

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

BARBARA AKEMI BASTO OGATA

**AÇÃO DA METILPREDNISOLONA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
ROEDORES: VIABILIDADE CELULAR E ENVOLVIMENTO COM MEMÓRIA**

São Gabriel

2017

BARBARA AKEMI BASTO OGATA

**AÇÃO DA METILPREDNISOLONA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
ROEDORES: VIABILIDADE CELULAR E ENVOLVIMENTO COM MEMÓRIA**

Trabalho apresentado como requisito parcial para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso III, do Curso Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena do Canto Vinadé

Co-orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

São Gabriel

2017

BARBARA AKEMI BASTO OGATA

**AÇÃO DA METILPREDNISOLONA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
ROEDORES: VIABILIDADE CELULAR E ENVOLVIMENTO COM MEMÓRIA**

Trabalho apresentado como requisito parcial para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso III, do Curso Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 21 de Junho de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lúcia Helena do Canto Vinadé
Orientadora (UNIPAMPA)

Prof.^a Dr.^a Thaís Posser (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo (UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que foram importantes durante a realização desse trabalho. Especialmente meus pais, Gilberto Ogata e Nadir Souza, que me ajudaram com apoio financeiro e emocional e me incentivaram em todos os momentos durante meus estudos nesses 4 anos. Mãe, agradeço por todas as conversas e risadas que tivemos. Pai, agradeço por sempre acreditar em mim e por todos os conselhos que deu, nunca me deixando desistir dos meus sonhos.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes para me ouvir e me animar, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Lucia Vinadé, por todo apoio, conselhos, broncas, ensinamentos, por ser como uma segunda mãe pra mim ao longo desses 4 anos. Por acreditar na minha capacidade, pela oportunidade de trabalhar contigo no lanetox e por constantemente me incentivar a sempre continuar melhorando.

A Tainah, por todas conversas, risadas, “trouxices”, jantãs, chás da tarde, viagens, desabafos, festas, conselhos, entre tantas outras coisas. Me sinto honrada por ter uma amiga como você. Obrigada marida!

A Laís, por todo o companheirismo durante toda a graduação, por nossa amizade sempre presente, pela parceria em inúmeros trabalhos, pelas broncas.

Aos meus companheiros de casa, Lana e Guilherme, por me suportarem, me ajudarem, por toda as conversas e diversão que tivemos nesses últimos 6 meses.

Aos meus colegas de trabalho: Bruna, Allan e Maria, por todas as piadas e risadas que tivemos, por todos nossos almoços no centro, por nossas viagens, por sempre me alegrarem tanto no laboratório e fazer meus dias melhores e mais leves. Vocês são minha família.

Aos demais colegas do LANETOX: Raquel, Etiely, Yuri, Patrícia e Ana, pela parceria diária no laboratório, por toda a ajuda em experimentos. Em especial a Raquel, obrigada de coração por toda a ajuda! Você surgiu como um anjo na minha vida.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Cháriston Dal Belo, pela constante orientação, pelos conselhos e dicas tanto na área profissional quanto pessoal.

E aos meus professores pelo apoio, encorajamentos contínuos e pelos conhecimentos transmitidos.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar contra o mundo”

Nelson Mandela

RESUMO

A Metilprednisolona (METP) é um fármaco sintético da classe dos glicocorticoides que tem utilização mundial generalizada na área clínica. Além da atividade anti-inflamatória e imunológica, os glicocorticoides são também conhecidos por interferirem nos processos de consolidação da memória, porém pouco é conhecido sobre os mecanismos. Recentemente, foi demonstrado que o glicocorticoide METP induz uma modulação positiva da transmissão neuromuscular de roedores, a qual resulta em aumento do influxo de cálcio em placas terminais. Sabendo disso, propomos que os mesmos mecanismos relacionados com as vias de sinalização dependentes de cálcio podem estar envolvidos na resposta mnemônica dos glicocorticoides. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da METP sobre a viabilidade celular e sobre um elemento de sinalização celular envolvido na memória, a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina do tipo II - CaMKII, no sistema nervoso central de roedores. Neste trabalho, a viabilidade celular de fatias cerebrais tratadas com doses de 3, 30 e 300 μ M de METP, foi ensaiada utilizando o teste colorimétrico MTT e o modelo de privação de glicose e oxigênio (PGO). Quanto aos ensaios *in vivo*, as estruturas hipocampo e córtex de ratos tratados com 5mg/kg e 30 mg/kg de METP foram submetidas a SDS-PAGE a 10% e a técnica de western blot. Os resultados foram analisados pelo software ImageJ (NIH). O uso de animais foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA / UNIPAMPA 037/2012). Os resultados, demonstraram um aumento da densidade eletroforética e do imunoconteúdo da CaMKII em córtex, com o tratamento *in vivo* com METP. Em fatias de córtex e hipocampo, METP *in vitro* proporcionou um aumento da viabilidade celular, porém não relacionado com neuroproteção a eventos isquêmicos proporcionados pela privação de glicose e oxigênio. Os dados apresentados neste trabalho sugerem que o aumento da memória induzido pelo tratamento com doses baixas de METP está envolvido com a via de sinalização dependente de cálcio da CaMKII.

Palavras-Chave: CaMKII; Glicocorticóide; Cálcio.

ABSTRACT

Methylprednisolone (METP) is a synthetic glucocorticoid that has widespread and worldwide use in the clinical area. In addition to anti-inflammatory and immunological activity, glucocorticoids are also known to interfere in memory consolidation processes, but little is known about its mechanisms. Recently, glucocorticoid METP has been shown to induce a positive modulation of rodents neuromuscular transmission, which results in increased calcium influx at end plates. Knowing this, we propose that some mechanisms related to calcium-dependent signaling pathways may be involved also in the mnemonic response of glucocorticoids. The aim of this work was to investigate the effects of METP on cell viability and on cellular signaling element involved in memory, the calcium and calmodulin dependent protein kinase type II - CaMKII, in the central nervous system of rodents. The cell viability of cerebral slices treated with doses of 3, 30 and 300 μ M METP was assayed using the MTT colorimetric test and the glucose and oxygen deprivation model (PGO). As for *in vivo* assays, hippocampal and cortex structures from rats treated with 5 mg/kg and 30 mg/kg of METP were subjected to 10% SDS-PAGE and Western blot technique. Results were analyzed by the ImageJ software (NIH). The use of animals was previously approved by the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA / UNIPAMPA 037/2012). The results demonstrated an increase in the electrophoretic density and immunocontent of CaMKII in cortex *in vivo* METP treatment. In cortex and hippocampal slices, *in vitro* METP treatment, provided an increase in cell viability, but not related to neuroprotection, at least to ischemic events provided by glucose and oxygen deprivation. The data presented in this work suggest that memory enhancement induced by low dose METP treatment involves the calcium dependent signaling pathway of CaMKII.

Key words: CaMKII; Glucocorticoid; Calcium.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01. Estrutura e função da CaMKII.....	12
Fig. 02. Tratamento <i>in vitro</i> – efeito de diferentes concentrações de METP na viabilidade celular em fatias de hipocampo e córtex de camundongos.....	21
Fig. 03. Perfil eletroforético de hipocampo nas frações sobrenadante e pellet, mostrando a banda de 50 kDa correspondente a CaMKII.....	22
Fig. 04. Efeito das doses de METP na densidade da banda de 50kDa do SDS-PAGE de amostras de hipocampo, analisada por ImageJ (NIH).....	23
Fig. 05. Perfil eletroforético de córtex, mostrando a banda de 50 kDa correspondente a CaMKII (seta).....	24
Fig. 06. Efeito das doses de METP na densidade óptica da banda de 50kDa do SDS-PAGE de amostras pellet e sobrenadante de córtex, analisada por ImageJ (NIH)...	24
Fig. 07. Imunoconteúdo de CaMKII forma total em córtex na presença de METP....	25
Fig. 08. Imunoconteúdo da forma total de CaMKII e fosforilada em córtex sobrenadante.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. Figuras (Fig.)
2. Páginas (pág.)
3. Doença de Alzheimer (DA);
4. Monofosfato cíclico de adenosina (AMPC)
5. Diacilglicerol (DAG)
6. Proteína quinase C (PKC);
7. Proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina tipo II (CaMKII);
8. Proteína quinase A (PKA);
9. *Long-term potentiation* (LTP);
10. *Long-term depression* (LTD);
11. Densidade pós sináptica (PSD);
12. Cálcio (Ca²⁺);
13. N-metil D-Aspartato (NMDA);
14. Calmodulina (CaM);
15. Metilprednisolona (METP);
16. Brometo de 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-il] -2,5-Difeniltetrazólio (MTT);
17. Privação de oxigênio e glicose (PGO);
18. Intraperitonealmente (i.p.)
19. Solução de homogeinização 1 (SH1);
20. *Crotalus durrisus terrificus* (Cdt).
21. PM: Padrão de peso molecular;
22. Hipocampo sobrenadante controle (HSC);
23. Hipocampo sobrenadante dose baixa (HSDB);
24. Hipocampo sobrenadante dose alta (HSDA);
25. Hipocampo pellet controle (HPC);
26. Hipocampo pellet dose baixa (HPDB);
27. Hipocampo pellet dose alta (HPDA);
28. Córtex sobrenadante controle (CSC);
29. Córtex sobrenadante dose baixa (CSDB);
30. Córtex sobrenadante dose alta (CSBA);
31. Córtex pellet controle (CPC);
32. Córtex pellet dose baixa (CPDB);
33. Córtex pellet dose alta (CPDA).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina tipo II (CaMKII)	11
1.2. Glicocorticóides	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVO	15
3.1. Objetivo Geral	15
3.2. Objetivos Específicos	15
4. MATERIAL, TÉCNICAS E MÉTODOS	16
4.1. Reagentes	16
4.2. Animais	16
4.3. Preparação de fatias cerebrais.....	16
4.4. Viabilidade Celular	17
4.5. Ensaio de privação de oxigênio e glicose (PGO)	17
4.6. Tratamento das amostras <i>in vivo</i>	17
4.7. Preparação de Membrana.....	18
4.8. Dosagem de proteínas e Eletroforese	18
4.9. Western Blot.....	19
4.10. Análise dos dados e estatística	19
5. RESULTADOS	21
5.1. Viabilidade Celular e PGO	21
5.2. Exp. <i>in vivo</i> : densitometria eletroforética da CaMKII	22
5.3. Exp. <i>in vivo</i> : Western Blot - densitometria do imunoconteúdo da CaMKII.....	25
6. DISCUSSÃO	27
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

Com a melhora na qualidade de vida e os avanços na farmacologia o número de pessoas idosas tem aumentado, elevando também a quantidade de mazelas associadas ao envelhecimento. Entre as doenças mais comuns em idosos estão as que afetam o sistema nervoso central e periférico. As neuropatologias apresentam grande incidência no Brasil e no mundo e, segundo a Organização Mundial de Saúde, representam um terço das causas de doenças com custo elevado (ANDLIN-SOBOCKI *et al.*, 2006; GUSTAVSSON *et al.*, 2011). Na Europa, bilhões de euros são gastos no tratamento de neuropatologias, representando a soma dos custos de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (OLESEN *et al.*, 2012). Uma das neuropatologias mais comumente encontrada é a Doença de Alzheimer (DA), caracterizada pelo déficit na memória de longo e curto prazo, dependendo da gravidade do quadro (WOSTYN *et al.*, 2008).

Pode-se considerar que a memória é mais do que simplesmente a evocação de informações, mas um processo que envolve também a aquisição, a gravação e a conservação, possuindo também a capacidade de modificar o comportamento em função de experiências anteriores (BEAR, *et al.*, 2006). Há duas formas diferentes de memória, a explícita (ou declarativa) e a implícita (ou não-declarativa).

Na consolidação da memória, a informação é armazenada, podendo ser evocada quando o indivíduo necessitar das informações adquiridas e consolidadas (BEAR, *et al.*, 2006). Durante a formação da memória são necessárias alterações morfológicas em pontos especializados dos contatos neuronais, as sinapses. Essas se alteram com o aprendizado, novas sinapses são formadas e antigas se fortalecem (BEAR, *et al.*, 2006). Sinais elétricos denominados potenciais de ação trafegam no axônio neuronal para atingir a sinapse. Ao chegar ao terminal pré-sináptico, vesículas se rompem e liberam neurotransmissores na fenda sináptica. Acredita-se que um aumento na liberação de neurotransmissores, seja o primeiro passo para a formação da memória (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Os neurotransmissores liberados na fenda sináptica se ligam a receptores específicos na membrana pós-sináptica, sendo eles ionotrópicos (associados a canais iônicos) ou metabotrópicos (associados a proteína G), o que muitas vezes acarreta no aumento da concentração intracelular de moléculas sinalizadoras como monofosfato

cíclico de adenosina (AMPC), diacilglicerol (DAG) e cálcio. Como consequência dessa indução, algumas enzimas como a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina tipo II (CaMKII) e a proteína quinase A (PKA) são ativadas, e por sua vez ativam mecanismos intracelulares que aumentam a transmissão de informações entre neurônios e pode culminar com a síntese proteica. Tais alterações entre os neurônios têm sido denominadas plasticidade sináptica (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000).

A potenciação de longo prazo, do inglês *long-term potentiation* (LTP), assim como a depressão de longo prazo *long-term depression* (LTD), são os prováveis mecanismos moleculares que explicam a formação e consolidação da memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993). A LTP consiste em um acréscimo na eficiência da transmissão sináptica em neurônios em diferentes regiões do cérebro, por exemplo o hipocampo, em resposta a estímulos de alta frequência. Enquanto que a LTD consiste do contrário em resposta a estímulos de baixa frequência, ativando vias diferentes de sinalização.

1.1 Proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina tipo II (CaMKII)

A CaMKII é uma proteína quinase abundante no cérebro que possui um importante papel na formação de sinapses, síntese e secreção de neurotransmissores, na função de receptores, de canais iônicos e na plasticidade sináptica, principalmente na aprendizagem e memória (LISMAN *et al.*, 2002). A CaMKII, ativada pela ligação de cálcio e calmodulina, é altamente abundante no cérebro, constituindo em cerca de 2% do total proteico no hipocampo e de 20 a 40% do proteoma da densidade pós sináptica (PSD). O aumento no influxo de cálcio pelos canais N-metil D-Aspartato (NMDA), que ocorre durante a indução de LTP, estimula a autofosforilação e ativação da CaMKII (LISMAN; ZHABOTINSKY, 2001) indicando que esta tem um papel chave na LTP. A CaMKII pertence a uma família contendo 28 isoformas derivadas de quatro genes (α , β , γ e δ). As isoformas α -(50 kDa) e β -(60 kDa) são predominantes e exclusivamente expressas no cérebro, onde formam enzimas compostas por uma ou ambas subunidades. Cada forma consiste em um domínio catalítico, autoinibitório, de autoassociação e um segmento variável (Fig. 01.A.) (LISMAN *et al.*, 2002).

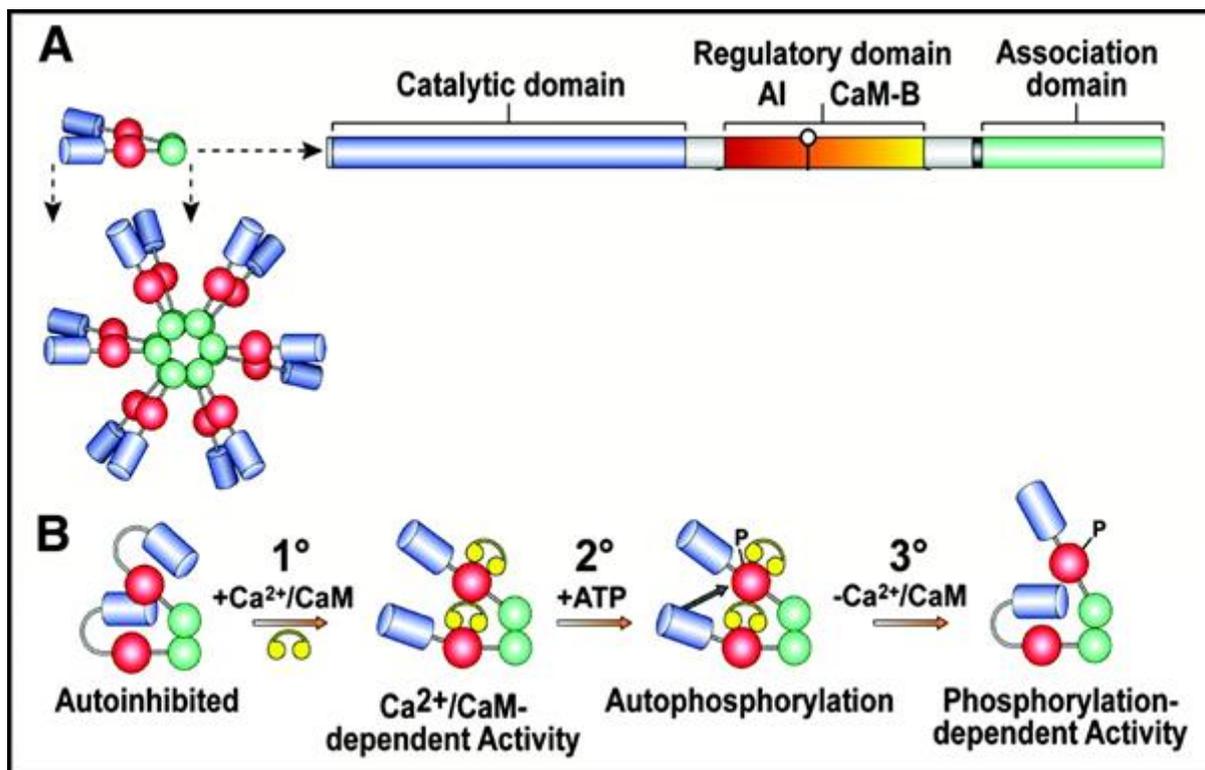


Fig. 01. Estrutura e função da CaMKII. **A.** Holoenzima CaMKII é formada por 8 a 12 monômeros, contendo domínio de associação, domínio catalítico, domínio regulatório e região de ligação à calmodulina. **B.** A ativação inicial de CaMKII requer a ligação de calmodulina com cálcio ($\text{Ca}^{2+} / \text{CaM}$), e atividade pode ser mantida via autofosforilação da T286. CaMKII indica Calmodulina quinase II; AI, região autoinibitória; CaM-B, região de ligação a calmodulina. Fonte: Modificado de Swaminathan; Anderson, 2007.

Durante a elevação na magnitude dos níveis de Ca^{2+} , pode ocorrer a autofosforilação (Fig. 01.B.). Para iniciar essa reação é necessário que duas moléculas de Ca^{2+} /calmodulina se liguem a duas subunidades na mesma holoenzima. Uma das moléculas de Ca^{2+} /calmodulina se liga na subunidade e a ativa, enquanto a segunda molécula se liga a subunidade vizinha, provocando uma mudança conformacional, deixando a Thr286 exposta. Quando a Thr286 no domínio autoinibitório é exposta, esse sítio pode ser fosforilado, consequentemente a CaMKII se manterá ativa, mesmo que o Ca^{2+} retorne aos níveis basais, até a quinase ser desfosforilada (LISMAN *et al.*, 2002; WAYMAN *et al.*, 2009). A autofosforilação das subunidades provoca uma mudança na mobilidade eletroforética, alterando a massa molecular da subunidade de 50 kDa para 54 kDa (BENNETT *et al.*, 1983).

1.2 Glicocorticoides

Os glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) são hormônios produzidos no córtex adrenal em situações de estresse. Na área clínica, possui uma utilização bastante generalizada, devido a suas propriedades imunológicas e anti-inflamatórias. Há anos se reconhece que os glicocorticóides têm a habilidade de atuar no cérebro e influenciar na cognição (MCGAUGH *et al.*, 1996).

Diversos medicamentos com atividade neuroprotetora têm sido estudados por seus eventuais efeitos nas vias de sinalização envolvidas em memória, tais estudos contribuem para o aumento do conhecimento dos mecanismos neuropatológicos. Segundo Roozendaal (2000), a relação entre os glicocorticóides e a consolidação da memória tem padrão de “U” invertido, sendo dosagem dependente. Níveis elevados de glicocorticóides possuem um efeito prejudicial na consolidação da memória (QUERVAIN *et al.*, 2009), enquanto doses menores ou medianas possuem efeito facilitatório. Estudos demonstraram que a administração de corticosterona, pós-treinamento, melhorou a consolidação da memória, assim como, glicocorticóides endógenos estão envolvidos na regulação da mesma (ROOZENDAAL, 2000).

Tem sido demonstrado que o glicocorticóide sintético Metilprednisolona (METP) possui a capacidade de prevenir o bloqueio neuromuscular induzido pela administração de β -bungarotoxina. Este efeito pode ser induzido pela capacidade da METP em aumentar os níveis de acetilcolina no sistema neuromuscular (DAL BELO *et al.*, 2002). A elevação nos níveis de acetilcolina é induzido pela facilitação do influxo de cálcio, consequência da diminuição da corrente de potássio no terminal nervoso. Dal Belo *et al.*, (2002) também sugerem que a proteção na junção neuromuscular reflete a habilidade da METP de aumentar a captação de colina e estoques de acetilcolina. Tendo em vista a ação de METP na junção neuromuscular, e uma vez que é conhecida a atividade da acetilcolina na transmissão sináptica relacionada com processos de memória, neste trabalho verificamos o efeito da METP no sistema nervoso central de roedores, principalmente sobre uma via de sinalização molecular envolvida com a memória e o aprendizado.

2 JUSTIFICATIVA

A perda de memória, relacionada a várias neuropatologias, está presente em todos os países, grupos étnicos e classes socioeconômicas. O estudo dos mecanismos de sinalização e das proteínas envolvidas na memória é de extrema importância para a compreensão do processo de memória e aprendizagem. A CaMKII é uma proteína abundante no cérebro e classicamente envolvida em modelos de estudo da memória.

Sabe-se que os glicocorticoides possuem efeito na consolidação da memória e aprendizagem. Esses fármacos são utilizados abundantemente na indústria farmacológica com diversas ações terapêuticas. A utilização de medicamentos já comercializados a fim de descobrir novos usos, pode ser aplicada a essas drogas. Aumentando assim o interesse na investigação dos efeitos da Metilprednisolona sobre a memória.

Estudos da ação de glicocorticoides sobre a memória têm sido realizados numa miríade de laboratórios ao redor do mundo. Nosso laboratório estuda os efeitos mnemônicos da METP em parceria com vários grupos de pesquisa no Estado. A parte experimental *in vivo* deste trabalho, tratamento dos animais e testes de memória aversiva, foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa em fisiologia do campus Uruguaiana sob a orientação da professora Pâmela Mello-Carpes. Os dados referentes ao tratamento *in vivo* estão compilados em um manuscrito submetido a publicação: *THE EMERGING ROLE OF LOW-DOSE METHYLPREDNISOLONE AS COGNITIVE ENHANCER IN RATS: INVOLVEMENT OF CALCIUM SIGNALING*. Liane S de Vargas, Rithiele Gonçalves, Barbara A Ogata, Marcus V Lara, Zaquer S M Costa-Ferro, Simone D Salamoni, Michelle F Domingues, Angela R Piovesan, Dênis R de Assis, Lucia Vinadé, Alexandre P Corrado, Wilson Alves-Do-Prado, Paulo Correa-de-Sá, Jaderson C da Costa, Ivan Izquierdo, Cháriston A Dal Belo, Pâmela B Mello-Carpes.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo era investigar os efeitos de METP no sistema nervoso central sobre a viabilidade celular e sobre vias de sinalização envolvidas na memória, especialmente a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina tipo II, CaMKII.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o perfil eletroforético da proteína CaMKII, em relação à sua quantidade e mobilidade, em amostras de hipocampo e córtex de ratos tratados com METP por dez dias (tratamento *in vivo*);
- Identificar o imunoconteúdo da proteína CaMKII, forma total e fosforilada, nas amostras *in vivo*;
- Analisar a viabilidade celular, através da técnica de MTT, em fatias de hipocampo e de córtex de camundongo incubadas com METP;
- Investigar o possível efeito neuroprotetor de METP em fatias de hipocampo e de córtex de camundongo, frente a um insulto isquêmico (PGO);

4 MATERIAL, TÉCNICAS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram obtidos de empresas certificadas como Sigma Aldrich ou BioRad, sendo todos de alto grau de pureza. O Succinato de sódio de Metilprednisolona (METP, Solu-Medrol®) foi obtido dos Laboratórios Pfizer (São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados os seguintes anticorpos: Anti- α CaM Kinase II (Sigma-Aldrich C6974), Anti-phospho T286 -CaMKII (Sigma-Aldrich SAB4504356) e Anti-Rabbit conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich A3678), e revelador NBT-BCIP (KPL 508118)

4.2 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos adultos Swiss (28 e 35g) e ratos adultos Wistar (250 e 280g) de ambos os sexos. Todos animais foram mantidos em temperatura de 22-26°C, tendo acesso *ad libitum* a comida e água, nos biotérios dos campi São Gabriel e Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (NIH, 1996) e aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Uso Animal (CEUA / UNIPAMPA, Protocolos nº 037/2012 e 021/2013).

4.3 Preparação de fatias cerebrais

Os camundongos foram decapitados por guilhotina e o cérebro retirado imediatamente. As estruturas hipocampo e córtex, foram dissecadas em gelo e umidificadas utilizando tampão HEPES-salina aerado com O₂ (NaCl 124 mM, KCl 4mM, MgSO₄ 1,2mM, glicose 12mM, CaCl₂ 1mM e HEPES 25mM pH 7,4). As fatias de cada estrutura foram obtidas de acordo com Vinadé e Rodnight (1996), modificado. As fatias cerebrais (0,4 μ m) foram pré-incubadas a 37°C por 30 minutos em placa de 96 poços preenchida de HEPES-salina (200 μ L/fatia). Após o tempo de pré-incubação, o meio foi substituído pelo tratamento com METP (3, 30 e 300 μ M) dissolvido em HEPES-salina e as fatias incubadas por mais 60 minutos a 37°C.

4.4 Viabilidade Celular

Imediatamente após a incubação com os diferentes tratamentos, as fatias foram ensaiadas com o teste para Brometo de 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-il] -2,5-Difeniltetrazólio (MTT) (0,5% em HEPES-salina) por 30 minutos a 37°C. O MTT é um sal de tetrazólio utilizado para medir a atividade metabólica de células viáveis. Este método consiste na redução do MTT a formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Esta enzima está presente e funcional nas células que possuem sua mitocôndria intacta. Uma vez ocorrida a redução, a coloração do meio muda de amarelo (MTT) para lilás (formazan). Esta mudança de coloração foi quantificada através do equipamento leitor de ELISA. Portanto, o formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, à viabilidade celular. O ensaio colorimétrico de MTT foi realizado de acordo com Dal belo *et al.*, 2013.

4.5 Ensaio de privação de oxigênio e glicose (PGO).

A viabilidade celular também foi ensaiada em privação de oxigênio e glicose (PGO), técnica que simula a isquemia *in vitro* (STRASSER; FISCHER, 1995). Após a pré-incubação, as fatias foram incubadas por 15 minutos a 37°C com tampão HEPES-salina modificado, contendo NaCl 124 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM (pH 7,4) e aerado com nitrogênio. Em seguida o tampão anterior foi substituído por tampão HEPES-salina aerado com oxigênio e as fatias foram incubadas por 2 horas na presença ou ausência de METP (3, 30 e 300 µM). O ensaio colorimétrico de MTT foi realizado em seguida.

4.6 Tratamento das amostras *in vivo*

Ratos foram tratados por um período de 10 dias com METP dissolvida em salina (NaCl 0,9%) administrada intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 5mg/kg (dose baixa) e 30mg/kg (dose alta). Após esse período, os animais foram submetidos a teste de memória aversiva e em seguida sacrificados. O cérebro foi retirado imediatamente e dissecadas as estruturas de hipocampo e córtex. As

estruturas foram congeladas em nitrogênio líquido para posterior processamento. Esses procedimentos foram realizados no campus Uruguiana.

4.7 Preparação de Membrana

As estruturas hipocampo e córtex dos ratos tratados foram homogeneizadas no equipamento Tissue Lysser utilizando 1 mL solução de homogeneização 1 - SH1 (Tris 50mM, EDTA 2mM, Inibidores de protease e inibidores de fosfatase) e beads magnéticas para uma maior eficácia. Foram adicionados 0,5 mL de solução SH2 (Tampão SH1 com adição de 0,6% Triton-x) e deixado em repouso por 10 minutos em gelo. O homogenato foi passado 3 vezes lentamente por uma seringa de 1 mL (insulina), após, cada homogenato foi centrifugado à 1000 g por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi reservado e o precipitado ressuspensionado em Tampão SH1. O ressuspensionado foi centrifugado à 1.000 g por 10 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante retirado e adicionado ao sobrenadante coletado na primeira centrifugação (NISHIUMI; ASHIDA, 2007). O homogenato foi centrifugado à 16.000 g à 4°C por 20 minutos. Por fim, o pellet foi ressuspensionado em Tris 50mM (pH 7,4) e armazenado à -20°C até a sua utilização, assim como, o sobrenadante.

4.8 Dosagem de proteínas e Eletroforese

As amostras foram diluídas 1:20 e utilizadas para dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A quantidade de proteína das amostras foi analisada por leitura de espectrofotometria com comprimento de onda 395nm. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e comparadas com a curva padrão de albumina. Aproximadamente 15ug de proteína total de cada amostra foi dissolvida em solução de eletroforese 2x concentrada (Tris-HCl 125mM pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; DTT 1%; Bromofenol Blue), aquecida à 95°C por 5 minutos e colocada em cada poço do gel *SDS-PAGE* 10%. Após o término da corrida, o gel foi retirado e corado *overnight* com solução corante de coomassie blue (metanol 50%, ácido acético 10% e azul de Coomassie R-250 0,3%). O processo de descoloração do gel foi realizado com solução descolorante (metanol 5%, ácido acético 10%) para uma

melhor visualização das bandas proteicas. Fotos foram tiradas dos géis e as bandas de 50 kDa foram analisadas com o programa ImageJ (NIH).

4.9 Western Blot

Para a análise de *western blot*, foi realizado *SDS-PAGE* 10% com aproximadamente 25 µg de proteína de cada amostra, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após efetuada a eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose no sistema semi-seco de eletrotransferência (Trans-Blot Turbo, BioRad). A membrana de nitrocelulose, assim como o gel, foi previamente incubada com solução Towbin (Tris 25mM pH 8,3, glicina 192mM, 20% de metanol e 1% de SDS) por 15 minutos em agitação. A seguir, foi montado o “sanduiche”, na seguinte ordem: três papéis filtro embebidos em solução Towbin, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida, outros três papéis filtro embebidos em solução, evitando a formação de bolhas. A transferência foi efetuada por 45 minutos com voltagem de 25V e com corrente de 1 A. A membrana foi então incubada com solução de bloqueio - SB (5% de BSA em T-TBS: (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150mM e 0,05% de Tween-20) por 2 horas em agitação e incubação *overnight*. A seguir a membrana foi lavada com solução T-TBS por 15 minutos em agitação e este processo realizado com 3 repetições. Após, a membrana foi incubada *overnight* com anticorpo Anti- α -CaMKII 1:2000 em SB ou Anti-phosphoThr286-CaMKII 1:1000 em SB e no dia seguinte lavada com 3 repetições de solução T-TBS por 15 minutos em agitação. Na sequência, a membrana foi incubada com anticorpo secundário Anti-Rabbit 1:10.000 em SB durante 3 horas em agitação. Após isso, a membrana foi lavada em 3 repetições de 15 minutos com T-TBS e revelada com substrato de fosfatase alcalina (BCIP/NBT). As membranas reveladas foram fotografadas e analisadas no Software ImageJ (NIH livre acesso).

4.10 Análise dos dados e estatística

Os protocolos experimentais foram realizados com 3 a 5 repetições e os resultados foram expressos como média \pm SEM. As diferenças foram analisadas por ANOVA e teste Tukey com $p < 0,05$ indicando significância. Todas as análises de dados foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular e PGO

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, onde as fatias tratadas apenas com hepes-salina (controle) foram consideradas com 100% da viabilidade. As fatias tratadas com dose de 3 μM de METP não apresentaram diferença significativa na viabilidade em relação ao controle, tanto nas estruturas de hipocampo quanto em córtex, diferentemente da dose de 30 μM de METP (Fig. 02). Nesta dose houve aumento significativo da viabilidade, acréscimo de $\pm 30\%$, apenas nas fatias de hipocampo ($p < 0.05$, $n=4$). Já na dose de 300 μM , houve perda expressiva na viabilidade em ambas estruturas, decréscimo de aproximadamente 80%, ($p < 0.05$, $n=4$), podendo quase se comparar a morte celular obtida pelo controle negativo (veneno de *Crotalus durrisus terrificus* - Cdt).

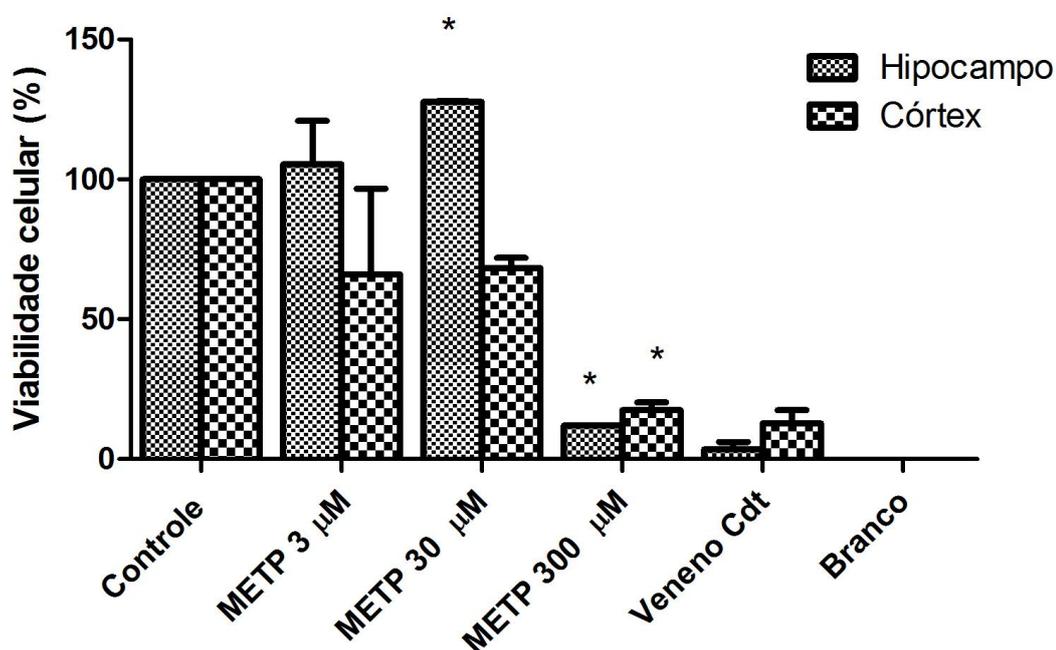


Fig. 02. Tratamento *in vitro* – efeito de diferentes concentrações de METP na viabilidade celular em fatias de hipocampo e córtex de camundongos. Na dose de 30 μM , em hipocampo houve aumento significativo e na dose de 300 μM houve diminuição significativa em ambas estruturas. Controle: fatias tratadas com salina; Veneno Cdt: fatias tratadas com veneno *Cdt*. * $p < 0.05$, $n=4$. Fonte: Autor, 2016.

Foi realizado também teste de viabilidade celular com privação de oxigênio e glicose para que houvesse confirmação na neuroproteção sugerida pelo aumento na

viabilidade observado na dose de 30 μ M de METP. Os resultados gerados no teste de viabilidade celular com privação de oxigênio e glicose, não foram significativos (n=4).

5.2 Experimentos *in vivo*: densitometria eletroforética da CaMKII

A densitometria das bandas eletroforéticas de 50 kDa, de SDS-PAGE 10% em hipocampo (Fig. 03), foi analisada e observou-se que apenas na dose baixa de METP (5mg/kg) houve elevação na densidade em relação ao controle em ambas frações, sobrenadante e pellet (+5,5 e +2,8 pixels respectivamente, $p < 0.05$, n=4) (Fig. 04). Nas amostras tratada com dose alta de METP (30 mg/kg) não houve diferença significativa em ambas frações em relação ao controle.

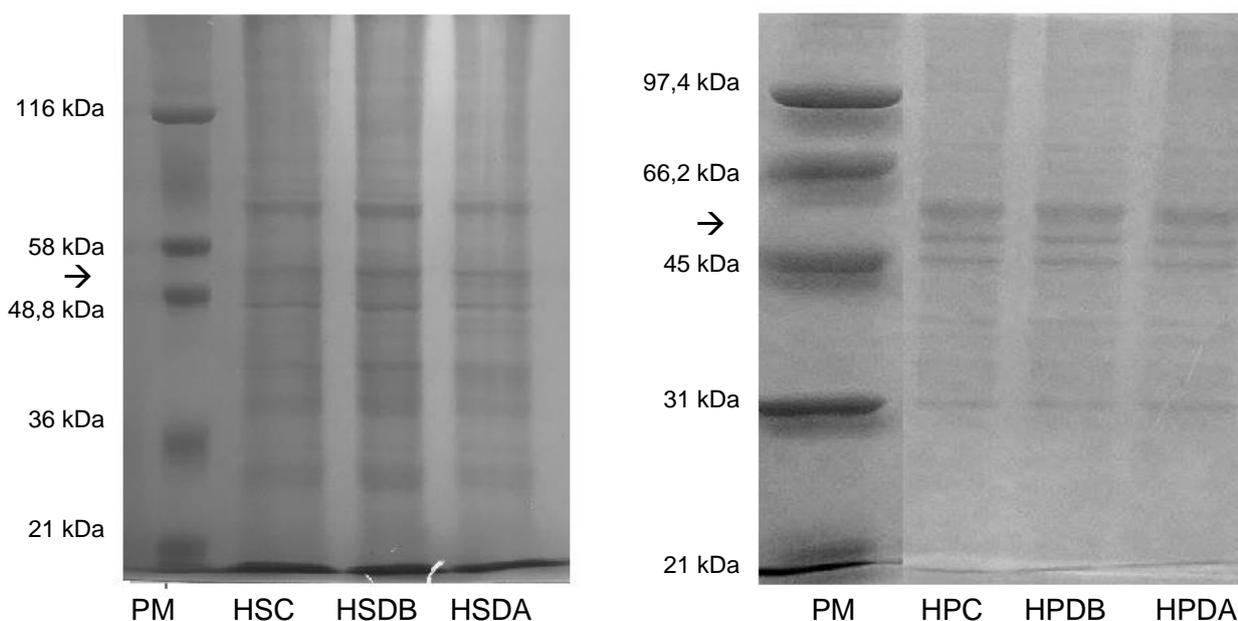


Fig. 03. Perfil eletroforético de hipocampo nas frações sobrenadante e pellet, mostrando a banda de 50 kDa correspondente a CaMKII (seta). PM: Padrão de peso molecular; HSC: Hipocampo sobrenadante controle; HSDB: Hipocampo sobrenadante dose baixa; HSDA: Hipocampo sobrenadante dose alta; HPC: Hipocampo pellet controle; HPDB: Hipocampo pellet dose baixa; HPDA: Hipocampo pellet dose alta. Fonte: Autor, 2017.

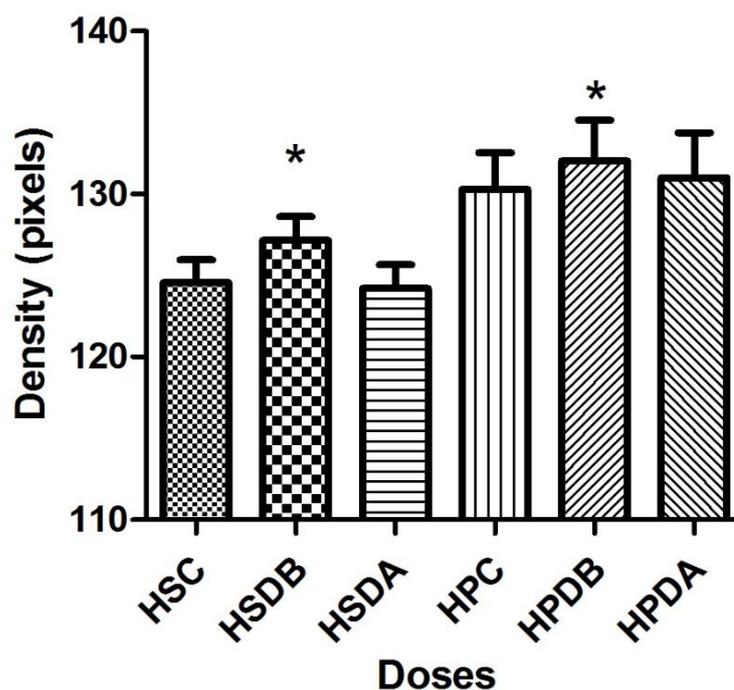


Fig. 04. Efeito das doses de METP na densidade óptica da banda de 50kDa do SDS-PAGE de amostras de hipocampo, analisada por ImageJ (NIH). Foi observado aumento significativo apenas na densidade eletroforética da amostra tratadas com dose baixa. HSC: Hipocampo sobrenadante controle; HSDB: Hipocampo sobrenadante tratado com dose baixa; HSBA: Hipocampo sobrenadante tratado com dose alta; HPC: Hipocampo pellet controle; HPDB: Hipocampo pellet tratado com dose baixa; HPDA: Hipocampo pellet tratado com dose alta. * $P < 0.05$, $n = 4$. Fonte: Autor, 2016.

No tratamento com dose baixa em córtex (Fig. 05), à semelhança das amostras de hipocampo, houve um aumento na densidade das bandas de 50 kDa em ambas frações (+3,2 pixels e 5,3 pixels; $p < 0.05$, $n = 4$). Enquanto que nas amostras tratadas com dose alta houve aumento (4,2 pixels; $p < 0.05$, $n = 4$) na densidade das bandas de 50 kDa apenas em sobrenadante (Fig. 06)

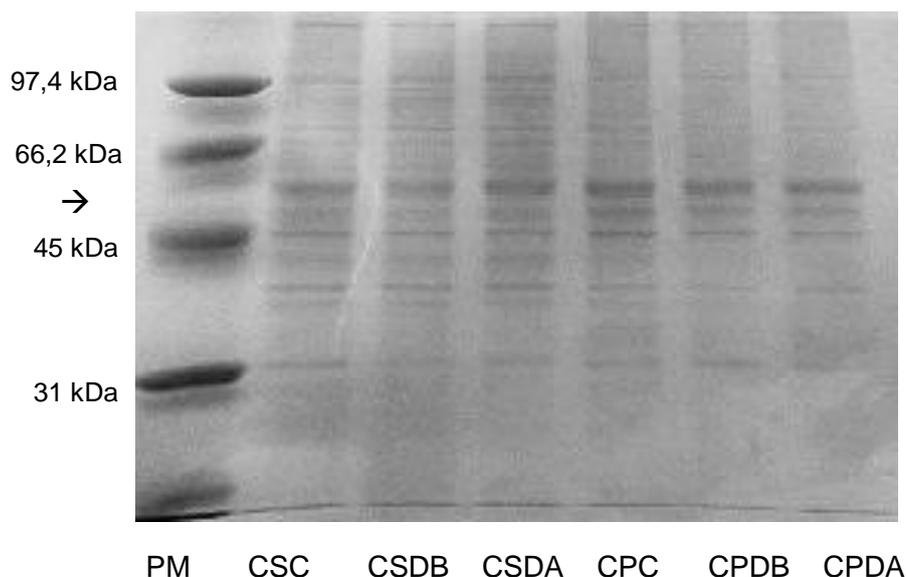


Fig. 05. Perfil eletroforético de córtex, mostrando a banda de 50 kDa correspondente a CaMKII (seta). PM: Padrão de peso molecular; CSC: Córtex sobrenadante controle; CSDB: Córtex sobrenadante dose baixa; CSDA: Córtex sobrenadante dose alta; CPC: Córtex pellet controle; CPDB: Córtex pellet dose baixa; CPDA: Córtex pellet dose alta. Fonte: Autor, 2016.

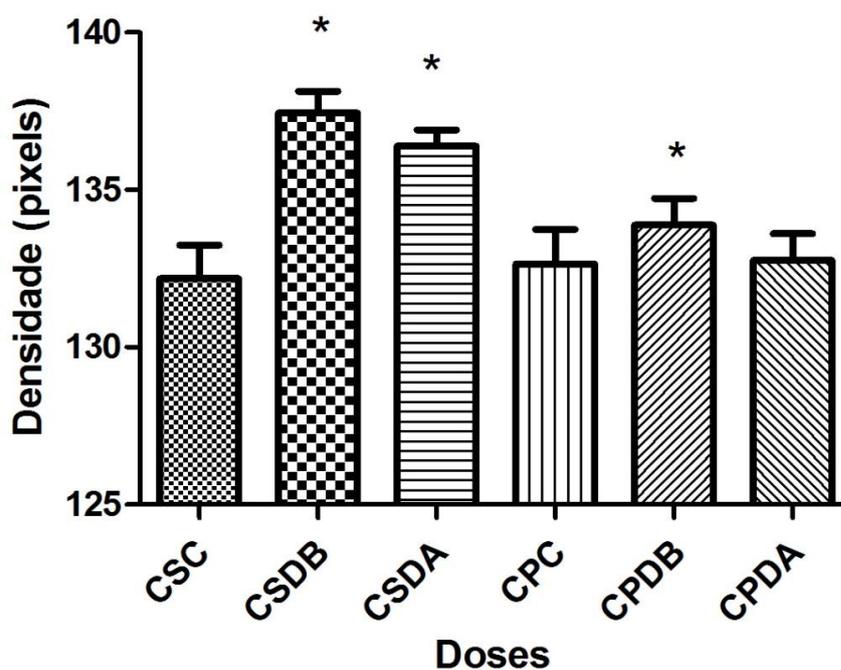


Fig. 06. Efeito das doses de METP na densidade óptica da banda de 50kDa do SDS-PAGE de amostras pellet e sobrenadante de córtex, analisada por ImageJ (NIH). Foi observado aumento significativo na densidade eletroforética nas amostras de sobrenadante dose baixa, sobrenadante dose alta e pellet dose baixa. CSC: Córtex sobrenadante controle; CSDB: Córtex sobrenadante tratado com dose baixa; CSBA: Córtex sobrenadante tratado com dose alta; CPC: Córtex pellet controle; CPDB: Córtex pellet tratado com dose baixa; CPDA: Córtex pellet tratado com dose alta. *P<0.05, n = 4 Fonte: Autor, 2016.

5.3 Experimentos *in vivo*: Western Blot - densitometria do imunoconteúdo da CaMKII

Os dados obtidos pela técnica de western blot, com o anticorpo Anti- α CaMKII (forma total) confirmaram os resultados anteriores de densitometria da banda de 50 kDa em córtex. Nas amostras de córtex de animais tratados com dose baixa e alta (fig. 07), houve aumento do imunoconteúdo da CaMKII em ambas frações (+1970 pixels em sobrenadante e +4202 pixels em pellet). Em hipocampo não foi possível obter resultados satisfatórios de western blot em tempo hábil.

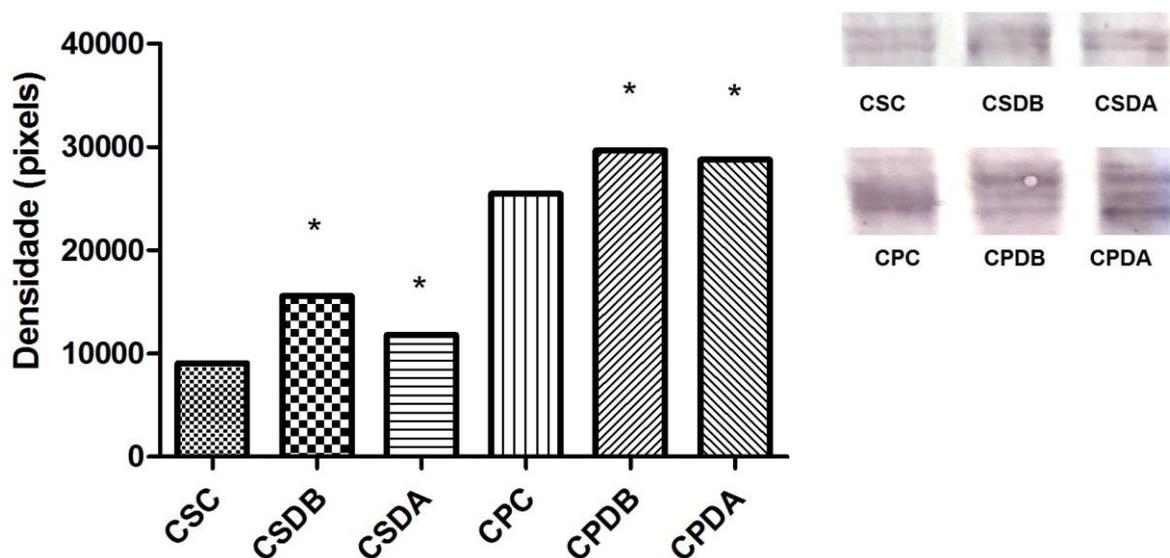


Fig. 07. Imunoconteúdo de CaMKII forma total em córtex na presença de METP. Nas doses baixa e alta houve aumento do imunoconteúdo da forma total de CaMKII nas frações de sobrenadante e pellet. Fonte: Autor, 2017.

As amostras de córtex foram também submetidas a western blot com anticorpo anti-phosphoT286-CaMKII (forma fosforilada), porém não houve diferença significativa entre os tratamentos METP na fração sobrenadante (Fig. 08). Tanto em córtex pellet quanto em hipocampo (ambas frações) não foi possível obter resultados satisfatórios de western blot em tempo hábil.

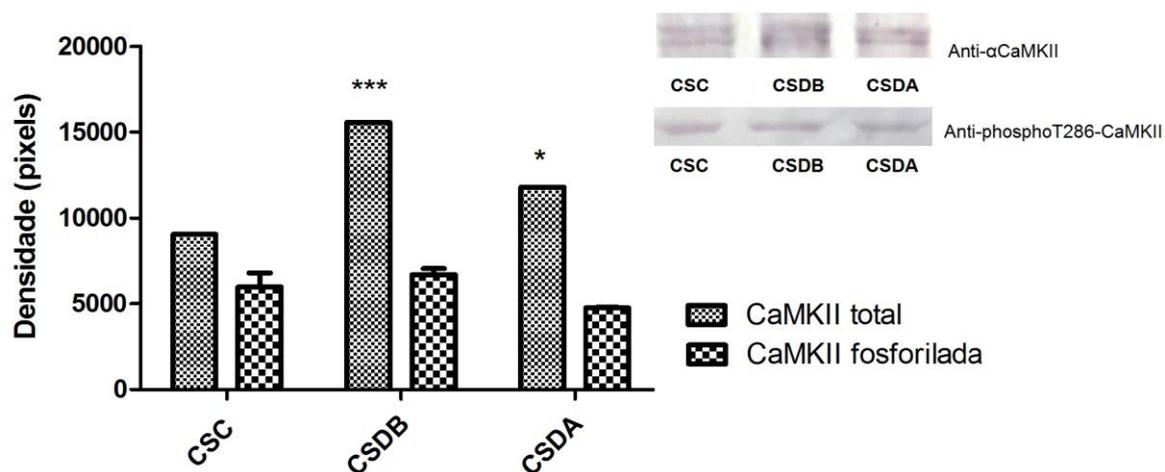


Fig. 08. Imunoconteúdo da forma total de CaMKII e fosforilada em córtex sobrenadante. Foi observado aumento significativo em ambas frações no imunoconteúdo da proteína CaMKII forma total, diferente da forma fosforilada que não houve aumento significativo. N= 2, * p<0,05. Fonte: Autor, 2017.

6 DISCUSSÃO

A Metilprednisolona é um medicamento utilizado abundantemente na indústria farmacológica, tendo uso amplo devido a suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Essa droga atualmente é utilizada globalmente e em diversas faixas etárias, se tornando um importante alvo de estudos. Sua utilização é bastante generalizada, possuindo indicação para tratamentos de asma, reações alérgicas severas, doenças autoimunes, insuficiência renal, esclerose múltipla, entre outros. Embora a utilização de METP seja bastante diversificada, essa droga possui também um elevado número de efeitos colaterais, tendo ação e influência em diferentes mecanismos corporais. Tratamentos com doses altas e por períodos prolongados com METP podem ser relacionados com diversas reações, como hiperglicemia, ganho de peso, insuficiência cardíaca, hipertensão, pancreatite aguda, miopatia aguda, entre outros (PFIZER, 2014).

Além dos efeitos colaterais já citados, os glicocorticoides têm sido reconhecidos por estarem envolvidos na regulação da memória. Seus efeitos dependem da dosagem e tempo de tratamento, tendo um efeito de “U” invertido em relação à consolidação da memória. Enquanto doses baixas a medianas aumentam a memória, doses elevadas tem menor efeito ou até prejudicam (ROOZENDAAL, 2000; QUERVAIN *et al.*, 2009).

Nos experimentos realizados pelo grupo de pesquisa em fisiologia (Uruguaiana), os ratos foram tratados por 10 dias i.p. com salina ou METP nas doses de 5mg/kg ou 30mg/kg e submetidos a treinamento de memória aversiva. A memória do choque persistiu em todos os grupos de animais até 7 dias após o treinamento, porém aos 14 dias após o treino apenas os animais tratados com METP em dose baixa apresentaram a memória aversiva. Os resultados obtidos a partir da eletroforese realizada com as amostras de hipocampo e córtex destes ratos tratados com 5mg/kg METP mostrou que houve aumento da densidade da banda de 50 kDa, podendo este ser associado a um aumento da proteína CaMKII ou de sua mobilidade (maior peso = autofosforilação = maior atividade). Isso sugere que a melhora induzida pelo tratamento com dose baixa de METP durante o teste de memória aversiva, observado nos experimentos provavelmente envolve vias de sinalização como a da CaMKII, uma proteína importante nos modelos moleculares

de formação da memória. Essa hipótese foi confirmada pelo Western Blot realizado em amostras de córtex, detectando uma quantidade maior da proteína CaMKII (anticorpo Anti- α .CaMKII) no tratamento com dose baixa e alta de METP em relação ao controle. O aumento do imunoconteúdo da forma total da CaMKII observado nos tratamentos reflete um aumento da síntese dessa proteína, corroborando Revest (2005).

Em nossas análises utilizando o anticorpo anti-phosphoT286-CaMKII não foi possível observar o esperado aumento da forma fosforilada nas doses baixas. Apesar de termos usado inibidores de fosfatase durante a homogeneização, é importante ressaltar que as estruturas foram armazenadas sem esses inibidores, podendo isto ter resultado em defosforilação da enzima.

O aumento da viabilidade nas fatias de hipocampo tratadas com METP 30 μ M (Fig. 02) sugere um possível efeito neuroprotetor da droga, porém essa hipótese foi descartada após o teste de viabilidade celular com privação de oxigênio e glicose, sendo os resultados da PGO não significativos. O acréscimo excessivo no influxo de cálcio na célula resulta na ativação de enzimas dependentes deste íon, que desempenham processos capazes de causar danos, como proteólise, peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio (MORO et al., 2004). Este efeito explica a diminuição drástica na viabilidade causada no tratamento com a dose 300 μ M de METP. Esses resultados corroboram com os dados obtidos pelo grupo de pesquisa em fisiologia (Uruguaiana), que demonstram que houve aumento de $[Ca^{2+}]_i$ diretamente proporcional a concentração de METP.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste trabalho sugerem que o aumento da memória aversiva induzido pelo tratamento, *in vivo* durante 10 dias, com doses baixas de METP está envolvido com a via de sinalização dependente de cálcio da CaMKII. O aumento do imunoconteúdo da forma total da CaMKII observado nos tratamentos pode estar refletindo um aumento da síntese dessa proteína, provavelmente devido ao aumento da demanda desta via de sinalização.

Os dados *in vitro* com METP indicaram um aumento da viabilidade celular, porém, possivelmente não relacionado com neuroproteção a eventos isquêmicos induzidos pela privação de glicose e oxigênio.

Em nosso laboratório estudos estão sendo realizados utilizando a METP em insetos, visando compreender ainda mais a neurobiologia desse fármaco. O uso de insetos é interessante devido a simplicidade e similaridade de seu sistema nervoso em relação ao de mamíferos, sendo que a espécie de barata *Nauphoeta cinerea* tem demonstrado resultados promissores. Dados preliminares mostram que o tratamento das baratas com METP em doses baixas, promove um aumento no tempo de *grooming* de perna, uma alteração do comportamento do inseto que conhecidamente envolve neurotransmissão octopaminérgica mediada por cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDLIN-SOBOCKI, P.; JONSSON, B.; WITTCHEN, H.; OLESEN, J. Cost of disorders of the brain in Europe. **European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 13, n. 11, p. 1–27, 2006.

BENNETT, M. K.; ERONDU, N. E.; KENNEDY, B. Purification and Characterization of a Calmodulin-dependent Protein Kinase That Is Highly Concentrated in Brain *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 20, p. 12735–12744, 1983.

BEAR, M. F.; CONNERS, B. W.; PARADISO, M. A. Neuroscience: exploring the brain. 3. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p583, 726,727.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.

DAL BELO, C. A.; LUCHO, A. P. DE B.; VINADÉ, L.; et al. In Vitro Antiophidian Mechanisms of Hypericum brasiliense Choisy Standardized Extract : Quercetin-Dependent Neuroprotection. , v. 2013, 2013.

DAL BELO, C. A.; LEITE, G. B.; FONTANA, M. D.; et al. New evidence for a presynaptic action of prednisolone at neuromuscular junctions. **Muscle and Nerve**, v. 26, n. 1, p. 37–43, 2002.

GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; JACOBI, F.; et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 10, p. 718–779, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.08.008>>. .

LISMAN, J. E.; ZHABOTINSKY, A. M. A Model of Synaptic Memory. **Neuron**, v. 31, n. 2, p. 191–201, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301003646>>. .

LISMAN, J.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. THE MOLECULAR BASIS OF CaMKII FUNCTION IN SYNAPTIC AND BEHAVIOURAL MEMORY. **Nature reviews neuroscience**, v. 3, n. 3, p. 175–190, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn753>>. .

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **TiPS**, v. 21, n. June, p. 1999–2001, 2000.

MCGAUGH, L. J.; CAHILL, L.; ROOZENDAAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage : Interaction with other brain systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. November, p. 13508–13514, 1996.

MORO, M. A.; CÁRDENAS, A.; HURTADO, O.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. **Cell Calcium**, v. 36, p. 265–275, 2004.

NISHIUMI, S.; ASHIDA, H. Rapid Preparation of a Plasma Membrane Fraction from Adipocytes and Muscle Cells : Application to Detection of Translocated Glucose Transporter 4 on the Plasma Membrane. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2343–2346, 2007.

OLESEN, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; JO, B. The economic cost of brain disorders in Europe. **European Journal of Neurology**, p. 155–162, 2012.

QUERVAIN, D. J. DE; AERNI, A.; SCHELLING, G.; ROOZENDAAL, B. Frontiers in Neuroendocrinology Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 358–370, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.03.002>>. .

REVEST, J.; BLASI, F. DI; KITCHENER, P.; et al. The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 664–672, 2005.

ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 213–238, 2000.

STRASSER, U.; FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen / glucose deprivation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 57, n. 94, p. 177–186, 1995.

SWAMINATHAN, P. D.; ANDERSON, M. E. Breaking the Cycle of Electrical Storm ? **Circulation**, p. 2183–2187, 2011.

VINADÉ, L.; RODNIGHT, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the Immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. **Brain Research**, v. 732, p. 195–200, 1996.

WAYMAN, G. A.; LEE, Y.; TOKUMITSU, H.; SILVA, A.; THOMAS, R. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. , v. 59, n. 6, p. 914–931, 2009.

WOSTYN, P.; AUDENAERT, K.; PAUL, P.; DEYN, D. Alzheimer ' s disease-related changes in diseases characterized by elevation of intracranial or intraocular pressure. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 110, p. 101–109, 2008.