o aumento da atividade da SERCA, importante componente presente na membrana do RE, que auxilia no controle da homeostase do cálcio, no modelo de neuroinflamação por LPS (GARCIA, 2020), propôs-se então avaliar o efeito da OUA sobre componentes da sinalização e homeostase do cálcio em modelo de neuroinflamação induzida por LPS, a fim de esclarecer os possíveis mecanismos de ação da OUA que possam justificar seus efeitos protetores na célula.

Desta forma, o estudo dos mecanismos de ação da OUA em concentrações nanomolares em processos inflamatórios induzidos por LPS, torna-se interessante, pois apresenta possibilidade da sua utilização como fármaco empregado na neuroproteção em processos de neuroinflamação.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da OUA em componentes que participam da sinalização e homeostase do cálcio em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação por LPS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estresse nitrosativo, através da quantificação da expressão de iNOS,;
- Quantificar a expressão de proteínas associadas à sinalização e homeostase de cálcio: NCS1, IP3R, MCU e GLUR1;
- Quantificar a expressão de AIF, para avaliar a apoptose através da via de morte intrínseca mitocondrial.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com cento e vinte dias de vida, procedente do biotério da Universidade Federal de São Paulo (USP), onde foi realizado o tratamento dos animais. As amostras utilizadas neste projeto foram cedidas pelo Professor Doutor Cristóforo Scavone, responsável pelo Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

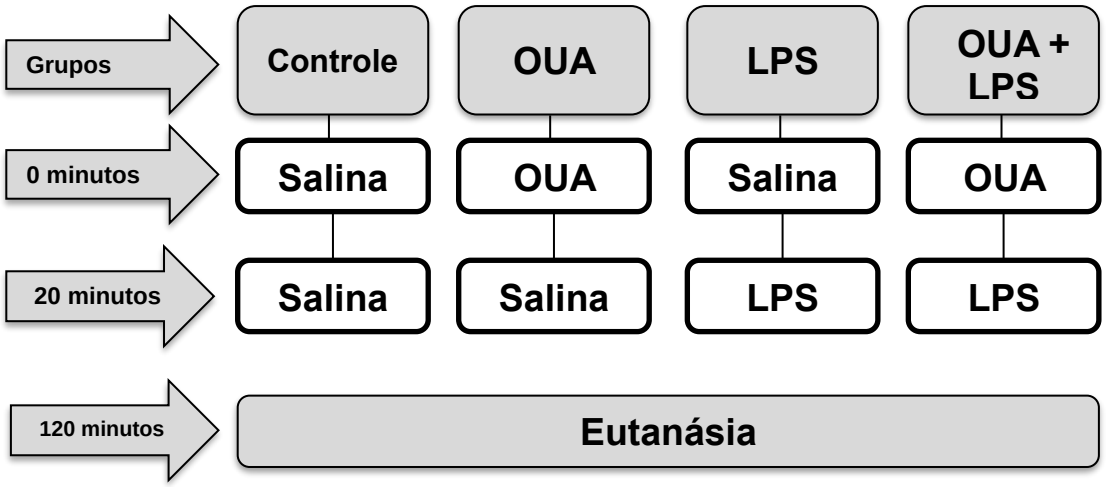
Todos os experimentos contidos nesse projeto seguiram as normas dos Princípios Éticos de experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética em experimentação animal (CEEA), protocolo número 77 (anexo 1). Cuidados foram adotados para se evitar sofrimento desnecessário, bem como para minimizar o número de animais utilizados.

4. 2 Tratamento com OUA e LPS

Os ratos foram divididos em quatro grupos distintos, denominados controle, OUA, LPS e OUA + LPS.

Os ratos receberam uma administração por via intraperitoneal (i.p) de salina - 0,9 % ou OUA (Sigma, 03125) - 1,8 µg.Kg $^{-1}$, 20 minutos depois uma segunda administração (i.p) de salina – 0,9% ou LPS (Escherichia Coli 0111:B4 Sigma#L-2630)- 200 µg.Kg $^{-1}$), como na figura 11.

Figura 11- Divisão dos grupos.



Após 2 horas da administração do LPS os animais foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados em solução fria de tampão-fosfato (PBS). Os hipocampos foram dissecados sobre uma placa gelada e imersos em nitrogênio líquido. Os tecidos foram colocados em eppendorfs em uma caixa com gelo seco e os mesmos foram transportados até a Universidade Federal de são João Del Rei – Campus Dona Lindu. Os hipocampos foram estocados a -80°C até a realização dos experimentos.

4. 3 Preparação de amostra

Para a realização dos experimentos as amostras de hipocampo foram processadas para obtenção de um homogenato. Inicialmente homogeneizou-se os hipocampos em um agitador mecânico do tipo potter modelo CT-136 (Cientec®) em 2 mL de tampão de preparação contendo 10 mM Tris-HCl pH7.4, 0,32M Sacarose, 0,5mM EDTA e 1mM $MgCl_2$ e 10% de coquetel de inibidores de protease (AEBSF 2 mM, aprotinina 0,3 µM, bestatina 116 µM, E-64 14 µM, leupeptina 1 uM, EDTA 1µM) (sigma cód. P2714), em seguida as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C.

4. 4 Determinação de proteínas

As concentrações das proteínas do homogenato foram determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), em leitura na absorbância de 595 nm, utilizando soro albumino bovino como padrão.

4. 5 Análises da expressão das proteínas por Western Blotting

As amostras foram preparadas para corrida em um gel de eletroforese e as concentrações para as respectivas proteínas, além da concentração do gel estão descritas no quadro 01. Cada amostra foi diluída em água MiliQ ultrapura e tampão de amostra (Tris- HCl 0,125mM [pH=6,8], Azul de Bromofenol 0,004%, 2-Mercaptoetanol 10%, Glicerol 20%, e SDS 4%) para uma concentração fixa de proteína.

Quadro 01- Concentração das proteínas e do gel de corrida da eletroforese.

Proteína	Código anticorpo	[ ] da proteína	[ ] do gel
AIF	SC13116	20 µg	12,50%
GLUR 1	AB1504	30 µg	10,00%
IP3R	SC271197	30 µg	10,00%
iNOS	SC8310	30 µg	12,50%
MCU	SC515930	30 µg	10,00%
NCS-1	SC13037	30 µg	12,50%

O processo de eletroforese ocorreu a 120 V, por aproximadamente 3 horas. A transferência para a membrana de nitrocelulose foi realizada a 15 V por 60 minutos, em sistema semi-seco e a membrana foi bloqueada por 1hora em leite 5% m/v.

A membrana foi então incubada "*overnight*" a 4ºC, com anticorpo primário AIF (57 kDa 1:250), GLUR-1 (106 kDa, 1:1000), IP3R (332 kDa, 1:200), iNOS (106 kDa 1:200), MCU (35 kDa 1:200), NCS1 (21 kDa 1:200) e o controle actina (43 kDa 1:250 – SC 81178). A incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-mouse -SC516102 e anti- rabbit – SC2357; 1:2000), foi realizada por 2 horas. Todos os anticorpos são da Santa Cruz (Biotechnology, USA), exceto o anticorpo para GLUR1 do fabricante Millipore.

A expressão das proteínas forai visualizada por método de quimioluminescência utilizando-se uma mistura equimolar de duas soluções (Solução 1: Tris 100mM [pH=8,5], Luminol 2,5mM e ácido p-cumárico 0,396mM; Solução 2: Tris 100mM [pH=8,5] e H_2O_2 0,06%). Após a exposição à mistura, a membrana foi revelada pelo fotodocumentador (L-Pix Cheni Molecular Imaging - Loccus).

As bandas imunorreativas foram quantificadas por densitometria utilizando o

programa Image J, (NationalInstituteof Health, USA). Os resultados foram expressos como a relação AIF/ beta actina, GLUR-1/ beta actina, iNOS/ beta actina, IP3R/ beta actina, MCU/ beta actina e NCS1/ beta actina, em unidades de densidade relativas.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Graph Pad Prism 5. Para a avaliação da distribuição dos dados foi utilizado o teste de normalidade Kolmogorov Sminov. Os dados que apresentaram distribuição normal, proteínas NCS-1, IP3R, MCU e AIF, foram avaliados por testes estatísticos paramétricos. Para a comparação dos grupos foi utilizado o teste ANOVA de uma via e o pós teste de Tukey. Os dados que apresentaram distribuição não paramétrica, proteínas GLUR1, e iNOS, foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunns. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ / intervalo de confiança de 95%, Os resultados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM), para os dados paramétricos ou expressos como mediana (Q1 [quartil 1; 25%]; Q3 [quartil 3; 75%]), para dados não paramétricos.

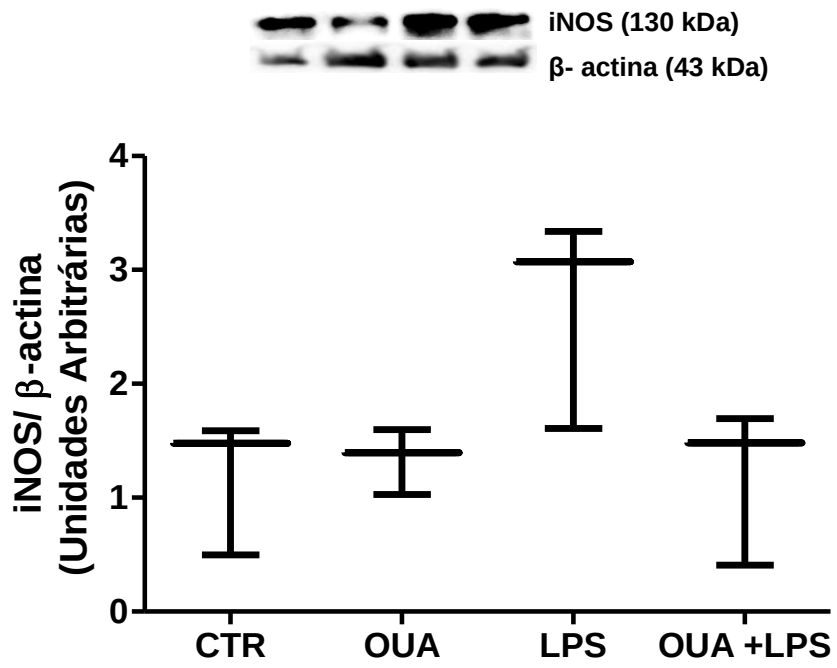
.

5. RESULTADOS

5.1.1 Avaliação da expressão de iNOS

A proteína iNOS, catalisa o NO na presença de processo inflamatório. Nossos resultados não indicaram diferença entre os grupos, para a expressão desta proteína iNOS. Os valores encontrados foram (n = 3): Controle 1,2 (Q1 0,5; Q3 1,6); OUA 1,3 (Q1 1,0; Q3 1,6); LPS 2,7(Q1 1,6; Q3 3,3) e OUA + LPS 1,2 (Q1 0,4; Q3 1,7). p = 0,071 (Fig. 11).

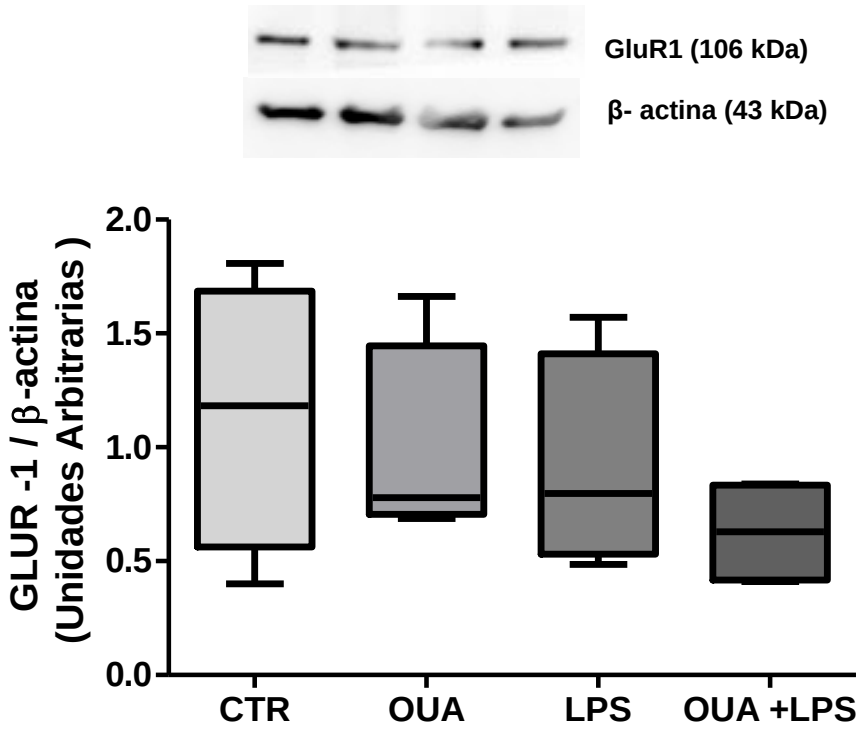
Figura 12. Efeito da OUA na expressão de iNOS em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS. Dados representados como mediana (Q1 [quartil 1; 25%]; Q3 [quartil 3; 75%]), p> 0,05 no teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, n = 3.



5.1.2 Avaliação da expressão de GLUR1

Para a expressão da proteína GLUR1, componente do receptor de glutamato AMPA observa-se que não houve diferença intergrupos. Os valores encontrados foram (n = 4): Controle 1,2 (Q1 0,6; Q3 1,7); OUA 0,8 (Q1 0,7; Q3 1,4); LPS 0,8(Q1 0,5; Q3 1,4) e OUA + LPS 0,6 (Q1 0,4; Q3 0,8). p = 0,6 (Fig. 16).

Figura 13. Efeito da OUA na expressão de GLUR1 em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação por LPS. Dados representados como mediana (Q1 [quartil 1; 25%]; Q3 [quartil 3; 75%]), p> 0,05 no teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, n = 4.

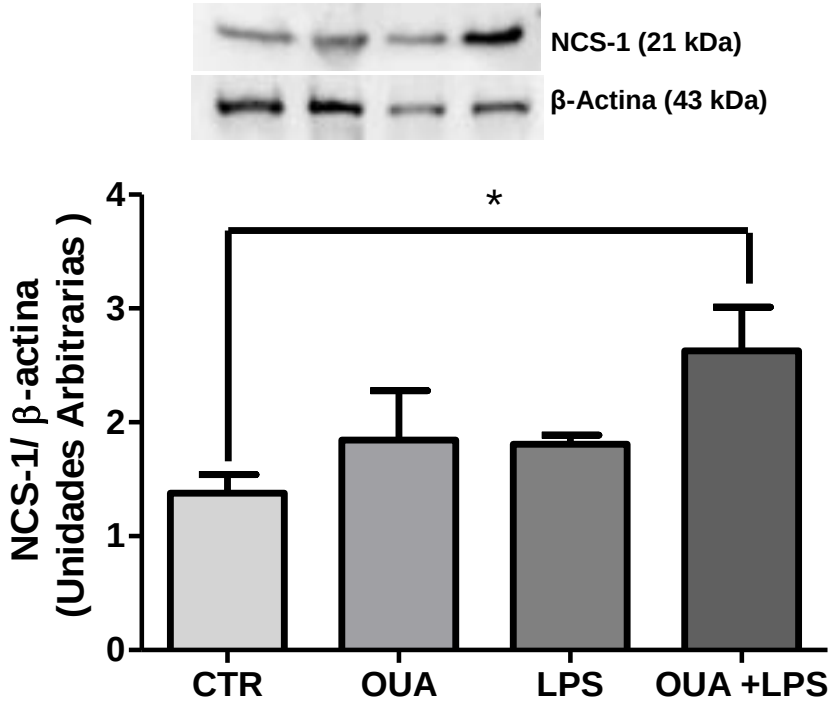


5.1.3 Avaliação da expressão de NCS-1

A expressão da próteina sensora de cálcio, NCS-1, apresentou diferença na comparação intergrupos. Houve um aumento de 90% na expressão desta proteína no grupo OUA + LPS em relação ao grupo controle. Contudo, o tratamento isolado com OUA ou LPS não provocou alteração na expressão desta proteína quando comparados ao grupo controle.

Os valores encontrados foram: (n = 5): Controle 1,38 ± 0,16, OUA 1,85 ± 0,43, LPS 1,81 ± 0,07 e OUA + LPS 2,63 ± 0,38. P= 0,064 (Fig. 12).

Figura 14. Efeito da OUA na expressão de NCS-1 em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS. Dados representados como média ± EPM, *p< 0,05 no teste de ANOVA com pós-teste de Tukey, n = 5.

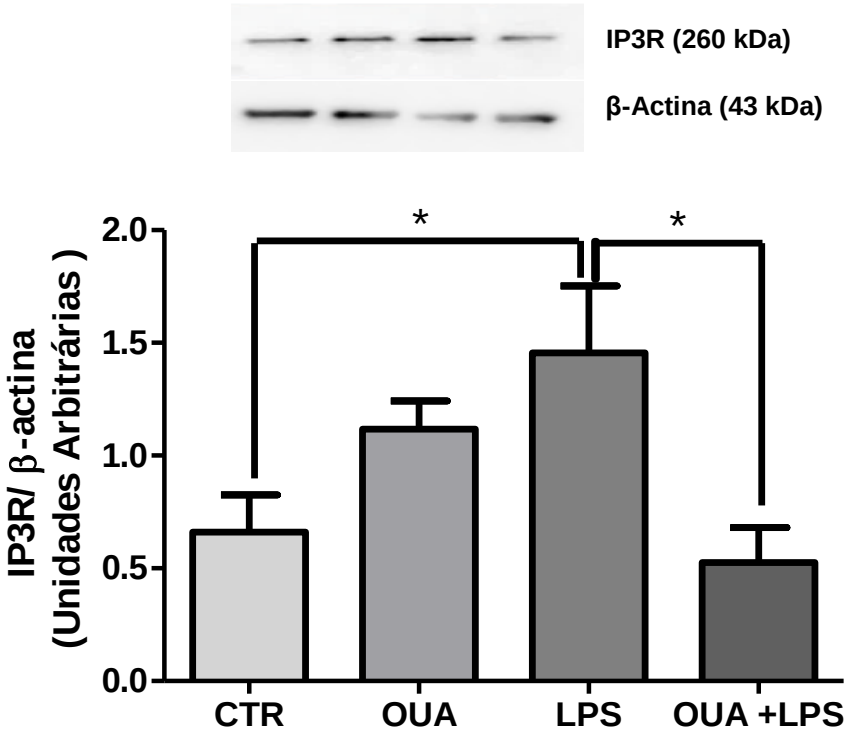


5.1.4 Avaliação da expressão de IP3R

O IP3R é um componente importante para o controle do cálcio intracelular. Nossos resultados inicam diferenças expressivas na comparação intergrupos. Houve um aumento de 120% na expressão de IP3R no grupo LPS em relação ao grupo controle e uma diminuição de 64% na expressão desta proteína do grupo OUA + LPS em relação ao grupo LPS. O pré-tratamento com OUA não provocou alteração em relação ao grupo controle.

Os valores encontrados foram (n = 5): Controle 0,66 ± 0,2, OUA 1,11 ± 0,1, LPS 1,46 ± 0,3 e OUA + LPS 0,53 ± 0,1. P= 0,015 (Fig. 13).

Figura 15. Efeito da OUA na expressão de IP3R em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação com LPS. Dados representados como média ± EPM, *p< 0,05 teste de ANOVA com pós-teste de Tukey, n = 5.

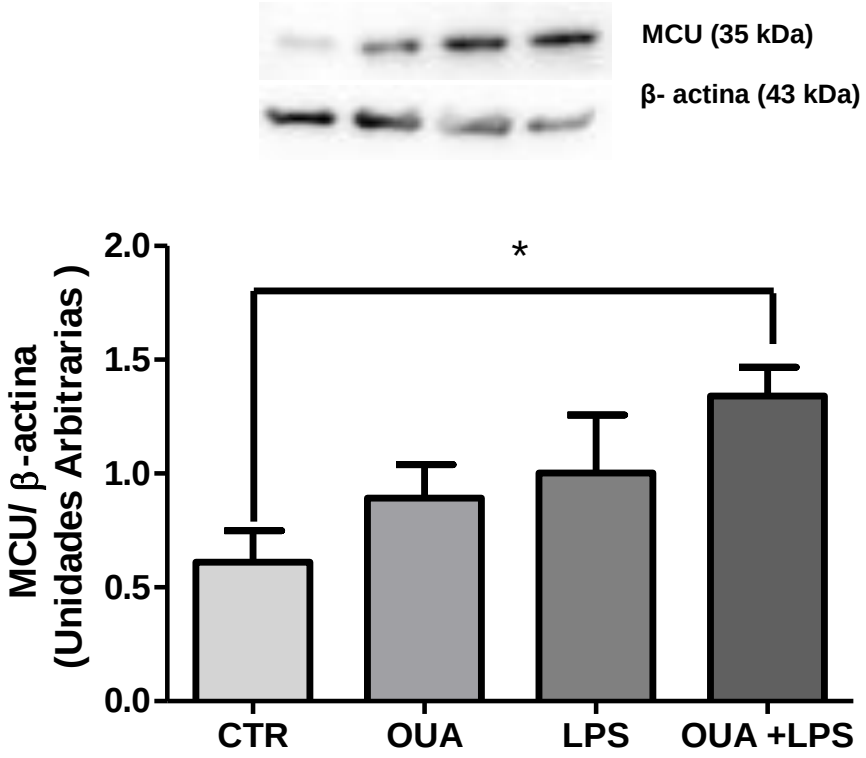


5.1.5 Avaliação da expressão de MCU

Avaliando a expressão do canal MCU, presente na mitocôndria é possível observar diferença na comparação intergrupos. Houve um aumento de 120% na expressão da proteína MCU no grupo OUA + LPS em relação ao grupo controle. O tratamento isolado com OUA ou LPS não provocou alteração na expressão desta proteína quando comparados ao grupo controle.

Os valores encontrados foram: (n = 5): Controle 0,61 ± 0,1, OUA 0,89 ± 0,1, LPS 1,00 ± 0,3 e OUA + LPS 1,34 ± 0,1. P= 0,060 (Fig. 14).

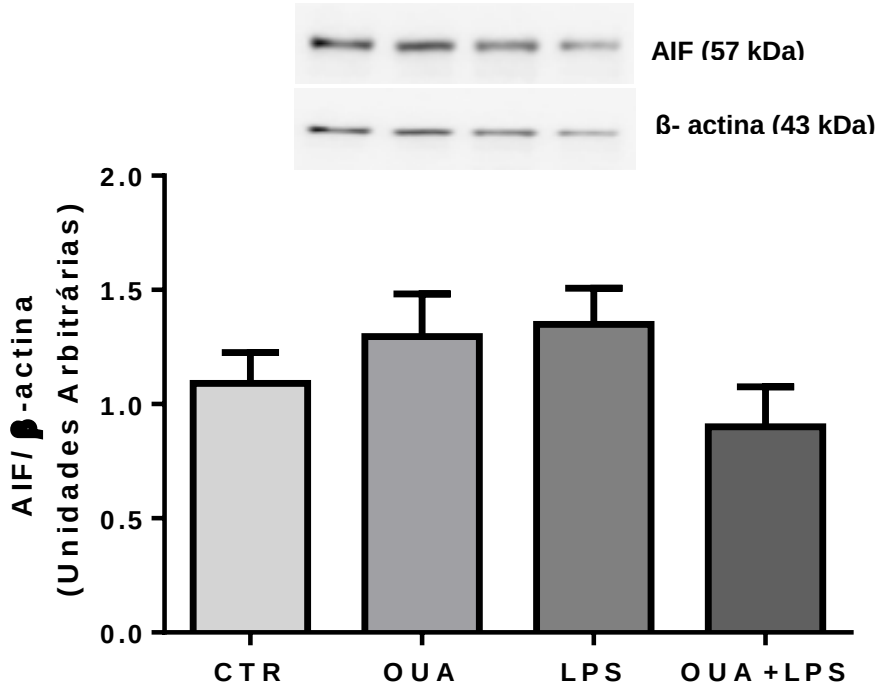
Figura 16. Efeito da OUA na expressão de MCU em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação por LPS. Dados representados como média ± EPM, p> 0,05 no teste de ANOVA com pós-teste de Tukey, n = 5.



5.1.6 Avaliação da expressão de AIF

Na comparação intergrupos para a expressão da proteína AIF, observa- se que não há diferença entre os grupos avaliados. Os valores encontrados foram: (n = 7): Controle 1,11 ± 0,1 OUA 1,33 ± 0,1, LPS 1,77 ± 0,4 e OUA + LPS 0,81 ± 0,1. p = 0,08 (Fig. 15). Uma amostra de cada grupo, de um mesmo experimento, foi excluída, pois apresentou um outlier que levou à variabilidade diferente dos grupos e impossibilitaria a realização do ANOVA.

Figura 17. Efeito da OUA na expressão de AIF em hipocampo de ratos induzidos à neuroinflamação por LPS. Dados representados como média ± EPM, p> 0,05, no teste de ANOVA com pós-teste deTukey n = 7.



6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas, em hipocampo de ratos tratados com OUA e induzidos à neuroinflamação por LPS, a expressão de proteínas que compõem vias e estruturas que são importantes para o controle dos níveis de cálcio citosólico e apoptose. Desta forma, foi possível observar alterações que se manifestaram de forma diferente entre o grupo LPS e o grupo OUA+LPS.

Primeiramente foi avaliada a expressão da proteína iNOS, com o objetivo de inferir sobre os possíveis danos nitrosativos causados pelo modelo de indução da neuroinflamação por LPS. Vários trabalhos indicam aumento desta proteína em processos neuroinflamatórios induzidos por LPS (LLOYD; MIRON, 2019), considerando tempos de indução que variam de 2 a 4 horas após a exposição (BRISTOT *et al.*, 2019; MHATRE V. HO, JI-ANN LEE, 2012). Após a indução, iNOS pode ser ativa por 20 horas conseguindo sintetizar NO em concentrações nanomolares, 1000 vezes maior que cNOS (MCMILLAN *et al.*, 2000). A indução da iNOS é responsável pelas propriedades citotóxicas do NO (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Corroborando este estudo, Kinoshita et al (2014), utilizando o mesmo modelo experimental deste estudo, observou aumento na expressão do RNAm para iNOS (KINOSHITA *et al.*, 2014). Entretanto, em nosso estudo não foi possível observar alterações na expressão de iNOS em nenhum dos grupos. Não é possível excluir limitações quanto ao pequeno tamanho amostral que pode ter reduzido a força da análise estatística e, além disso, o tempo de indução da neuroinflamação (2h) pode ter sido insuficiente para que o RNAm pudesse acarretar de maneira efetiva a tradução da proteína e o aumento da sua expressão.

Iniciando a investigação sobre a sinalização e homeostase do cálcio no modelo de neuroinflamação tratado por OUA, analisou-se a expressão da proteína GLUR1, componente do receptor de glutamato AMPA, com o objetivo de investigar alterações na composição deste receptor que pudessem modificar a sua condutância ao cálcio e possibilitar mudanças na sinalização e homeostase deste íon através da membrana celular.

Em estudo com hipocampo de ratos foi observado que o LPS, aumenta a concentração de cálcio citosólico e promove a morte em cultura neuronal (CALVO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017), podendo este cálcio ser transportado por algum dos receptores de glutamato (SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004).

Ao analisar duas subunidades do receptor de glutamato AMPA, GluR1 em córtex e GluR2, na membrana plasmática de núcleos accumbens (NAc) de ratos induzidos a neuroinflamação através do LPS, observou que os níveis totais destas proteínas não foram afetadas pelo LPS (SEKIO; SEKI, 2015).

Em cultura de astrócitos endoteliais de cérebro de ratos, induzidos a neuroinflamação por LPS e tratados com OUA, foi possível observar que a OUA restaura filamentos de actina, diminui a produção de interleucinas e que ela não atua na atenuação da entrada de cálcio através da membrana celular, mas foi observado esta atenuação nos estoques de cálcio como o RE, para auxiliar na homeostase (FORSHAMMAR *et al.*, 2011).

Em hipocampo de ratos, é possível observar que esta subunidade de AMPA, GluR1, pode desempenhar um papel importante na homeostase de cálcio, contribuindo para controlar o influxo deste íon (ZHOU *et al.*, 2009). Em cultura celular de neurônios de camundongos, observou-se um aumento nos níveis de GluR1, sugerindo que este pode estar possibilitando um aumento de cálcio intracelular, quando estas células foram induzidas a neuroinflamação através de TNF – α exógeno (OLMOS; LLADO, 2014).

Em nosso estudo não foi possível observar alterações na expressão de GLUR1, em nenhum dos grupos, sugerindo que os tratamentos não foram capazes de modificar a entrada de cálcio para o meio intracelular, através da subunidade GluR1, do receptor AMPA. Entretanto, deve se considerar o tempo de indução da neuroinlfamação (2h), que pode ter sido insuficiente para acarretar alteração na expressão da proteína.

Além disso, sabe-se que receptores AMPA podem ser internalizados em resposta a diversos estímulos extracelulares (CARROLL *et al.*, 2001) e a quantificação neste estudo foi realizada em preparação de extrato total e não em preparação de membrana. Sendo assim, não se pode descartar a possibilidade de modulação na participação deste receptor na entrada de cálcio pelos tratamentos aplicados, pois pode haver diferenças na inserção deste receptor na membrana plasmática ou pode haver alterações na atividade deste receptor (EHLERS *et al.*, 2007).

Também seria interessante analisar a proporção da subunidade GluR1 em relação à GluR2 para investigar possíveis aumentos da subunidade GluR1 em relação à GluR2, o que permitiria maior entrada de cálcio na célula (EGBENYA *et al.*,

2018).

Em seguida foram avaliadas a expressão de proteínas que fazem parte do controle de cálcio citosólico (YAN *et al.*, 2016). As proteínas sensoras de cálcio, como a NCS-1 estão envolvidas em uma ampla variedade de funções neuronais, regulando a concentração de cálcio intracelular, auxiliando a captação de cálcio por receptores e canais, contribuindo com a homeostase e favorecendo a sobrevivência celular (BURGOYNE; HAYNES, 2015).

Os resultados deste trabalho demostram que a OUA e o LPS aplicados isoladamente não foram capazes de alterar a expressão de NCS-1. Entretanto, quando aplicados em conjunto (grupo OUA + LPS) observa-se um aumento significativo na expressão de NCS-1.

A NCS-1 é um fator promotor de sobrevivência, o qual aumenta a resistência de neurônios à lesão por estressor mecânico e químico. Além disso, a superexpressão de NCS-1 foi associada à proteção por apoptose (NAKAMURA *et al.*, 2006). O aumento desta proteína favorece a disponibilidade de locais para ligações com o cálcio (TSVETKOV *et al.*, 2018), uma vez que em este íon em excesso no citosol pode ativar proteases, lipases, DNAases (BOECKEL; EHRLICH, 2018). Outro possível mecanismo proposto por Angebault et al (2018), que conduziu estudos em cultura celular de fibroblasto, indica que NCS-1 é importante para a interação entre o RE e a mitocôndria, aumentando as interações VDAC1-IP3R1 e permitindo a transferência ordenada de cálcio da primeira organela à segunda com a participação do MCU, promovendo adequada função mitocondrial. (ANGEBAULT *et al.*, 2018). Neste contexto, pode-se sugerir que a OUA, na presença de fator estressor como o LPS, poderia modular a expressão de NCS-1, promovendo uma maior eficácia na sinalização de cálcio mediada pela NCS-1.

Com o objetivo de aprofundar a investigação acerca do complexo NCS-1, IP3R e MCU propôs-se avaliar também a expressão das proteínas IP3R e MCU.

O IP3R medeia a liberação de cálcio do RE, desempenhando um papel fundamental em muitos distúrbios neurodegenerativos (AKL *et al.*, 2013). Existem evidências que indicam a ocorrência de aumento na expressão de IP3R em modelo de neuroinflamação por LPS. Em cultura celular neuronal (PARK *et al.*, 2016) observou ao analisar as repostas induzidas a cálcio, um aumento na expressão da proteína IP3R, na condição de desregulação da homeostase (MENG *et al.*, 2019).

Observa-se, desta forma, que os nossos resultados corroboram a literatura,

demonstrando um aumento na expressão de IP3R após indução da neuroinflamação com o LPS. Em contrapartida, para o grupo OUA + LPS é possível observar que há permanência da expressão de IP3R para nível do grupo controle.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou uma forte diminuição no conteúdo de fosfatidilinositol (PI) para o grupo LPS (GARCIA *et al.*, 2019). Postula-se que a diminuição do PI pode ser explicada pelo fato de o LPS ativar cascatas de sinalização via PI3K, que clivam PI para originar IP3, que fica disponível para se ligar ao seu receptor, o IP3R (QIU *et al.*, 2016). A ativação deste por sua vez possibilitaria o efluxo de cálcio do RE para o citosol, podendo alterar a homeostase, o que levaria à exacerbação de processos de morte como a apoptose (SMAILI *et al.*, 2009).

Desta forma, nosso trabalho avança com a compreensão de que neste modelo, com a aplicação do LPS, há um favorecimento da via de IP3. Além disso, Garcia et al (2019) também observou que, para o grupo OUA-LPS, houve permanência de PI para nível do grupo controle, assim como observamos para a expressão de IP3R, corroborando a ideia de que a OUA possa atuar de forma a impedir os efeitos provocados pelo LPS através da via de IP3.

Vale ressaltar que nosso estudo avaliou a expressão e não a atividade dos receptores IP3R e é conhecido que os dois fatores observados previamente, o aumento da expressão da proteína NCS-1 (ANGEBAULT *et al.*, 2018) e o aumento da expressão de IP3R (LEE *et al.*, 1999) poderiam levar ao aumento da atividade deste receptor. Desta forma, pode-se sugerir que nos dois grupos (OUA+LPS e LPS) haveriam alterações na expressão de proteínas diferentes, porém que favoreceriam igualmente a abertura destes receptores e a saída do cálcio do RE.

Contudo, sabe-se que a saída coordenada do cálcio do RE através do IP3R, para o interior da mitocôndria com a participação do MCU é importante para a manutenção da integridade celular (XU *et al.*, 2018). Neste contexto propôs-se avaliar a expressão da proteína MCU.

O canal unipoter mitondrial (MCU), encontrado na membrana interna da mitocôndria, possui função de auxiliar no transporte de cálcio para dentro da mitocôndria regulando a concentração de cálcio citosólico com o influxo do íon para a mitocôndria, auxiliando na homeostase do meio (WIEDERKEHR *et al.*, 2011).

Assim como observado para a NCS-1, quando OUA e o LPS foram aplicados isoladamente não foram capazes de alterar a expressão de MCU. Entretanto, quando aplicados em conjunto (grupo OUA + LPS) observa-se um aumento

significativo na expressão de MCU.

Em cultura de células neuronais de córtex, observou-se uma superexpressão deste canal, que favoreceu um aumento na concentração de cálcio citosólico, podendo funcionar como um desregulador da homeostase mitocondrial, o que pode ter desencadeado a apoptose observada (GRANATIERO *et al.*, 2019). A indução à inflamação através de LPS, em cardiomiócitos de ratos, levou a um aumento do estresse oxidativo, e este fator pode ter modulado MCU, observando um aumento em sua atividade e expressão (DONG *et al.*, 2017). MCU também está relacionado a excitotoxicidade e disfunção mitocondrial induzida por estresse oxidativo (QIU *et al.*, 2013), levando a morte celular (YAN *et al.*, 2016), em processos neurodegenerativos (GRANATIERO *et al.*, 2019). Em direção oposta a estes estudos descritos, em cultura celular (HEK-293T), tratadas com digitoxina, a superexpressão de MCU causou um acúmulo mitocondrial de cálcio, levando a uma diminuição deste íon no citosol, auxiliando na homeostase da célula (CHAUDHURI *et al.*, 2013). O MCU é regulado positivamente em cultura neuronal de ratos, observando um aumento em sua expressão em culturas envelhecidas, auxiliando na captação de cálcio e homeostase, quando tratadas com cálcio exógeno (CALVO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2016).

Considerando os resultados obtidos sugere-se que, para o grupo OUA + LPS, o aumento da expressão de NCS-1 pode favorecer sua ligação ao cálcio presente no citosol e modular a saída de cálcio do RE, via IP3R. Por sua vez, estes eventos podem auxiliar o fortalecimento da interação IP3R-MCU e aumentar a eficiência da passagem de cálcio do RE para dentro da mitocôndria, favorecendo a homeostase celular, e auxiliando nas concentrações normais de cálcio do meio intracelular.

Por último, para investigar se os eventos observados para o grupo LPS e OUA+LPS estão relacionados a processos que levam à disfunção mitocondrial e morte celular, propôs-se investigar a expressão de fator indutor apoptose AIF.

Estudo em hipocampo de ratos tratados com LPS por 48 h, observou por imunofluorescência que o AIF inicialmente se encontrava na mitocôndria e houve a translocação da proteína para o núcleo, sendo confirmado pelo aumento da proteína no núcleo através de sua expressão (CZAPSKI; GAJKOWSKA; STROSZNAJDER, 2010). Em glioblastoma humano, a utilização de esteróide cardiotônico OUA, em concentrações milimolares, possibilitou alterações significativas na expressão do citocromo C mas, de AIF não houve alterações significativas (REIX *et al.*, 2007).

Em nosso estudo não foi possível observar alterações na expressão de AIF em nenhum dos grupos, sugerindo que os tratamentos não foram capazes de atuar sobre a via de apoptose intrínseca (mitocondrial), modulada pelo AIF. Entretanto, deve se considerar o tempo de indução da neuroinlfamação (2h), que pode ter sido insuficiente para acarretar aumento na expressão da proteína. Outra possibilidade seria uma limitação do método aplicado, pois foi realizada a quantificação de AIF em um homogenato total do hipocampo e sabe-se que frente a um estímulo indutor de apoptose há uma translocação do AIF contido na mitocôndria para o núcleo, onde ela promoverá a clivagem do DNA e consequente morte celular. Seria interessante realizar o fracionamento celular para quantificar o AIF em mitocôndria e no núcleo separadamente e, desta forma, poder avaliar a translocação do AIF e inferir sobre o processo de apoptose.

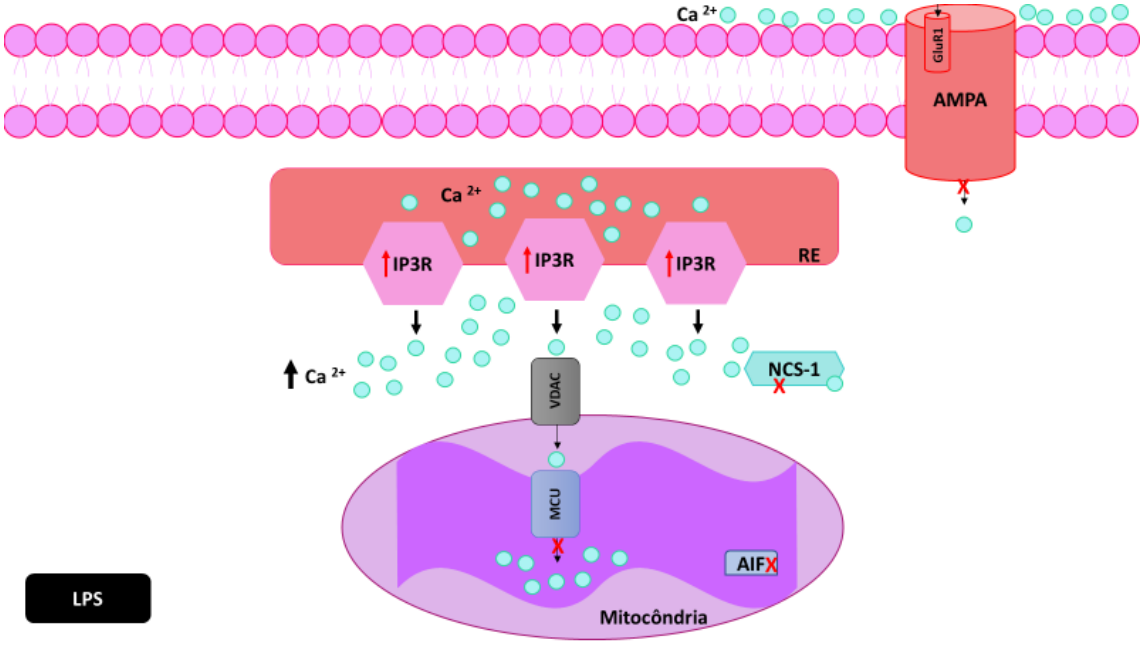
7. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam alterações na sinalização e homeostase do cálcio considerando os tratamentos com OUA e OUA + LPS. O aumento da expressão do IP3R para o grupo LPS sugere uma disfunção do RE para a regulação da homeostase do cálcio intracelular, que pode ter sido perturbada pela neuroinflamação induzida pelo LPS. Além disso, o aumento da expressão de MCU e NCS-1 após o tratamento com concentrações nanomolares de OUA, podem indicar capacidade modulatória deste fármaco sobre as vias de cálcio e possível atividade neuroprotetora, pois poderia aumentar a capacidade da célula de realizar, de forma ordenada, a transferência de cálcio do RE para a mitocôndria. Um refinamento das metodologias deve ser realizado e outras vias de proteção de morte neuronal devem ser investigadas, uma vez que a ação da OUA não foi relacionada à atenuação da via de apoptose intrínseca mediada pelo AIF.

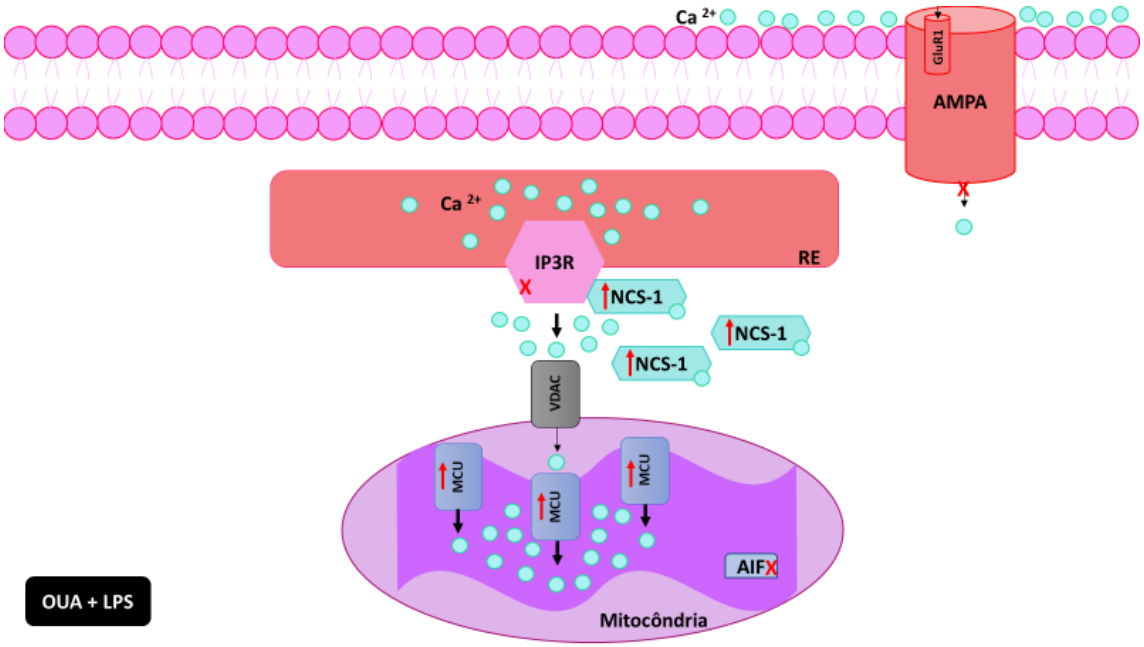
As figuras a seguir esquematizam as conclusões deste estudo, demonstrando uma possível desregulação da homeostase do cálcio celular desencadeada pelo LPS (A) e regulação mediada pela OUA no gupo também tratado pelo LPS (OUA+LPS) (B). Observam-se para as duas imagens que não houve diferença na expressão da subunidade GLUR1 do receptor de glutamato AMPA, provavelmente proporcionando o mesmo influxo de cálcio através deste receptor, para os dois grupos. Para a figura A (LPS), houve apenas aumento na expressão da proteína IP3R, sugerindo maior efluxo de cálcio do RE para o citosol. Para a figura B (OUA+LPS), observa que IP3R volta para o nível do controle e as proteínas MCU e NCS-1 tem suas expressões aumentas, sugerindo uma transferência mais ordenada so cálcio do RE para a mitocôndria. Não foi observada diferença na expressão do AIF (fig. A e B) indicando semelhança na morte pela via mitocondrial independente de caspase, nos dois grupos.

Figura 18: Esquema dos efeitos da OUA e LPS na sinalização do cálcio em hipocampo de ratos. A) Efeitos causados por LPS na sinalização de cálcio, aumentando a expressão de IP3R. B) Efeitos causados pelo tratamento com OUA, na sinalização de cálcio, em ratos induzidos a neuroinflamação de LPS, causando aumento na expressão de NCS-1 e MCU.

A)



B)



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; JANEWAY, Charles A. Immunology: Improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129–138, 2000. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81689-X. .

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001. DOI 10.1042/0264-6021:3570593. .

AGUIAR, Carlos Clayton Torres *et al.* Esquizofrenia: Uma doença inflamatória? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 52–57, 2010. DOI 10.1590/S0047-20852010000100008. .

AKKURATOV, Evgeny E. *et al.* Ouabain Modulates the Functional Interaction Between Na,K-ATPase and NMDA Receptor. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 10, p. 4018–4030, 2020. DOI 10.1007/s12035-020-01984-5. .

ALONSO, Maria Teresa; GARCÍA-SANCHO, Javier. Nuclear Ca2+ signalling. **Cell Calcium**, v. 49, n. 5, p. 280–289, 2011. DOI 10.1016/j.ceca.2010.11.004. .

Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.004.

AKL, H. *et al.* IP3R2 levels dictate the apoptotic sensitivity of diffuse large B-cell lymphoma cells to an IP3R-derived peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 5, p. 1–12, 2013. DOI 10.1038/cddis.2013.140. .

AN, Jinsu *et al.* Caspase-4 disaggregates lipopolysaccharide micelles via LPS-CARD interaction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. DOI 10.1038/s41598-018-36811-4. .

ANKARCRONA, Maria *et al.* Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 961–973, 1995. DOI 10.1016/0896-6273(95)90186-8. .

ANGEBAULT, Claire *et al.* ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca^{2+} sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. **Science Signaling**, v. 11, n. 553, 2018. DOI 10.1126/scisignal.aaq1380. .

ARIAS-SALVATIERRA, D. et al. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF-κB pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. Cell Signal, v. 23, n.

2, p. 425-35, Feb 2011. I

ASWETO, Collins Otieno *et al.* Cellular pathways involved in silica nanoparticles induced apoptosis: A systematic review of in vitro studies. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. September 2016, p. 191–197, 2017. DOI 10.1016/j.etap.2017.09.012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.012.

AUGUSTINE, George J *et al.* Local Calcium Signaling in Neurons. **Neuron**, v. 40, p. 331–346, 2003. .

BAGROV, Alexei Y.; SHAPIRO, Joseph I.; FEDOROVA, Olga V. Endogenous cardiotonic steroids: Physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 1, p. 9–38, 2009. DOI 10.1124/pr.108.000711. .

BAGUR, Rafaela; HAJNÓCZKY, György. Intracellular Ca2+ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. **Molecular Cell**, v. 66, n. 6, p. 780–788, 2017. DOI 10.1016/j.molcel.2017.05.028. .

BANDURA, Julia; FENG, Zhong Ping. Current Understanding of the Role of Neuronal Calcium Sensor 1 in Neurological Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 9, p. 6080–6094, 2019. DOI 10.1007/s12035-019-1497-2. .

BATISTA, Carla Ribeiro Alvares *et al.* Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019. DOI 10.3390/ijms20092293. .

BATISTIČ, Oliver; KUDLA, Jörg. Analysis of calcium signaling pathways in plants. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 8, p. 1283–1293, 2012. DOI 10.1016/j.bbagen.2011.10.012. .

BAZAN, N. G. The docosanoid neuroprotectin D1 induces homeostatic regulation of neuroinflammation and cell survival. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, n. 1, p. 127–129, 2013. DOI 10.1016/j.plefa.2012.08.008. .

BENNETTA, Cassie *et al.* Neuroinflammation, oxidative stress, and blood-brain barrier (BBB)

disruption in acute Utah electrode array implants and the effect of deferoxamine as an iron chelator on acute foreign body response. **Biomaterials**, v. 188, p. 144–159, 2019. DOI 10.1016/j.ejmech.2017.09.001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.001.

BLAUSTEIN, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca2+ stores and cell responsiveness. **Am J Physio**, v. 264, n. 6, p. 1367–1387, 1993. DOI 10.1002/prp2.505. .

BOECKEL, Göran R.; EHRLICH, Barbara E. NCS-1 is a regulator of calcium signaling in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 11, p. 1660–1667, 2018. DOI 10.1016/j.bbamcr.2018.05.005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.005.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utiliizing the Principle of Protein- Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248–254, 1976. DOI 10.1016/j.cj.2017.04.003. .

BRISTOT, Giovana *et al.* Effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in a lisdexamfetamine animal model of mania. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 41, n. 5, p. 419–427, 2019. DOI 10.1590/1516-4446-2017-0001. .

BURGOYNE, Robert D.; HAYNES, Lee P. Sense and specificity in neuronal calcium signalling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 9, p. 1921–1932, 2015. DOI 10.1016/j.bbamcr.2014.10.029. .

CALVO-RODRÍGUEZ, María *et al.* Aging and amyloid β oligomers enhance TLR4 expression, LPS-induced Ca2+ responses, and neuron cell death in cultured rat hippocampal neurons. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI 10.1186/s12974-017-0802-0. .

CALVO-RODRÍGUEZ, María *et al.* In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca2 + cross talk and loss of store-operated Ca2 + entry (SOCE) in rat hippocampal neurons. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 11, p. 2637–2649, 2016. DOI 10.1016/j.bbamcr.2016.08.001. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.08.001.

CAROBREZ, Antonio de Pádua. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na

ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. suppl 2, p. 52–58, 2003. DOI 10.1590/s1516-44462003000600012. .

CARROLL, Reed C. *et al.* Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 315–324, 2001. DOI 10.1038/35072500. .

CHAUDHURI, Dipayan *et al.* MCU encodes the pore conducting mitochondrial calcium currents. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 4–11, 2013. DOI 10.7554/eLife.00704. .

CZAPSKI, Grzegorz A.; GAJKOWSKA, Barbara; STROSZNAJDER, Joanna B. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. **Brain Research**, v. 1356, p. 85–94, 2010. DOI 10.1016/j.brainres.2010.07.096. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.096.

DAUGAS, Eric *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): A ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. **FEBS Letters**, v. 476, n. 3, p. 118–123, 2000. DOI 10.1016/S0014-5793(00)01731-2. .

DI BONAVENTURA, Carlo *et al.* **AMPA receptors and perampanel behind selected epilepsies: Current evidence and future perspectives**. [s.l.]: Taylor & Francis, 2017. v. 18.

DISABATO, Damon J.; QUAN, Ning; GODBOUT, Jonathan P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136–153, 2016. DOI 10.1111/jnc.13607. .

EGBENYA, Daniel L. *et al.* Changes in synaptic AMPA receptor concentration and composition in chronic temporal lobe epilepsy. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 92, p. 93–103, 2018. DOI 10.1016/j.mcn.2018.07.004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.004.

DE STEFANI, Diego *et al.* A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 336–340, 2011. DOI 10.1038/nature10230. .

DE STEFANI, Diego; PATRON, Maria; RIZZUTO, Rosario. Structure and function of the

mitochondrial calcium uniporter complex. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 9, p. 2006–2011, 2014. DOI 10.1016/j.bbamcr.2015.04.008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.008.

DONG, Zhiwei *et al.* Mitochondrial Ca2+ Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. **Molecular Cell**, v. 65, n. 6, p. 1014- 1028.e7, 2017. DOI 10.1016/j.molcel.2017.01.032. .

EGBENYA, Daniel L. *et al.* Changes in synaptic AMPA receptor concentration and composition in chronic temporal lobe epilepsy. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 92, p. 93–103, 2018. DOI 10.1016/j.mcn.2018.07.004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.07.004.

EGOROVA, Polina A.; BEZPROZVANNY, Ilya B. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. **FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p. 3547–3565, 2018. DOI 10.1111/febs.14366. .

EHLERS, Michael D. *et al.* Diffusional Trapping of GluR1 AMPA Receptors by Input-Specific Synaptic Activity. **Neuron**, v. 54, n. 3, p. 447–460, 2007. DOI 10.1038/jid.2014.371. .

FATHI, Nazanin *et al.* STAT3 and apoptosis challenges in cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 993–1001, 2018. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.121. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.121.

FEHER, Joseph. Active Transport: Pumps and Exchangers. **Quantitative Human Physiology**, p. 170–181, 2017. DOI 10.1016/B978-0-12-800883-6.00016-1. .

FORSHAMMAR, Johan *et al.* Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na +/K +-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31586–31597, 2011. DOI 10.1074/jbc.M111.247767. .

FÜRSTENWERTH, H. Ouabain-the insulin of the heart. **International Journal of Clinical Practice**, v. 64, n. 12, p. 1591–1594, 2010. DOI 10.1111/j.1742-1241.2010.02395.x. .

GARCIA, Israel José Pereira *et al.* Ouabain attenuates the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in the cerebellum of rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 2156–2167, 2018. DOI 10.1002/jcb.26377. .

GARCIA, Israel José Pereira. Avaliação do efeito protetor da ouabaína em hipocampo de ratosinduzidos a neuroinflamação por lipopolissacarídeos. **Tese de doutorado**, 2020.

GILHUS, Nils Erik; DEUSCHL, Günther. Neuroinflammation — a common thread in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 429–430, 2019. DOI 10.1038/s41582-019-0227-8. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0227-8.

GLEZER, Isaias *et al.* O fator de transcrição NF- k B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos The role of the transcription factor NF- k B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. **Rev. Bras Psiquiatr.**, v. 22, n. 1, p. 26–30, 2000. .

GOLDSTEIN, Inbal *et al.* Involvement of Na+, K+-ATPase and Endogenous Digitalis-Like Compounds in Depressive Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 491–499, 2006. DOI 10.1016/j.biopsych.2005.12.021. .

GOMES-LEAL, W. Inflamação Aguda, Resposta Glial e Degeneração Axonal em um Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal. Tese (Pós-Graduação em Ciências Biológicas -Área de concentração em Neurociências) -Centro de Ciêricias Biológicas, Iniversidade Federal do Pará), p. 197, 2002.

GONZÁLEZ-SCARANO, F.; BALTUCH, Gordon. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, p. 219–240, 1999. DOI 10.1146/annurev.neuro.22.1.219. .

GRANATIERO, Veronica *et al.* Overexpression of Mitochondrial Calcium Uniporter Causes Neuronal Death. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019. DOI 10.1155/2019/1681254. .

GREGER, Ingo H.; WATSON, Jake F.; CULL-CANDY, Stuart G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. **Neuron**, v. 94, n. 4, p. 713–730, 2017. DOI 10.1016/j.neuron.2017.04.009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.009.

GRIENBERGER, Christine; KONNERTH, Arthur. Imaging Calcium in Neurons. **Neuron**, v. 73, n. 5, p. 862–885, 2012. DOI 10.1016/j.neuron.2012.02.011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011.

GUAN, Yun *et al.* Inflammation-induced upregulation of AMPA receptor subunit expression in brain stem pain modulatory circuitry. **Pain**, v. 104, n. 1–2, p. 401–413, 2003. DOI 10.1016/S0304-3959(03)00048-4. .

HANDEL, Adam E.; IRANI, Sarosh R.; HOLLÄNDER, Georg A. The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 12, p. 723–734, 2018. DOI 10.1038/s41582-018-0095-7. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41582-018-0095-7.

HECKMANN, Bradlee L.; TUMMERS, Bart; GREEN, Douglas R. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. **Cell Death and Differentiation**, v. 26, n. 1, p. 41–52, 2019. DOI 10.1038/s41418-018-0195-3. .

HENEKA, Michael T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388–405, 2015. DOI 10.1016/S1474-4422(15)70016-5. .

Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T., & Mikoshiba, K. (2010). Mechanism of ER Stress-Induced Brain Damage by IP3 Receptor. *Neuron*, *68*(5), 865–878. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.010

HUMEAU, Juliette *et al.* Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. **Cell Calcium**, v. 70, p. 3–15, 2018. DOI 10.1016/j.ceca.2017.07.006. .

J. M. DA SILVA, W.; K. B. FERRARI, C. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.**, v. 14, n. 1, p. 441–451, 2011. DOI 10.1590/S1809-98232011000300005. .

KABBANI, Nadine *et al.* Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8476–8486, 2002. DOI 10.1523/jneurosci.22-19-08476.2002. .

KASRI, Nael Nadif *et al.* Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca 2+-binding proteins. **EMBO Journal**, v. 23, n. 2, p. 312–321, 2004. DOI 10.1038/sj.emboj.7600037. .

KELLER, B.U. *et al.* Calcium influx through subunits GluR1/GluR3 of kainate/AMPA receptor channels is regulated by cAMP dependent protein kinase. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 3, p. 891–896, 1992. DOI 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05127.x. .

KERKHOFS, Martijn *et al.* Emerging molecular mechanisms in chemotherapy: Ca2+ signaling at the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 3, 2018. DOI 10.1038/s41419-017-0179-0. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-017-0179-0.

KIM, Mi Eun *et al.* Pseudane-VII regulates LPS-induced neuroinflammation in brain microglia cells through the inhibition of iNOS expression. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018. DOI 10.3390/molecules23123196. .

KINOSHITA, Paula Fernanda *et al.* Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, 2014. DOI 10.1186/s12974-014-0218-z. .

LAI, Yi Syuan *et al.* Garlic essential oil protects against obesity-triggered nonalcoholic fatty liver disease through modulation of lipid metabolism and oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 25, p. 5897–5906, 2014. DOI 10.1021/jf500803c. .

LEE, Bumsup *et al.* Trisphosphate Receptor Isoforms in Isolated Rat Pancreatic Islets *. v. 140, n. 5, 1999. .

LEWERENZ, Jan; MAHER, Pamela. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. DEC, p. 1–20, 2015. DOI 10.3389/fnins.2015.00469. .

LI, Peng *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479–489, 1997. DOI 10.1016/S0092-8674(00)80434-1. .

LIAO, Yajin *et al.* Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress-induced cell death. **Protein and Cell**, v. 6, n. 6, p. 434–442, 2015. DOI 10.1007/s13238-015-0144-6. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s13238-015-0144-6.

LLOYD, Amy F.; MIRON, Veronique E. The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 447–458, 2019. DOI 10.1038/s41582-019-0184-2. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0184-2.

LU, Wei *et al.* Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors Revealed by a Single-Cell Genetic Approach. **Neuron**, v. 62, n. 2, p. 254–268, 2009. DOI 10.1016/j.neuron.2009.02.027. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.027.

LUO, Jia *et al.* Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. **NeuroMolecular Medicine**, v. 15, n. 4, p. 692–706, 2013. DOI 10.1007/s12017-013-8253-y. .

MAGALHÃES, Pérola O *et al.* Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations : a Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2011. Disponível em: https://sites.ualberta.ca/~csps/JPPS10_3/MS_996/MS_996.html.

MARCHI, Saverio; PINTON, Paolo. The mitochondrial calcium uniporter complex: Molecular components, structure and physiopathological implications. **Journal of Physiology**, v. 592, n. 5, p. 829–839, 2014. DOI 10.1113/jphysiol.2013.268235. .

MCMILLAN, Kirk *et al.* Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1506–1511, 2000. DOI 10.1073/pnas.97.4.1506. .

MENG, Xue Lian *et al.* Selenoprotein SELENOK Enhances the Migration and Phagocytosis of Microglial Cells by Increasing the Cytosolic Free Ca 2+ Level Resulted from the Up-Regulation of IP3R. **Neuroscience**, v. 406, p. 38–49, 2019. DOI 10.1016/j.neuroscience.2019.02.029. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.029.

MHATRE V. HO, JI-ANN LEE, and Kelsey C. Martin. 基因的改变NIH Public Access. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012. DOI 10.1038/jid.2014.371. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf.

MITANI, Akira *et al.* Origin of intracellular Ca2+ elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 601, n. 1–2, p. 103–110, 1993. DOI 10.1016/0006-8993(93)91700-3. .

MOODLEY, K. K.; CHAN, D. The hippocampus in neurodegenerative disease. **The Hippocampus in Clinical Neuroscience**, v. 34, p. 95–108, 2014. DOI 10.1159/000356430. .

MUHAMMAD, Tahir *et al.* Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF-κB signaling. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2019. DOI 10.3390/nu11030648. .

MURPHY, Elizabeth; EISNER, David A. Regulation of intracellular and mitochondrial Na in health and disease. v. 104, n. 3, p. 292–303, 2010. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.108.189050.Regulation..

NAKAMURA, Tomoe Y. *et al.* Possible signaling pathways mediating neuronal calcium sensor-1-dependent spatial learning and memory in Mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0170829. .

NAKAMURA, Tomoe Y. *et al.* Novel role of neuronal Ca2+ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. **Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 7, p. 1081–1091, 2006. DOI 10.1083/jcb.200508156. .

NAKAYAMA, Susumu; MONCRIEF, Nancy D.; KRETSINGER, Robert H. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, n. 5, p. 416–448, 1992. DOI 10.1007/BF00162998. .

NEGRÃO R G D. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular

e variante genética. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 96, n. 1, 2011. DOI 10.1074/jbc.M112.387191. .

NGUYEN, Lien D. *et al.* Characterization of NCS1-InsP3R1 interaction and its functional significance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 49, p. 18923–18933, 2019. DOI 10.1074/jbc.RA119.009736. .

NORDEN, Diana M. *et al.* Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**, v. 64, n. 2, p. 300–316, 2016. DOI 10.1002/glia.22930. .

OFFENBURGER, Sarah Lena; JONGSMA, Elisabeth; GARTNER, Anton. **Mutations in Caenorhabditis elegans neuroligin-like glit-1, the apoptosis pathway and the calcium chaperone crt-1 increase dopaminergic neurodegeneration after 6-OHDA treatment**. [s.l.: s.n.], 2017. v. 14.

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Antigenic stimulation is more efficient than LPS in inducing nitric oxide production by human mononuclear cells on the in vitro granuloma reaction in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 11, p. 1437–1445, 1999. DOI 10.1590/S0100-879X1999001100015. .

OLMOS, G; LLADO, J. Tumor necrosis factor alpha: alink between neuroinflmmation and exocitotocity. **Mediators inflamm**, p. 861231, 2014. DOI 10.11606/issn.2176-7262.v44i2p143-156. .

ORELLANA, Ana Maria *et al.* Cardiotonic steroids as modulators of neuroinflammation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016. DOI 10.3389/fendo.2016.00010. .

ORELLANA, Ana Maria *et al.* Ouabain increases neuronal branching in hippocampus and improves spatial memory. **Neuropharmacology**, v. 140, p. 260–274, 2018. DOI 10.1016/j.neuropharm.2018.08.008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.008.

ORRENIUS, Sten; ZHIVOTOVSKY, Boris; NICOTERA, Pierluigi. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 552–565, 2003.

DOI 10.1038/nrm1150. .

PANAYIOTIDIS, Mihalis I. *et al.* Ouabain-induced perturbations in intracellular ionic homeostasis regulate death receptor-mediated apoptosis. **Apoptosis**, v. 15, n. 7, p. 834–849, 2010. DOI 10.1007/s10495-010-0494-8. .

PARK, Kyoung Sun *et al.* TLR3-/4-Priming Differentially Promotes Ca2+ Signaling and Cytokine Expression and Ca2+-Dependently Augments Cytokine Release in hMSCs. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–14, 2016. DOI 10.1038/srep23103. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/srep23103.

PETSCH, Dagmar; ANSPACH, Friedrich Birger. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2–3, p. 97–119, 2000. DOI 10.1016/S0168-1656(99)00185-6. .

PENG, Yun Li *et al.* Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 1–12, 2012. DOI 10.1186/1742-2094-9-75. .

POLSTER, B. M. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: A “complex” problem. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 695–702, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0170391. .

QIU, Jing *et al.* Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. **Nature Communications**, v. 4, n. May, p. 1–12, 2013. DOI 10.1038/ncomms3034. .

RAHATE, Kiran; BHATT, Lokesh Kumar; PRABHAVALKAR, Kedar S. SERCA stimulation: A potential approach in therapeutics. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 95, n. 1, p. 5–15, 2020. DOI 10.1111/cbdd.13620. .

REIX, Stéphanie *et al.* Expression of cortical and hippocampal apoptosis-inducing factor (AIF) in aging and Alzheimer’s disease. **Neurobiology of Aging**, v. 28, n. 3, p. 351–356, 2007. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2006.01.003. .

RIZZUTO, Rosario *et al.* Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature**

Reviews Molecular Cell Biology, v. 13, n. 9, p. 566–578, 2012. DOI 10.1038/nrm3412. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nrm3412.

S, Yoshikawa *et al.* Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Drosophila melanogaster. 267:16613–16619. **J Biol Chem**, v. 267, p. 8476-16613–16619, 1992. DOI 10.1523/jneurosci.22-19-08476.2002. .

SANCHEZ-GRACIA, Alejandro; ROMERO-POZUELO, Jess; FERRS, Alberto. Two Frequenins in Drosophila: Unveiling the evolutionary history of an unusual Neuronal Calcium Sensor (NCS) duplication. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, 2010. DOI 10.1186/1471-2148-10-54. .

SEKIO, Miyu; SEKI, Kenjiro. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is associated with α1-adrenoceptor dependent downregulation of the membrane GluR1 subunit in the mouse medial prefrontal cortex and ventral tegmental area. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2015. DOI 10.1093/ijnp/pyu005. .

SHANMUGHAPRIYA, Santhanam *et al.* Ca2+ signals regulate mitochondrial metabolism by stimulating CREB-mediated expression of the mitochondrial Ca2+ uniporter gene MCU. **Science Signaling**, v. 8, n. 366, p. ra23, 2015. DOI 10.1126/scisignal.2005673. .

SHENG, Wenwen *et al.* Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA2-IIA expression in astrocytes and microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 1–15, 2011. DOI 10.1186/1742-2094-8-121. .

SILVÉRIO, GUSTAVO CAMARGO; ROSAT, RENATA MENEZES. Memória de longo prazo: mecanismos neurofisiológicos de formação. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 16, n. 4, p. 219–223, 2006. .

SIMEONE, Timothy A.; SANCHEZ, Russell M.; RHO, Jong M. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Journal of Child Neurology**, v. 19, n. 5, p. 343–360, 2004. DOI 10.1177/088307380401900507. .

SMAILI, Soraya *et al.* Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, n. 3, p. 467–475, 2009. DOI 10.1590/s0001-

37652009000300011. .

SNCHEZ-GRACIA, Alejandro; ROMERO-POZUELO, Jess; FERRS, Alberto. Two Frequenins in Drosophila: Unveiling the evolutionary history of an unusual Neuronal Calcium Sensor (NCS) duplication. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, 2010. DOI 10.1186/1471-2148-10-54. .

STEWART, Teneale A.; YAPA, Kunsala T.D.S.; MONTEITH, Gregory R. Altered calcium signaling in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2502–2511, 2015. DOI 10.1016/j.bbamem.2014.08.016.

Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.016.

SUSIN, Santos A; LORENZO, Hans K; ZAMZAMI, Naoufal. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis- inducing factor. **Letters to nature**, v. 353, p. 441–446, 1999. DOI 10.1038/17135. .

SUYAMA, Shigetomo *et al.* Plasticity of calcium-permeable ampa glutamate receptors in proopiomelanocortin neurons. **eLife**, v. 6, p. 1–25, 2017. DOI 10.7554/ELIFE.25755. .

TAKAHASHI, Kiyomi *et al.* Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 1–12, 2008. DOI 10.1186/1742-2094-5-11. .

T.HOPPER *et al.* Chapter Four - Recent Developments in Targeting Neuroinflammation in Disease. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 37–53, 2012.

TOGNON, Raquel; NUNES, Natália de Souza; CASTRO, Fabíola Attié de. Apoptosis deregulation in myeloproliferative neoplasms. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 11, n. 4, p. 540–544, 2013. DOI 10.1590/S1679-45082013000400025. .

TSVETKOV, Philipp O. *et al.* Functional status of neuronal calcium sensor-1 is modulated by zinc binding. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. December, p. 1–21, 2018. DOI 10.3389/fnmol.2018.00459. .

TULADHAR, Anup *et al.* **Central Nervous System**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00030-X.

TYAGI, E. et al. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain. J Neuroimmunol, v. 205, n. 1-2, p. 51-6, Dec 2008.

VEZZANI, Annamaria; BALOSSO, Silvia; RAVIZZA, Teresa. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 459–472, 2019. DOI 10.1038/s41582-019-0217-x. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x.

XIA, Yun; YAMAGATA, Kanato; KRUKOFF, Teresa L. Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS. **Brain Research**, v. 1095, n. 1, p. 85–95, 2006. DOI 10.1016/j.brainres.2006.03.112. .

XIE, Zijian *et al.* Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na+/K+- ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 19323–19328, 1999. DOI 10.1074/jbc.274.27.19323. .

XIE, Jeffrey X.; LI, Xin; XIE, Zijian. Regulation of renal function and structure by the signaling Na/K-ATPase. **IUBMB Life**, v. 65, n. 12, p. 991–998, 2013. DOI 10.1002/iub.1229. .

XU, M. et al. Effects of perinatal lipopolysaccharide (LPS) exposure on the developing rat brain; modeling the effect of maternal infection on the developing human CNS. Cerebellum, v. 12, n. 4, p. 572-86, Aug 2013.

XU, Han *et al.* IP3R-Grp75-VDAC1-MCU calcium regulation axis antagonists protect podocytes from apoptosis and decrease proteinuria in an Adriamycin nephropathy rat model. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI 10.1186/s12882-018-0940-3. .

XUEXIU, He *et al.* Docosahexaenoic acid attenuates LPS-stimulated inflammatory response by regulating the PPARγ/NF-κB pathways in primary bovine mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 112, p. 7–12, 2017. DOI 10.1074/jbc.M112.387191. .

YAN, X *et al.* Activation of Na+-K+-ATPase attenuates high glucose-induced H9c2 cell apoptosis via suppressing ROS accumulation and MAPKs activities by DRm217. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 48, p. 883–893, 2016. DOI 10.3390/ijms18020248. .

WIEDERKEHR, Andreas *et al.* Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone

secretion. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 601–611, 2011. DOI 10.1016/j.cmet.2011.03.015. .

ZHAO, Huichao *et al.* IP3R and RyR channels are involved in traffic-related PM2.5-induced disorders of calcium homeostasis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 35, n. 5, p. 339–348, 2019. DOI 10.1177/0748233719843763. .

ZHOU, Rulun *et al.* Genome-wide gene expression profiling in GluR1 knockout mice: Key role of the calcium signaling pathway in glutamatergically mediated hippocampal transmission. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 12, p. 2318–2326, 2009. DOI 10.1111/j.1460-9568.2009.07022.x. .

ANEXO - 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cepicb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **77** nas fls. **72** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Cristoforo Scavone, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Sinalização inflamatória e a modulação da expressão de genes protetores induzida pela ouabaína no sistema nervoso central in vivo** do qual participou(aram) o(s) alunos **Paula Fernanda Kinoshita e os pesquisadores Elisa Mitiko Kawamoto, Carolina Dermachi Munhoz,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **30.06.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de agosto de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP