

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Joseane Righes Marafiga**

**EFEITO DIFERENCIAL DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA  
ENZIMA Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase NO HIPOCAMPO E CÓRTEX ENTORRINAL**

Santa Maria, RS  
2016

**Joseane Righes Marafiga**

**EFEITO DIFERENCIAL DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase NO HIPOCAMPO E CÓRTEX ENTORRINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marafiga, Joseane Righes

Efeito diferencial do diazepam sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no hipocampo e córtex entorrinal / Joseane Righes Marafiga.- 2016.

88 f.; 30 cm

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 2. receptor GABA-A 3. diazepam, flumazenil 4. cloreto 5. hipocampo, córtex I. Mello, Carlos Fernando de II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Joseane Righes Marafiga. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: josimarafiga@gmail.com

**Joseane Righes Marafiga**

**EFEITO DIFERENCIAL DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase NO HIPOCAMPO E CÓRTEX ENTORRINAL**

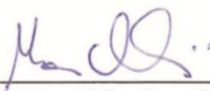
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

**Aprovado em 29 de novembro de 2016:**



---

**Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)**



---

**Ângelo Luis Stapassoli Piato Dr. (UFRGS)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria, e minha irmã, Caroline, que sempre me apoiaram, e não pouparam esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por Ele guiar meus passos e me iluminar todos os dias, pelas pessoas que colocou em meu caminho, pessoas que me inspiram, e me encorajam a ser cada dia melhor. Por todas as coisas boas e más que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei, e me fizeram ser quem eu sou.

À minha família, pelo apoio e suporte ao longo de toda minha formação, especialmente à minha mãe Maria, por mostrar o quanto é importante buscar o que se sonha, e por dedicar sua vida à minha vida; ao meu pai Gelson, que ao seu modo, sempre me incentivou; e à minha irmã, Caroline, por me compreender e ajudar a cada dia.

Às minhas eternas amigas Lidiane e Patrícia, que me apoiaram incondicionalmente. Nunca esquecerei do abraço amigável, da palavra que me confortou, e de todos os planos que compartilhamos ao longo da vida, sem vocês eu não suportaria!

Às minhas queridas amigas Nilve, Grazi, Camila e Ana, pela amizade e companheirismo, pelos vários momentos felizes e de aprendizado, e por serem tão compreensivas nos meus momentos de ausência. Vocês são demais!

Ao professor Carlos, que há seis anos me deu a oportunidade que mudaria completamente minha vida. Sou grata pelos laços sinceros que criamos, pelos seus ensinamentos científicos, pelas conversas filosóficas e reflexivas, pelo incentivo a cada dia não tão motivador, pelo apoio diante das minhas incertezas. Agradeço por tudo!

Ao professor Mauro Schneider Oliveira, por ser um professor excepcional, por ser sempre prestativo, e pelo tempo que dispôs para me ensinar e ajudar.

Aos amigos que o LabNeuro me presenteou desde a iniciação científica, pelo companheirismo, compreensão, apoio e alegria. Obrigada pela amizade, por fazerem parte da minha formação e da minha vida.

À Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar um ensino de qualidade e por garantir o acesso universal ao conhecimento.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Farmacologia que contribuíram para a minha formação como mestre.

À Capes pela bolsa de estudos.

À todos que de alguma forma me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

## RESUMO

### EFEITO DIFERENCIAL DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase NO HIPOCAMPO E CÓRTEX ENTORRINAL

AUTOR: Joseane Righes Marafiga

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

A enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, ou bomba de sódio, é expressa na membrana plasmática de células eucarióticas, onde atua como principal regulador da homeostase iônica intracelular. A enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é ativada pelos íons  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  e evidências indicam que a atividade total da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é inibida por ânions. Entretanto, o efeito do fluxo de cloreto induzido farmacologicamente sobre a atividade das subunidades  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2/3}$  da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase ainda não foi investigado. Neste estudo, nós investigamos o efeito do diazepam, um modulador alostérico positivo do receptor  $\text{GABA}_A$  na atividade específica das subunidades  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2/3}$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Fatias de hipocampo e de córtex entorrinal foram incubadas com diazepam (0; 0,05; 0,15 ou 0,5  $\mu\text{M}$ ) e/ou flumazenil (0; 0,005, 0,015; 0,05; 0,15; 0,5 ou 1,5  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos. Após a incubação, as fatias foram homogeneizadas e a atividade das subunidades  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2/3}$  da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi determinada. Diazepam diminuiu 50% a atividade da subunidade  $\alpha_{2/3}$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo, mas não alterou a atividade da enzima em córtex entorrinal. O efeito do diazepam foi prevenido por flumazenil, indicando que a diminuição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase envolveu a ativação dos receptores  $\text{GABA}_A$ . Além disso, a baixa concentração de cloreto no meio de incubação aboliu a diminuição da atividade enzimática induzida por diazepam. Nossos dados sugerem que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo é sensível a efeitos farmacológicos dos benzodiazepínicos por meio de mecanismos ativados por receptores  $\text{GABA}_A$ .

**Palavras-chave:** *bomba de sódio.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. receptor  $\text{GABA}_A$ . diazepam. flumazenil. cloreto. hipocampo. córtex.*

## ABSTRACT

### DIFFERENTIAL EFFECT OF DIAZEPAM ON Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS AND ENTORRHINAL CORTEX

AUTHOR: Joseane Righes Marafiga

ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is ubiquitously expressed in the plasma membrane of all animal cells where serves as the principal regulator of intracellular ion homeostasis. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is activated by Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> and current evidence indicates that total Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is, in general, inhibited by anions. However, the effect of pharmacologically-induced Cl<sup>-</sup> flux on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is not established. In this study we investigated the effect of diazepam, a GABA<sub>A</sub> receptor positive allosteric modulator, on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Hippocampal and cortical slices were incubated with diazepam (0, 0.05, 0.15 or 0.5  $\mu$ M) and/or flumazenil (0, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5 or 1.5  $\mu$ M) for 10 minutes. After incubation the slices were homogenized and  $\alpha_1$  and  $\alpha_{2/3}$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity were assayed using ouabain 3  $\mu$ M (that inhibits  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase) and 4 mM (that inhibits both isoforms). Diazepam caused a 50% decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus, but did not alter enzyme activity in the entorhinal cortex. The effect of diazepam was prevented by flumazenil, indicating that the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase was involved GABA<sub>A</sub> receptors. Furthermore, a low chloride medium abolished the diazepam-induced decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Our data suggests that Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus is sensitive to the pharmacological effects of a benzodiazepine by GABA<sub>A</sub> receptor-mediated mechanisms.

**Keywords:** *sodium pump. GABA<sub>A</sub> receptor. diazepam. flumazenil. chloride ion. hippocampus. entorhinal cortex.*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Prêmio Nobel de Química, 1997: Jeans C. Skou .....	16
Figura 2 Esquema representativo da estrutura da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	17
Figura 3 Conformação E <sub>1</sub> e E <sub>2</sub> da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	20
Figura 4 Esquema integrado do ciclo funcional da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	21
Figura 5 GABA <i>shunt</i> .....	28
Figura 6 Sistema gabaérgico e receptores associados .....	29
Figura 7 Receptor GABA <sub>A</sub> .....	31
Figura 8 Principais combinações das subunidades do receptor GABA <sub>A</sub> .....	32
Figura 9 Estrutura do receptor GABA <sub>B</sub> .....	33

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
$[Na^+]_i$	Concentração de sódio intracelular
$[Cl^-]_i$	Concentração de cloreto intracelular
ADT	Adenosina Difosfato
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina Trifosfato
BDZ	Benzodiazepínico
$Cl^-$	Cloreto
GABA	cido $\gamma$ -aminobutírico
GABA-T	Gaba-transaminase
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
$K^+$	Potássio
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$Mg^{2+}$	Magnésio
$Na^+$	Sódio
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
RPD	Receptor periférico de benzodiazepínicos
SNC	Sistema Nervoso Central
SSADH	Desidrogenase do semialdeído succínico
VGAT	Transportador vesicular do ácido $\gamma$ -aminobutírico
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	ENZIMA Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	15
2.1.1.	<b>Descoberta</b> .....	15
2.1.2.	<b>Aspectos Estruturais da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</b> .....	16
2.1.3.	<b>Classificação</b> .....	18
2.1.4.	<b>Aspectos Funcionais da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</b> .....	18
2.1.5.	<b>Regulação da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</b> .....	22
2.2.	<b>ÁCIDO <math>\gamma</math> AMINO-BUTÍRICO (GABA)</b> .....	25
2.2.1.	<b>História</b> .....	25
2.2.2.	<b>Síntese e Metabolismo</b> .....	27
2.2.3.	<b>Receptores GABAérgicos</b> .....	30
2.2.3.1.	<i>Receptores GABA<sub>A</sub></i> .....	30
2.2.3.2.	<i>Receptores GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub></i> .....	32
2.3.	<b>BENZODIAZEPÍNICOS</b> .....	34
2.3.1.	<b>Descoberta Dos BDZs</b> .....	34
2.3.2.	<b>Farmacocinética dos BDZs</b> .....	36
2.3.3.	<b>Farmacodinâmica dos BDZs</b> .....	38
2.3.3.1.	<i>Efeitos farmacodinâmicos dos BDZs</i> .....	38
2.3.3.1.1.	Agonistas .....	39
2.3.3.1.2.	Agonistas Inversos .....	39
2.3.3.1.3.	Antagonistas .....	40
2.3.4.	<b>BDZs e receptores GABA<sub>A</sub></b> .....	40
3.	<b>HIPÓTESE</b> .....	42
4.	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
4.1.	OBJETIVO GERAL .....	43
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
5.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
5.1.	ANIMAIS .....	43
5.2.	PREPARAÇÃO DAS FATIAS .....	43
5.2.1.	<b>Experimento 1: Efeito do diazepam e flumazenil sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em fatias hipocampais e corticais</b> .....	44
5.2.2.	<b>Experimento 2: Efeito do flumazenil sobre a diminuição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida por diazepam em fatias hipocampo</b> .....	44
5.2.3.	<b>Experimento 3: Efeito da redução de cloreto no meio sobre diminuição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida por diazepam</b> .....	44
5.3.	ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	45
6.	<b>MANUSCRITO</b> .....	46
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
	<b>APÊNDICE A - EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase EM FATIAS CORTICAIS</b> .....	83
	<b>APÊNDICE B - EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA Mg<sup>+</sup>-ATPase EM FATIAS DE HIPOCAMPO E CÓRTEX ENTORRINAL</b> .	84
	<b>APÊNDICE C - EFEITO DO FLUMAZENIL SOBRE A ATIVIDADE DA Mg<sup>+</sup>-ATPase EM FATIAS DE HIPOCAMPO</b> .....	85

<b>APÊNDICE D - ATIVIDADE DA Mg<sup>+</sup>-ATPase NO ENSAIO DE PREVENÇÃO DO EFEITO DO DIAZEPAM POR FLUMAZENIL .....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE E - EFEITO DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO SOBRE A ATIVIDADE DA Mg<sup>+</sup>-ATPase EM FATIAS DE HIPOCAMPO.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE F - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA .....</b>	<b>88</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em tópicos, a saber: **Introdução, Revisão Bibliográfica, Objetivos, Materiais e Métodos, Manuscrito, Conclusão e Referências Bibliográficas**. No manuscrito são apresentadas as seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências.

## 1. INTRODUÇÃO

A enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, também denominada bomba de Sódio ou bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , é uma proteína transmembrana localizada na membrana plasmática de células eucarióticas. A sua função é bombear três íons  $\text{Na}^+$  para fora, e dois íons  $\text{K}^+$  para dentro da célula (SKOU, 1957). Essa enzima é responsável pela manutenção do potencial de repouso de células gliais e neurais (DAGER; SWANN, 1996; HORISBERGER, 2004; TRACHTENBERG; PACKEY; SWEENEY, 1981), regulação do volume celular, controle do pH, transporte ativo secundário de íons ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ), substratos (glicose e aminoácidos) e neurotransmissores através da membrana plasmática (BLANCO; MERCER, 1998; DOBRETSOV; STIMERS, 2005). Além disso, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase possui um importante papel no reestabelecimento do potencial de membrana após a despolarização neuronal (BLANCO; MERCER, 1998; SKOU, 1957).

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um heterotrímero ( $\alpha_{1-4}$ ,  $\beta_{1-3}$  and  $\gamma$ ), e as propriedades cinéticas das suas isoformas são mantidas principalmente pela subunidade catalítica  $\alpha$ . A subunidade catalítica da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é expressa em várias isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ), e a sua expressão pode diferir em vários tecidos (BLANCO; SANCHEZ; MERCER, 1998; MATCHKOV; KRIVOI, 2016). No SNC,  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são denominadas isoformas “housekeeping”, enquanto a isoforma  $\alpha_3$  é predominantemente ativada em situações envolvendo atividade neuronal elevada (CONTO; VENDITTI, 2012; JEWELL; LINGREL, 1991). Na medida em que ocorrem despolarizações celulares e disparos de potenciais de ação, os gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  são dissipados. Dentro dessas condições, enquanto as isoformas  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  trabalham em condições saturantes, a isoforma  $\alpha_3$  pode ser ativada (BLANCO; MERCER, 1998) protegendo os neurônios contra o aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  e  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e perda do gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  (HOLM, et al., 2016). A subunidade  $\alpha_1$  é expressa em todas as células, enquanto a subunidade  $\alpha_2$  é abundantemente expressa em células cerebrais gliais (PENG; MARTIN-VASALLO; SWEADNER, 1997; SWEADNER, et al., 1994). A subunidade  $\alpha_3$  é expressa em neurônios (PENG; MARTIN-VASALLO; SWEADNER, 1997; SWEADNER, 1992), e a subunidade  $\alpha_4$  é encontrada somente em testículos (SARJA, et al., 2004; WOO; JAMES; LINGREL, 2000).

O mal funcionamento da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase tem sido associado com hiperexcitabilidade neuronal, despolarização celular excessiva (LEES, 1991), convulsões e morte neuronal (FIGHERA, et al., 2006; FURIAN, et al., 2007; JAMME, et al., 1995; OLIVEIRA, et al., 2009). Além disso, a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é reduzida nos modelos

experimentais de epilepsia (BRINES, et al., 1995; FERNANDES; NAFFAH-MAZZACORATTI; CAVALHEIRO, 1996; VAILLEND, et al., 2002) e em tecido hipocampal *post-mortem* de pacientes com epilepsia (GRISAR; DELGADO-ESCUETA, 1986). De fato, mutações em genes que codificam a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase estão associadas a epilepsia (BENARROCH, 2011; BOTTGER; DOGANLI; LYKKE-HARTMANN, 2012; HEINZEN, et al., 2014; KINOSHITA, et al., 2014).

A atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é regulada por diversos mecanismos. A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é inibida por glicosídeos cardíacos e estimulada pelo aumento da concentração de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (MACGREGOR SE.; JM., 1993). Além disso, ânions liotrópicos como cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ), tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ), e perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ), bem como seus respectivos sais de sódio, diminuem a atividade da enzima (GANEVA, et al., 1999; NORBY; ESMANN, 1997). Os mecanismos pelos quais esses ânions diminuem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase decorrem da alteração do equilíbrio entre as duas conformações da enzima (KLODOS; FEDOSOVA; PLESNER, 1995; KLODOS; PLESNER, 1992; POST; SUZUKI, 1991); a conformação  $E_1$  que realiza a troca de três íons  $\text{Na}^+$  contra dois íons  $\text{K}^+$  no lado citoplasmático, e a conformação  $E_2$  no lado extracelular, com o aumento da afinidade da enzima pelos íons potássio, bombeando-os para dentro da célula (APELL, 2003; PAVLOV; SOKOLOV, 2000).

Efeitos eletrostáticos nas proteínas são importantes para manter sua estrutura, bem como a sua estabilidade e função biológica, especialmente nas enzimas, que desempenham um papel decisivo no reconhecimento do substrato e na estabilização dos estados de transição (ALLEWELL; OBEROI, 1991; MARSHALL, et al., 1999; MATTHEW, 1985). Evidências sugerem que o funcionamento da bomba de sódio pode ser acelerado quando o interior da célula é mais positivo, e o efeito inibitório do  $\text{Na}^+$  no meio extracelular torna-se pronunciado somente quando o potencial de membrana é negativo (DE WEER, 1994). Dessa forma, confirma-se o fato de que, como esperado para os processos eletrogênicos, a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é sensível às alterações no potencial de membrana.

Tem sido proposto que alterações nos gradientes de  $\text{Cl}^-$  desencadeiam uma diminuição da eficácia de diversos benzodiazepínicos na interrupção de crises epiléticas (STALEY, 1992). A diminuição da  $[\text{Cl}^-]_i$ , já foi descrita durante o *Status Epilepticus* (KAPUR E COULTER, 1995; LEE et al., 2010). Além disso, estudos recentes mostram que o aumento da  $[\text{Cl}^-]_i$  facilita crises convulsivas (KELLEY, et al., 2016; KRISHNAN; BAZHENOV, 2011). Dessa forma, as alterações nas concentrações de  $\text{Cl}^-$ , responsáveis pela diminuição da eficácia dos BDZs e pela propagação de crises, comprometem o equilíbrio entre excitação e inibição

do SNC (CROWLEY, et al., 2016), e conseqüentemente podem interferir nos mecanismos regulatórios da atividade elétrica cerebral, como o funcionamento da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (BLANCO; MERCER, 1998; HORISBERGUER, 2004). Entretanto, permanece desconhecido se o fluxo iônico de cloreto desencadeado pela ativação farmacológica do receptor  $\text{GABA}_A$  altera a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Este estudo é de extrema importância, uma vez que alterações nos gradientes de  $\text{Cl}^-$  parecem estar envolvidas na duração e modulação de crises epiléticas, e a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, por desempenhar uma importante função na regulação da excitabilidade cerebral, pode estar associada a este processo por meio da diminuição da sua atividade.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. ENZIMA $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase**

#### **2.1.1. Descoberta**

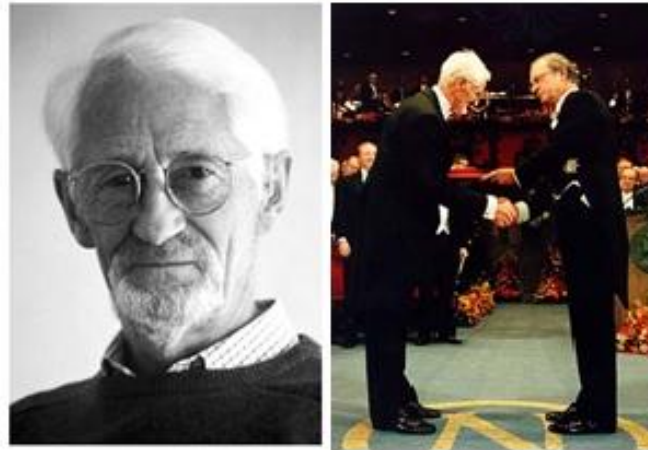
A existência de um transportador de sódio na membrana plasmática de células de mamíferos foi proposta por Dean em 1941, o qual introduziu o termo “bomba” a fim de explicar a distribuição assimétrica de cátions (MOBASHERI, et al., 2000). Após 20 anos, estudos em axônios evidenciaram a existência de um transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através de axolema (CALDWELL; KEYNES, 1960).

Em 1997, o pesquisador dinamarquês Jeans C. Skou foi agraciado com o Prêmio Nobel de Química pela descoberta da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Figura 1). Skou foi o primeiro a sugerir, em 1957, uma ligação entre o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática e a ativação de ATPases por esses íons em nervos de caranguejo (SKOU, 1957). Esta descoberta foi determinante para futuras pesquisas sobre os aspectos estruturais e funcionais da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. No entanto, a grande disponibilidade de evidências sobre a enzima ainda são insuficientes, uma vez que o conhecimento dos mecanismos de regulação da atividade da bomba não foram completamente elucidados.



Figura 1: Prêmio Nobel de Química, 1997: Jens C. Skou.

Em 1957, o pesquisador descobriu uma bomba biológica ( $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ ) responsável pelo transporte de íons através da membrana plasmática.



Fonte: Modificado de "Jens C. Skou-Facts". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 16 Nov 2016.

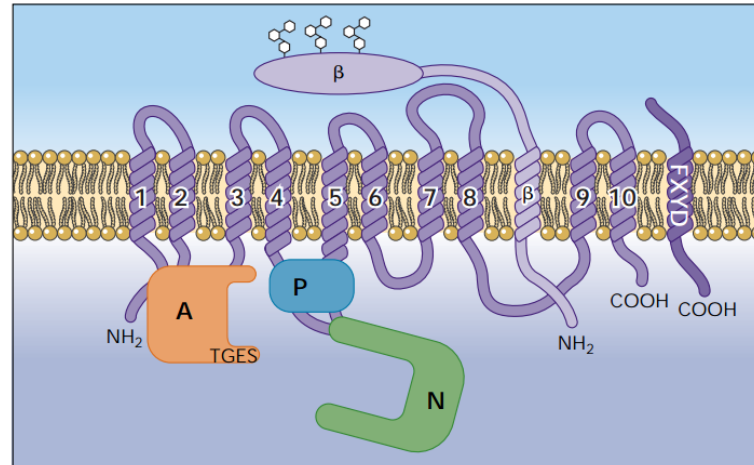
### 2.1.2. Aspectos estruturais da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$

A  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  é um complexo proteico heterotrimérico de membrana plasmática, contendo as subunidades: alfa, beta e gama (KAPLAN, 2002).

A subunidade  $\alpha$  é composta por aproximadamente 1000 aminoácidos, com 10 segmentos transmembranares, e possui massa molecular aproximadamente de 112 kDa., sendo responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte de íons (MATCHKOV; KRIVOI, 2016). A subunidade  $\beta$ , de massa molecular 35 kDa, é uma subunidade regulatória essencial para a atividade enzimática da bomba e pode estar envolvida na modulação da afinidade de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Na}^+$ . Na subunidade  $\alpha$  são reconhecidas 4 isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ) e três isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ), as quais adquirem várias combinações  $\alpha\beta$  nos diferentes tecidos, com características distintas, nomeadamente com diferentes sensibilidades para os íons (MATCHKOV; KRIVOI, 2016). A subunidade  $\gamma$  é pertencente à família FXYD, com massa molecular de aproximadamente 7 kDa, tem uma importante para a função da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  (BLANCO; MERCER, 1998), pois ao associar-se com o complexo  $\alpha\beta$  modula a atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  (Figura 2) (MATCHKOV; KRIVOI, 2016).

Figura 2: Esquema representativo da estrutura da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

A subunidade  $\alpha$  formada com as 10 hélices das transmembrana e os domínios intracelular (A, P, N). O domínio A atua na desfosforilação, o domínio P na fosforilação e o nucleotídeo N atua no encaixe do ATP. A subunidade  $\beta$ , com o domínio extracelular, e com sua terminação  $\text{NH}_2$  intracelular.



Fonte: Modificado de HORISBERGER, 2004.

A subunidade  $\alpha$  contém os locais de ligação do  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, e glicosídeos cardíacos, uma classe de compostos naturais, que engloba inibidores específicos da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (LINGREL, et al., 2003). A isoforma  $\alpha_1$  é expressa em todos os tecidos. A isoforma  $\alpha_2$  é abundantemente expressa no músculo esquelético, coração, cérebro, tecido adiposo, músculo liso vascular e tecido ocular, enquanto a isoforma  $\alpha_3$  é encontrada quase que, exclusivamente, nos neurônios, podendo também ser encontrada em leucócitos e células cardíacas de algumas espécies (DOSTANIC-LARSON, et al., 2006; LINGREL, et al., 2003). A isoforma  $\alpha_4$  é especificamente sintetizada durante a espermatogênese, e encontrada em testículos (DOSTANIC-LARSON, et al., 2006; SARJA, et al., 2004; WOO; JAMES; LINGREL, 2000). Além disso, a subunidade  $\alpha$  contém os sítios para fosforilação por PKA (serina 943 em  $\alpha_1$ - $\alpha_3$ ) e PKC (serina 23 em  $\alpha_1$ ), alvos importantes para regulação da atividade e expressão na membrana plasmática da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (POULSEN, et al., 2010).

A subunidade  $\beta$  tem um papel fundamental na maturação estrutural e funcional da subunidade catalítica  $\alpha$ . Sabe-se que a subunidade  $\beta$  tem duas funções principais: é responsável pela elevada afinidade pelos cátions e protege a subunidade  $\alpha$  contra a degradação celular por proteólise (HORISBERGER, 2004).

### 2.1.3. Classificação

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um membro da família de P-ATPases, um grupo de proteínas de membrana, caracterizadas por um número específico de sequências relacionadas com sua função hidrolítica de ATP e a presença de domínios hidrofóbicos (6-10) predizendo a forma das alfa-hélices transmembrana. Vários tipos de P-ATPases são encontradas em todas as formas de vida a partir de *Archaea* em eucariontes (HORISBERGER, 2004).

A análise filogenética das sequências disponíveis de P-ATPases permitiram a definição de cinco grupos principais, denominadas como grupos I-V. De acordo com a classificação, a subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, em conjunto com as duas subunidades da  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase, formam o subgrupo IIc (HORISBERGER, 2004).

O subgrupo IIc é caracterizado pela presença de uma glicoproteína com aproximadamente 40 kDa, associado com a subunidade  $\beta$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A associação co-translacional da subunidade  $\beta$  é absolutamente necessária para a maturação, segmentação, estabilidade e expressão funcional destas proteínas, porém a função de transporte catalítico é referida somente a subunidade  $\alpha$ . Recentemente, um grupo de sete proteínas, denominadas "proteínas FXYP" foram identificadas. Uma destas proteínas (FXYP<sub>2</sub>) tem sido associada com a subunidade gama da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, mas a maioria das proteínas tem demonstrado associação com a subunidade  $\alpha$  e a subunidade  $\beta$  da enzima (HORISBERGER, 2004).

### 2.1.4. Aspectos funcionais da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase consiste em um sistema de transporte ativo responsável pela manutenção dos gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática. A manutenção desses gradientes é fundamental para que sejam efetuadas diversas funções celulares, como controle do potencial de membrana, volume celular, pH e níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, através de trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ , respectivamente; e também apresenta uma variedade de processos secundários, como por exemplo, o transporte de glicose e de aminoácidos dependentes de  $\text{Na}^+$  (BLANCO; MERCER, 1998).

Dessa forma, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é alvo de múltiplos mecanismos de regulação, sendo ativada em resposta a mudanças na homeostase celular. O papel crucial da bomba é refletido na energia investida nas reações que compõem seu mecanismo de funcionamento no cérebro: cerca de 75% da energia total consumida de um ser humano em repouso. Os principais

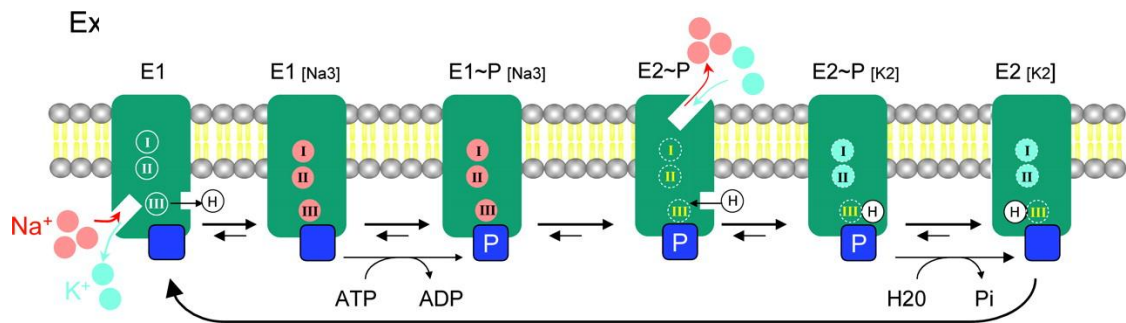
exemplos são as alterações na atividade da bomba de sódio que ocorrem em resposta a estímulos fisiológicos, tais como a propagação de impulsos nervosos, exercício e mudanças na dieta (LEHNINGER, 2004). A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase também está sujeita a mecanismos de regulação de curto e longo prazo, mediados por hormônios, tais como aldosterona, dopamina, norepinefrina e insulina (VINCIGUERRA, et al., 2005). A regulação de curto prazo envolve efeitos diretos sobre o comportamento cinético da enzima ou sobre a translocação de moléculas da enzima entre a membrana plasmática e reservatórios intracelulares, enquanto os mecanismos de regulação de longo prazo geralmente afetam a síntese *de novo* ou a degradação da enzima (THERIEN; BLOSTEIN, 2000).

No cérebro, a diminuição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase afeta criticamente a liberação de neurotransmissores, da atividade neuronal e também o comportamento animal (MOSELEY, et al., 2007). Neste contexto, a ouabaína, um importante inibidor da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de ratos (FUJISAWA, et al., 1965), causando convulsões em camundongos (JAMME, et al., 1995), a liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de  $\text{Na}^+$  (LI, S.; STYS, 2001), e a morte celular no hipocampo de ratos (LEES, 1991). Além disso, a supressão genética da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causa prejuízo ao aprendizado espacial e aumento no comportamento típico de ansiedade em camundongos (MOSELEY, et al., 2007). Também é importante mencionar que a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase diminui no cérebro *post-mortem* de pacientes com epilepsia (GRISAR; GUILLAUME; DELGADO-ESCUETA, 1992) e que as mutações nos genes que codificam a subunidade  $\alpha$  estão associadas com epilepsia em humanos (BENARROCH, 2011; BOTTGER; DOGANLI; LYKKE-HARTMANN, 2012; HEINZEN, et al., 2014; KINOSHITA, et al., 2014). Além disso, o grau de inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzido pela administração intracerebral de ácido metilmalônico ou de ácido glutárico se correlaciona positivamente com a duração das convulsões induzidas por estes agentes (FIGHERA, et al., 2006; FURIAN, et al., 2007), reforçando a importância da inibição da atividade  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em crises convulsivas.

A reação básica catalisada pela  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é o transporte de três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e de dois íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular, usando energia proveniente da hidrólise de uma molécula de ATP (Figura 3). A enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode assumir duas conformações principais,  $E_1$  e  $E_2$ , com os sítios de ligação voltados para dentro da célula e para fora da célula, respectivamente. Quando no estado  $E_1$ , a bomba tem alta afinidade com os

íons de sódio ( $\text{Na}^{3+}$ ) e, portanto, tende a se ligar a eles. Por outro lado, no estado  $\text{E}_2$ , a bomba tem alta afinidade com os íons de potássio ( $\text{K}^{2+}$ ) no meio extracelular (KAPLAN, 2002).

Figura 3: Conformação  $\text{E}_1$  e  $\text{E}_2$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.



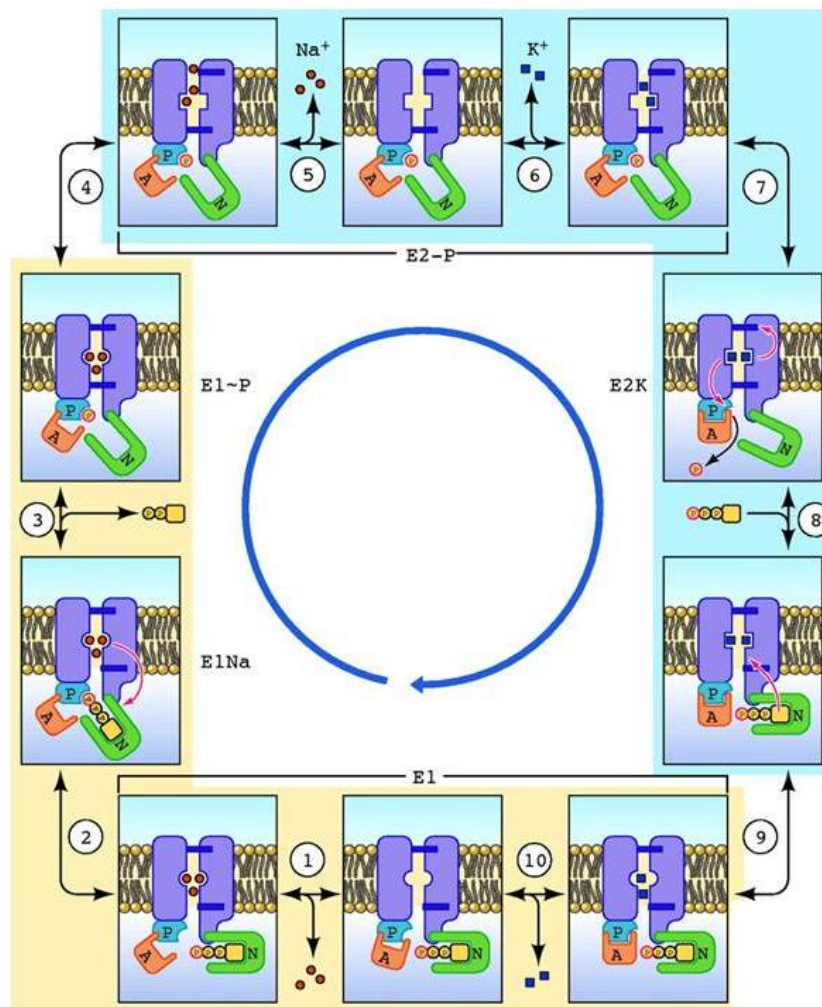
Fonte: Modificado de Nature, Reviews. Disponível em: <http://www.nature.com/nrn/journal/v9/n5/images/nrn2370-f1.jpg>

O mecanismo de bombeamento dos íons pela  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é fundamentado em estruturas de alta resolução encontradas para a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase em diferentes estados conformacionais e pode ser utilizado para a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase devido ao alto grau de homologia entre as P-ATPases (HORISBERGER, 2004; KAPLAN, 2002). De acordo com o modelo proposto por Horisberger (2004) (Figura 4), a enzima na forma  $\text{E}_1\text{ATP}$  apresenta seus domínios citoplasmáticos A, N e P afastados (etapa 1). Após a ligação dos três íons  $\text{Na}^+$  extracelulares aos seus sítios com alta afinidade, ocorre uma mudança de conformação importante. Após uma grande rotação, o domínio N posiciona o fosfato  $\gamma$  do ATP próximo ao sítio de fosforilação (etapa 2). A hidrólise do ATP é acoplada a transferência do fosfato  $\gamma$  para o resíduo de aspartato que sofre fosforilação durante o ciclo reacional, dando origem à forma  $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na}^+)$  (etapa 3), induzindo uma mudança conformacional no interior do domínio transmembrana, resultando no fechamento do canal transiente e oclusão dos íons  $\text{Na}^+$  ligados à enzima (SORENSEN; MOLLER; NISSEN, 2004). Durante o ciclo catalítico, este estado de alta energia  $\text{E}_1\text{P}(3\text{Na}^+)$  é rapidamente convertido em  $\text{E}_2\text{P}(2\text{Na}^+)$  (etapa 4). Concomitantemente à conversão de  $\text{E}_1$  para  $\text{E}_2$  ocorre a exposição dos sítios de ligação de cátions para o meio extracelular. A redistribuição dos grupos diminui a afinidade pelo  $\text{Na}^+$ , e a liberação do primeiro  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular provoca um rearranjo do canal liberando os outros dois íons  $\text{Na}^+$  (etapa 5). O sítio de ligação de cátions da forma  $\text{E}_2\text{P}$  é então ocupado por dois íons  $\text{K}^+$  extracelulares (etapa 6), resultando na desfosforilação do domínio P e na

oclusão dos íons ligados, devido ao fechamento do canal transiente voltado para o meio extracelular (etapa 7).

A ligação de uma nova molécula de ATP ao domínio N (etapa 8) promove o afastamento dos domínios N e P, que induz uma movimentação dos segmentos transmembrana da molécula, resultando na abertura do canal transiente e liberando o acesso aos sítios de ligação e cátions no meio intracelular. Um rearranjo dos grupos importantes para a coordenação dos cátions, traduzido pela diminuição da afinidade da enzima pelo  $K^+$ , caracteriza a transição conformacional da forma  $E_2ATP(2K^+)$  para a forma  $E_1ATP(2K^+)$  (etapa 9). A próxima etapa (10) é a liberação dos íons  $K^+$  para o citosol, finalizando o ciclo de bombeamento (CAPENDEGUY; HORISBERGER, 2005).

Figura 4: Esquema integrado do ciclo funcional da  $Na^+,K^+$ -ATPase.



Fonte: Modificado de HORISBERGER, 2004.

### 2.1.5. Regulação da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é alvo de diversos mecanismos regulatórios, ativada em resposta a mudanças na homeostase celular. Dentre estes mecanismos regulatórios, a variação na concentração dos substratos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ATP é um dos mais simples e determinantes. A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é ativada por  $\text{Na}^+$  e ATP em sítios intracelulares e por  $\text{K}^+$  em um sítio extracelular. No que diz respeito ao ATP, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase apresenta uma cinética linear e um  $K_m$  de 300-800  $\mu\text{M}$  para este substrato (THERIEN; BLOSTEIN, 2000). O  $K_m$  da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase para  $\text{Na}^+$  está na faixa de 10-40 mM, que na maioria dos tecidos é um valor mais alto do que a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  no equilíbrio (THERIEN; BLOSTEIN, 2000). Assim, pequenas variações na concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  afetam profundamente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase na maioria dos tecidos. A inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em nível pré-sináptico prejudica o gradiente de sódio, que é responsável pela recaptação de diversos neurotransmissores. Isso resulta no bloqueio da recaptação, e, por conseguinte, leva a estimulação da liberação de glutamato e outros neurotransmissores, os quais modulam a excitotoxicidade (HORISBERGER, 2004; KAPLAN, 2002).

No caso do  $\text{K}^+$ , a concentração extracelular tem menos efeito sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase do que variações na concentração intracelular de  $\text{Na}^+$ , provavelmente devido à alta afinidade deste íon por seus sítios de ligação na enzima, e também porque a concentração extracelular de íons  $\text{K}^+$  é saturante para os sítios de ligação na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Por outro lado, tem sido sugerido que o  $\text{K}^+$  pode agir como um antagonista competitivo da ligação do  $\text{Na}^+$  em seus sítios de ligação na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (THERIEN; BLOSTEIN, 2000). Assim, variações na concentração intracelular de  $\text{K}^+$  poderiam alterar a atividade da enzima através de uma modificação na afinidade da mesma por íons  $\text{Na}^+$  (THERIEN; BLOSTEIN, 2000).

Além disso, ânions podem modificar as reações enzimáticas da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, induzindo uma diminuição da ligação com nucleotídeos, e fosforilação da enzima (GANEVA, et al., 1999; KLODOS; PLESNER, 1992; NORBY; ESMANN, 1997; POST; SUZUKI, 1991). Os mecanismos pelos quais os ânions afetam a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase decorrem da interação direta com a enzima, ou modificação do potencial de membrana (KLODOS; FEDOSOVA; PLESNER, 1995). Evidências indicam que os ânions afetam a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase principalmente pela modificação de seus dois estados fosforilados intermediários ( $E_1$  e  $E_2$ ), durante o seu ciclo de bombeamento (KLODOS; FEDOSOVA; PLESNER, 1995; POST; SUZUKI, 1991). Estudos demonstraram que ao influenciar na transição do estado

desfosforilado e fosforilado da enzima,  $E_1/E_2$ , esses ânions diminuem a atividade da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase (KLODOS; FEDOSOVA; PLESNER, 1995; KLODOS; PLESNER, 1992; POST; SUZUKI, 1991). Conseqüentemente, esses efeitos resultam na modificação do potencial elétrico da célula (HODGKIN; HOROWICZ, 1960).

A fosforilação/desfosforilação de resíduos específicos da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase são importantes mecanismos de regulação, os quais envolvem proteínas quinases, proteínas fosfatases e substrato proteico (POULSEN, et al., 2010). As quinases catalisam a transferência do fosfato gama terminal do ATP para o resíduo aminoácido correspondente, em uma reação que requer  $Mg^{2+}$ . Por sua vez, as fosfatases clivam o fosfoester através de uma reação de hidrólise (SIEGEL G, 2006).

No sistema nervoso central, a fosforilação de proteínas é o maior mecanismo molecular pelo qual a função proteica neural é regulada, em resposta a sinais extracelulares (SIEGEL G, 2006). Nesse sentido, uma série de hormônios, neurotransmissores e outras substâncias modulam a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase por alterar o estado de fosforilação dos resíduos de serina 943 ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) e serina 23 em  $\alpha_1$  (CHENG, et al., 1997; FISONE, et al., 1994; NISHI, et al., 1999; TEIXEIRA, et al., 2003). A fosforilação dos resíduos de serina 943 e/ou serina 23 na subunidade  $\alpha_1$  afetam a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase de várias maneiras, inibindo ou ativando a enzima, dependendo do tecido e tipo celular estudado. Os mecanismos pelos quais a fosforilação destes resíduos afeta a atividade da  $Na^+,K^+$ -ATPase são variados, e incluem mudanças na afinidade pelos substratos  $Na^+$ ,  $K^+$  e ATP, e ativação de vias de sinalização que modulam a enzima (SIEGEL G, 2006).

Dentre as vias de sinalização que modulam a enzima, se destacam a via das quinases PKA, PKC e PKG, e das fosfatases, principalmente a PP2B (calcineurina). Neste contexto, tem sido demonstrado que ativadores da PKA, tais como forskolina, e ativadores da PKC, como forbol 12,13-dibutirato, significativamente reduzem a atividade da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase em neurônios e células COS (linha celular derivada dos rins do macaco verde africano) (CHENG, et al., 1997; NISHI, et al., 1999). Cheng et al. sugeriram que o efeito inibitório ou estimulatório da PKA e PKC na atividade da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase é principalmente determinada pela concentração intracelular de  $Na^+$  (CHENG, et al., 1997).

A PKA fosforila o resíduo Ser-943 da  $Na^+,K^+$ -ATPase e diminui a atividade da enzima em estudos *in vitro* (HUGHES, et al., 1988; TAUB, et al., 1992) e estudos *ex vivo* (CARRANZA; FERAILLE; FAVRE, 1996; HUSSAIN; ABDUL-WAHAB; LOKHANDWALA, 1997). Em túbulos renais proximais de ratos, após a ativação de PKA, observa-se tanto o aumento quanto a diminuição da atividade da enzima (CARRANZA;



FERAILLE; FAVRE, 1996; HUSSAIN; ABDUL-WAHAB; LOKHANDWALA, 1997). Além da fosforilação direta da enzima, outros mecanismos tem sido propostos para o efeito regulatório da PKA na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. A alteração da função de transportadores de  $\text{Na}^+$ , desencadeada pela PKA, induz mudanças intracelulares na concentração de  $\text{Na}^+$ , e altera a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (HUGHES, et al., 1988). Além disso, evidências indicam que a PKA modula o número de proteínas expressas na membrana plasmática. Taub e colaboradores observaram um aumento da expressão da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase após ativação da PKA em células MDCK (TAUB, et al., 1992).

A função da PKC na inibição ou estimulação da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase tem sido evidenciada em estudos *in vivo* e *in vitro* em hepatócitos de ratos, linfócitos de humanos, e outros tecidos (LYNCH, et al., 1986; MIDDLETON, et al., 1993). A fosforilação da enzima pela PKC induz mudanças conformacionais na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, mas também afeta a atividade da subunidade  $\alpha$  catalítica, com alteração na afinidade para os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e também induz a endocitose da proteína (CHIBALIN, et al., 1998). Da mesma forma, a ativação de PKG, mediada por GMPc, também tem sido proposta como mecanismo de inibição da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no cérebro e músculo esquelético, ou ativação da atividade da enzima em glândula de pato (LI, K. X.; SPERELAKIS, 1993; PONTIGGIA; WINTERHALTER; GLOOR, 1998; SCAVONE, et al., 1995; STEWART; SEN, 1981).

Além disso, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase atua também como receptor de sinais gerados por outras proteínas e moléculas não-proteicas, e interage com várias vias de sinalização intracelular, como por exemplo as mediadas por ERK1/2 e cálcio intracelular (HORISBERGER, 2004). Evidências indicam que a ativação da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase correlaciona-se com a ativação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos via  $\text{Ca}^{2+}$ , com a ativação de calcineurina (APERIA, 2007), e inibição da PKC. Estudos experimentais em cultura de neurônios cerebelares mostraram que a ativação de calcineurina, induzida por glutamato, desfosforila a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e leva à ativação desta enzima (MARCAIDA, et al., 1996). Além disso, mudanças na atividade de fosfoproteínas mediadas por dopamina e AMPc podem alterar a atividade de proteínas fosfatases 1 e modificar a desfosforilação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (APERIA, et al., 1991).

De fato, alterações na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase afetam o padrão de sinalização celular via neurotransmissores e, conseqüentemente, a atividade neuronal, assim como o comportamento de camundongos (MOSELEY, et al., 2007). Dessa forma, um prejuízo ao funcionamento da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pode ocasionar o aumento ou diminuição da excitabilidade

neuronal. Xiong e Stringer (2000) avaliaram os possíveis mecanismos regulatórios durante crises recorrentes espontâneas induzidas por perfusão de potássio no giro denteado de ratos, e sugeriram que o principal fator regulador nesse modelo parece ser a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, principalmente neuronal (XIONG; STRINGER, 2000).

Evidências demonstram que o SE induzido por pilocarpina em ratos causa aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo, com consequente aumento da hiperexcitabilidade (REIME KINJO, et al., 2007). Por outro lado, tem sido evidenciado que a prostaglandina  $\text{E}_2$  potencializa as crises induzidas por metilmalonato em ratos (SALVADORI, et al., 2012), ao passo que diminui a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em fatias de hipocampo (OLIVEIRA, et al., 2009). Além disso, Vaillend e colaboradores (2002) mostraram que a inibição parcial da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase produz hiperexcitabilidade neuronal na região CA1 do hipocampo. Os autores sugerem que tal efeito seja atribuído a redução dos potenciais GABAérgicos com concomitante aumento dos potenciais inibitórios pós-sinápticos (VAILLEND, et al., 2002).

## 2.2. ÁCIDO $\gamma$ -AMINO BUTÍRICO (GABA)

### 2.2.1. História

A história do GABA teve início em 1910, quando foi identificada a presença do neurotransmissor em tecidos biológicos (BOWERY; SMART, 2006). No entanto, a sua presença no SNC foi descrita somente 40 anos mais tarde, o que instigou a investigação mais dirigida sobre o GABA e sobre seu potencial neuroquímico (ROBERTS; FRANKEL, 1950).

Durante a década que se seguiu, alguns estudos tentaram definir os efeitos do GABA e de compostos relacionados na atividade neuronal no SNC. Inicialmente, estudos descreveram a presença de mecanismos excitatórios e inibitórios do GABA em crustáceos (FLOREY, 1954; KUFFLER; EDWARDS, 1958). Florey & Mc Lennan, por sua vez, observaram que o GABA tinha um papel inibitório na atividade neural de mamíferos e sugeriram que o mesmo era um neurotransmissor natural (FLOREY; MC, 1959). No entanto, apesar das características do neurotransmissor GABA serem favoráveis em crustáceos, os indícios de GABA como neurotransmissor no SNC de mamíferos eram negativos (CURTIS, 1959; ELLIOTT; VAN GELDER, 1958; HAYASHI, 1958; IVERSEN; NEAL, 1968).

Muitos estudos não conseguiram obter os dados necessários e, em alguns casos foram contrários às expectativas da ação inibitória de GABA nos neurônios (HAYASHI, 1958). Além disso, uma quantidade considerável de provas contra o neurotransmissor no SNC havia sido apresentada (CURTIS, 1959; ELLIOTT; VAN GELDER, 1958; HAYASHI, 1958; IVERSEN; NEAL, 1968). Somente em 1967 o GABA foi definitivamente considerado o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, após estudos de Krnjevic & Schwartz em neurônios corticais cerebrais. Além disso, demonstrou-se que o alcalóide natural, biccuculina, bloqueava a ação do GABA e também a inibição pós-sináptica do córtex cerebral. (KRNJEVIC; SCHWARTZ, 1966, 1967). Desde então, houve um crescimento exponencial em investigações sobre o GABA, em uma tentativa de definir sua função na fisiologia do cérebro.

Nas décadas de 1970 e 1980, a atenção estava voltada à definição da natureza do receptor o qual GABA atuava. Isso culminou com o surgimento da estrutura do receptor ionotrópico (OLSEN, et al., 1990), os quais possuíam canais para cloreto neuronais, e compreendiam um complexo de proteínas em que uma variedade de compostos poderia agir. Substâncias como anestésicos gerais e, mais tarde, os neuroesteróides foram apresentadas como potencializadores do efeito de GABA. Mas a ação de um dos mais importantes moduladores, os benzodiazepínicos, foi descrita pela primeira vez por Haefely (HAEFELY; KULCSAR; MOHLER, 1975). Esses agentes terapêuticos atuavam alostericamente aumentando a frequência da abertura do canal do receptor para GABA, desencadeando efeitos ansiolíticos e sedativos. Outros estudos levaram ao desenvolvimento de agonistas inversos do sítio dos benzodiazepínicos, e isso permitiu a descoberta de medicamentos com propriedades ansiogênicas e anticonvulsivantes.

Em meados dos anos 70, pesquisadores foram capazes de descrever a distribuição da enzima formadora de GABA (GAD) em medula espinhal de mamíferos (MILLER, et al., 1978). Eles foram capazes de demonstrar a localização desta enzima que atua como um marcador para GABA, em terminais de interneurônios que incidem sobre terminais primários aferentes. O GABA liberado a partir desses interneurônios forneceu a base para “inibição pré-sináptica” dentro da medula espinhal (OKADA; SHIMADA, 1975; TAPPAZ; BROWNSTEIN; KOPIN, 1977).

Classicamente, atribui-se ao GABA a função crítica de manutenção do equilíbrio entre a excitação e inibição elétrica no SNC. Através da inibição da despolarização da membrana neuronal, o GABA impede a excitotoxicidade glutamatérgica, formando um sistema de controle

altamente eficiente, e regulando a sensibilidade do circuito neuronal (COBB, et al., 1995; CROWLEY, et al., 2016).

A inibição GABAérgica é vista em as estruturas do SNC, incluindo no hipotálamo, hipocampo, córtex cerebral e córtex cerebelar. No neocórtex, a maioria dos neurônios GABAérgicos são interneurônios locais, com poucos ou nenhum espinho dendrítico. Além da função inibitória, o GABA também pode agir como fator trófico durante o desenvolvimento do sistema nervoso, influenciando eventos como proliferação, migração, diferenciação, maturação sináptica e morte celular (OWENS; KRIEGSTEIN, 2002). GABA também pode ter funções fora do SNC, visto que há expressão de enzimas relacionadas à sua síntese e de subunidades de receptores GABAérgicos em tecidos não neuronais (TANAKA, 1985).

A importância da inibição mediada pelo GABA no encéfalo normal e sua função em doenças decorrentes do desequilíbrio de excitação/inibição são bem aceitos, graças ao conhecimento cada vez maior da fisiologia do SNC, avanços farmacológicos e os progressos da genética. Isto tornou a via GABAérgica um alvo popular de intervenções farmacológicas quando a excitação excessiva do cérebro precisa ser evitada.

### **2.2.2. Síntese e Metabolismo do GABA**

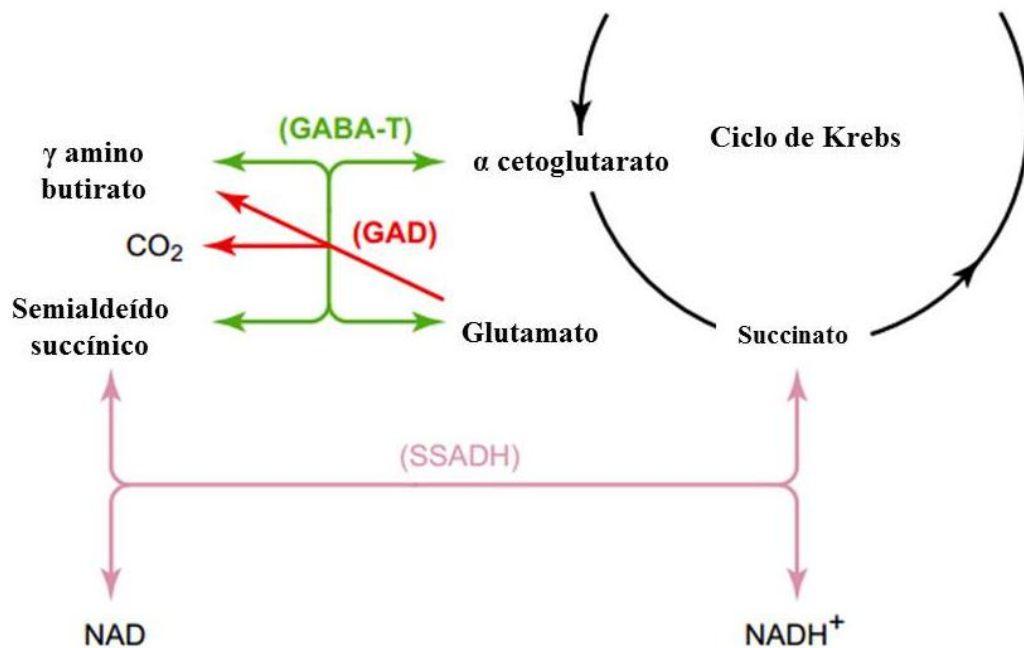
*In vivo*, a glicose é o principal precursor da síntese de GABA, porém o piruvato e outros aminoácidos também podem servir como precursores. Proveniente do metabolismo do ciclo de Krebs, o  $\alpha$ -cetogluturato é transaminado pela enzima GABA-T em L-ácido glutâmico ou L-glutamato. O GABA é então formado a partir da descarboxilação do glutamato por ação da enzima GAD (BOWERY; SMART, 2006; SIEGHART, 2006) (Figura 5).

A GAD é expressa somente em células que utilizam GABA como neurotransmissor. Há duas formas de GAD: GAD-65 e GAD-67, que apresentam cinéticas próprias e distribuição celular distinta (MARTIN, D. L.; RIMVALL, 1993). A molécula de GABA sintetizada para a transmissão sináptica é produzida pela ação de GAD-65, está presente em terminais nervosos, onde o GABA é sintetizado para vesículas sinápticas secretórias, portanto, está mais relacionada à neurotransmissão dependente de influxo de cálcio. Por outro lado, a GAD-67 tem a função de produzir o GABA envolvido na atividade metabólica (PINAL; TOBIN, 1998), é predominantemente citosólica, constitutivamente ativa e responsável pelos estoques citoplasmáticos de GABA (SOGHOMONIAN; MARTIN, 1998). Neste pool citosólico, o GABA pode ser liberado através da reversão do sistema de transporte pela

membrana plasmática. Diante disso, pode-se dizer que a atividade da GAD está relacionada com a homeostase do GABA em terminais GABAérgicos (KOSICKA, et al., 1985).

A metabolização do GABA ocorre pela sua transaminação, catalisada pela enzima GABA-T e formação de semialdeído succínico. Essa reação ocorre quando o  $\alpha$ -cetogluturato está disponível para receber o grupo amina que será removido do GABA, reformando assim o glutamato. Uma molécula de GABA pode ser metabolizada somente se uma molécula de precursor for formada, garantindo que o suprimento disponível de GABA seja conservado. Além disso, o semialdeído succínico pode ser oxidado pela desidrogenase do semialdeído succínico (SSADH) em ácido succínico ou succinato e pode reentrar no ciclo de Krebs, completando o circuito (SIEGEL, 2006) (figura 5).

Figura 5: GABA *shunt*.



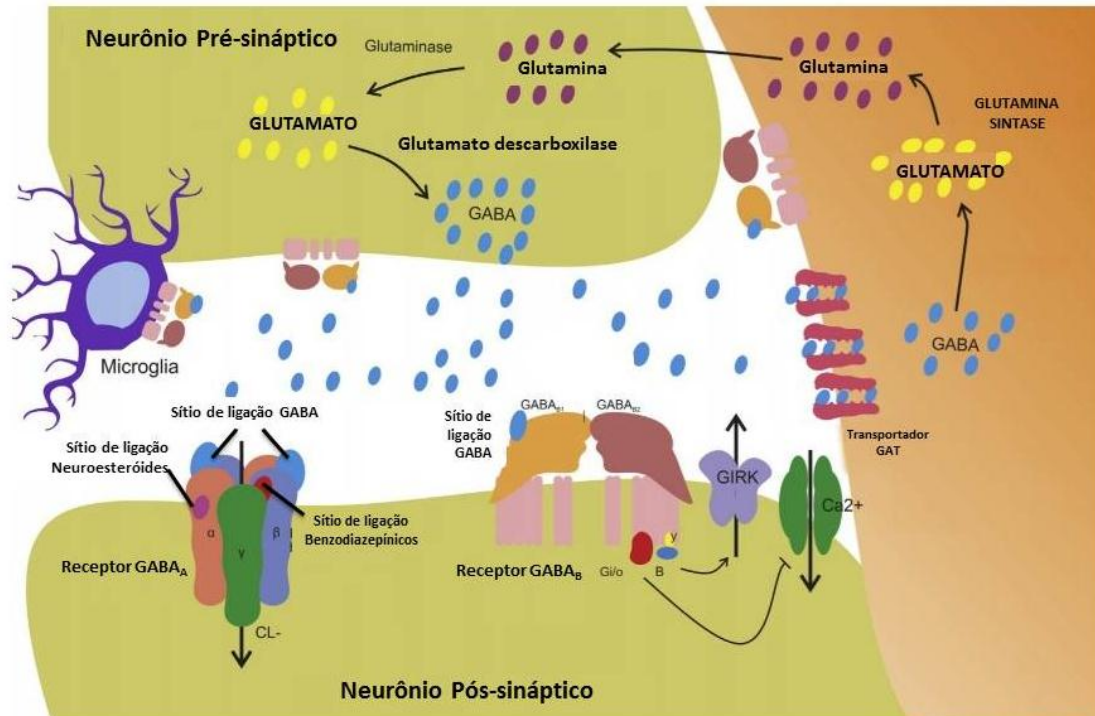
Fonte : Modificado de SIEGEL, 2006.

Uma vez sintetizado, o GABA pode ser armazenado em vesículas sinápticas através do transportador vesicular de GABA (VGAT). Durante um potencial de ação, onde ocorre a despolarização do neurônio pré-sináptico e um influxo de cálcio, o GABA é liberado das fibras aferentes primárias, para a fenda sináptica pela via clássica, ou então o GABA citosólico pode ser liberado através da reversão do sistema de transporte pela membrana. Uma vez na fenda, o GABA se difunde até alcançar os receptores alvos que podem estar

localizados nas superfícies pré e pós-sinápticas (Figura 6), produzindo uma despolarização dos terminais nervosos e diminuindo a liberação do neurotransmissor a partir das fibras primárias. O término da ação do GABA ocorre através de um mecanismo de recaptação para terminais pré-sinápticos ou células gliais circunjacentes, pelo transportador GAT. O GABA recaptado por terminais nervosos pode ser reutilizado, porém o GABA recaptado pela glia é metabolizado em semialdeído succínico pela GABA-T e não pode ser resintetizado a glutamato neste compartimento, pois a glia não expressa GAD. O GABA pode ser metabolizado também pela enzima glutaminase para formar glutamato, que é reconvertido a GABA. Além disso, o GABA pode ser recuperado desta via por um circuito envolvendo o ciclo de Krebs.

Na glia, o GABA é convertido a glutamina, que por sua vez é transferida de volta pro neurônio, onde é convertida a glutamato pela glutaminase (SONNEWALD, et al., 1993). O glutamato entra, então, no processo de GABA *shunt* (SIEGEL, 2006).

Figura 6: Sistema GABAérgico e receptores associados.



Fonte: Modificado de CROWLEY T., et al., 2016.

### 2.2.3. Receptores Gabaérgicos

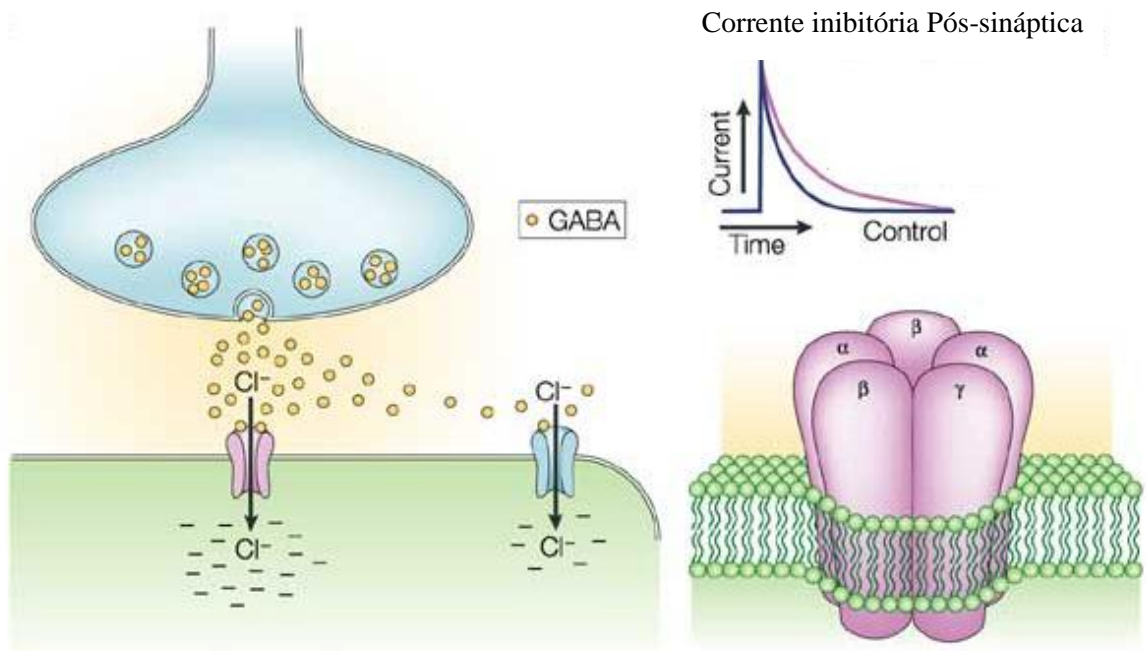
Os receptores de GABA existem no SNC e em órgãos periféricos e diferem na composição das subunidades e no arranjo. Pré-sinápticamente, os receptores de GABA são metabotrópicos ( $GABA_B$ ) e medeiam um mecanismo de feedback negativo na liberação de GABA. Pós-sinápticamente, os receptores GABAérgicos podem ser metabotrópicos ( $GABA_B$ ) ou ionotrópicos ( $GABA_A$  e  $GABA_C$ ) (Figura 6), e geralmente medeiam a hiperpolarização da célula (BORMANN, 2000). Os receptores de GABA possuem diversos reguladores alostéricos, como neuroesteróides, etanol, convulsivantes, barbituratos e benzodiazepínicos (TIURENKOV; PERFILOVA, 2010) (Figura 8).

#### 2.2.3.1. Receptores $GABA_A$

Os receptores  $GABA_A$  formam o principal complexo molecular que expressa a atividade inibitória do GABA. Esses receptores são compostos por cinco subunidades, formando estruturas pentâmeras que envolvem um canal de cloro. A ativação desse tipo de receptor ocorre após a ligação sequencial de duas moléculas de GABA ao complexo, levando à abertura do canal de cloro a ele associado (COBB, et al., 1995; CROWLEY, et al., 2016). Isso desencadeia uma hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos, tornando a despolarização por excitação menos provável e resultando na ação inibitória (sem propagação do potencial de ação) (Figura 7) (HAYASHI, 1958; KUFFLER; EDWARDS, 1958). No entanto, no início do desenvolvimento, receptores ionotrópicos GABA medeiam correntes de despolarização, que ativam processos de sinalização sensíveis ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ) que são vitais para a diferenciação neuronal e desenvolvimento do cérebro (CROWLEY, et al., 2016).

Figura 7. Receptor  $GABA_A$ .

Sua ativação promove o influxo de cloreto hiperpolarizando a célula pós-sináptica.

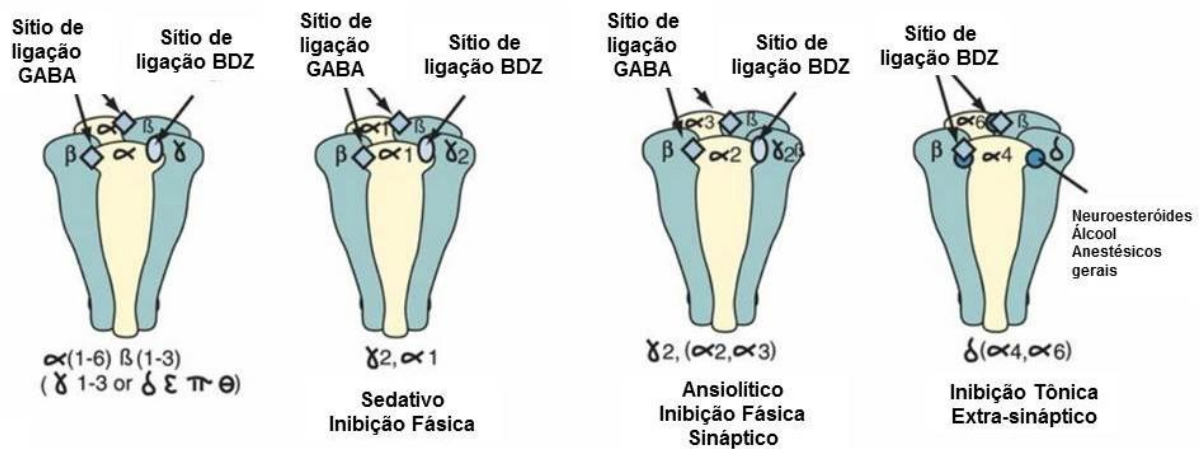


Fonte: Modificado de BENARROCH, 2011.

As subunidades que formam os receptores  $GABA_A$  exibem diferentes formas moleculares que podem ser agrupadas em famílias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  e  $\rho$ ) segundo seu grau de homologia genética (TAN; RUDOLPH; LUSCHER, 2011). Os receptores  $GABA_A$  funcionais são formados a partir de diferentes combinações de cinco subunidades derivadas dessas famílias (CHANG, et al., 1996; OKADA; SHIMADA, 1975; TAN; RUDOLPH; LUSCHER, 2011) (Figura 8).



Figura 8. Principais combinações das subunidades do receptor GABA<sub>A</sub>.



Fonte: Modificado de STAHL, 2013.

No SNC, o receptor mais comum (de 43% de todos os receptores GABA<sub>A</sub>) é composto pelas subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$ , com uma estequiometria definida de  $2\alpha: 2\beta: 1\gamma$  (BAUMANN; BAUR; SIGEL, 2002; CHANG, et al., 1996). As diferentes isoformas das subunidades são expressas em região e tipo celular específicos (SIEGHART, 2006, 2015), e podem ser localizados em locais sinápticos, predominantemente pós-sinápticos (KULLMANN, et al., 2005), e alguns também são expressos nos locais peri e extra-sinápticos (KULLMANN, et al., 2005; SIEGHART, 2015).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são expressos em células neuronais e gliais do SNC (TAN; RUDOLPH; LUSCHER, 2011) e possuem sítios de reconhecimento para diversas substâncias, incluindo BDZs, barbitúricos, esteróides, picrotoxina, 4'-clorodiazepam, zinco e avermectina, e é possível que sítios adicionais de reconhecimento de etanol, propofol e clometiazona também estejam presentes (MOHLER; OKADA, 1977). Os ligantes desses sítios podem agir conjuntamente na modulação da abertura dos canais de cloro do receptor GABA<sub>A</sub> (MOHLER; OKADA, 1977; TAN; RUDOLPH; LUSCHER, 2011).

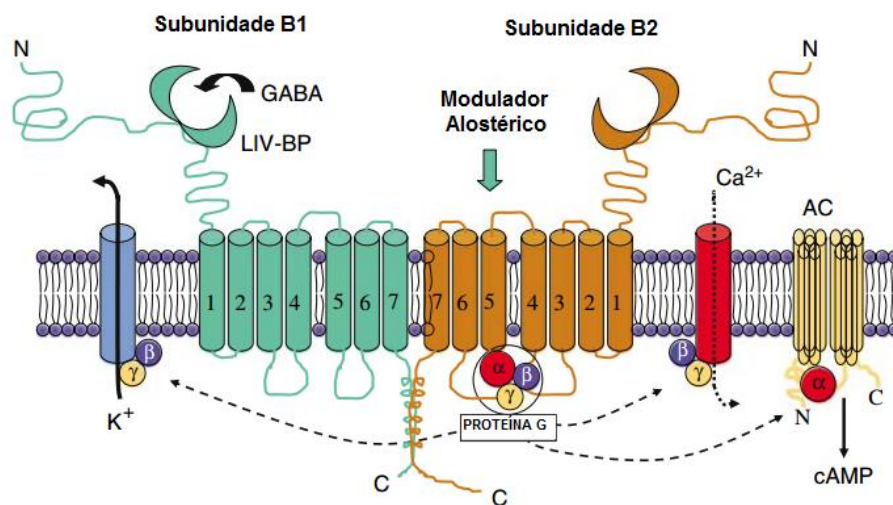
### 2.3.2.2. Receptores GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub>

Além dos receptores GABA<sub>A</sub>, GABA também ativa receptores GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub>. Os receptores GABA<sub>B</sub> são receptores metabotrópicos envolvidos na neurotransmissão inibitória lenta (CROWLEY, et al., 2016). A ativação pré-sináptica do receptor GABA<sub>B</sub> reduz a

condutância ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a liberação do neurotransmissor. Receptores  $\text{GABA}_B$  pós-sinápticos induzem uma hiperpolarização lenta da membrana através da ativação de um receptor acoplado a proteína G (MCQUAIL; FRAZIER; BIZON, 2015).

Esses receptores são heterodímeros compostos por duas subunidades: B1 e B2 (PINARD; SEDDIK; BETTLER, 2010). A subunidade B1 contém a ligação de GABA enquanto a subunidade B2 é acoplada à proteína G (Figura 9) (GASSMANN; BETTLER, 2012; PINARD; SEDDIK; BETTLER, 2010). No cérebro, a subunidade B1 é predominantemente expressa em duas isoformas, B1a e B1b (GASSMANN; BETTLER, 2012). Os receptores B1a e 2 estão localizados na pré-sinapse enquanto receptores B1b e 2 são predominantemente expressos pós-sinápticamente (GASSMANN; BETTLER, 2012; MARSHALL, et al., 1999).

Figura 9: Estrutura do receptor  $\text{GABA}_B$ .



Fonte: Modificado de BOWERY, 2016.

Os receptores  $\text{GABA}_C$  são permeáveis ao cloreto e a íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Classicamente, a ativação de receptores  $\text{GABA}_C$  permite o influxo de  $\text{Cl}^-$ , conforme o gradiente eletroquímico, resultando em hiperpolarização neuronal (MCQUAIL; FRAZIER; BIZON, 2015). A estrutura desses receptores é composta por subunidades  $\rho$ , que são classificadas pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica como subunidades dos receptores  $\text{GABA}_A$  (AMIN; WEISS, 1994, 1996). Os receptores  $\text{GABA}_C$  são insensíveis aos fármacos que modulam os receptores  $\text{GABA}_A$  e  $\text{GABA}_B$ , e são ativados seletivamente pelo ácido cis-4-aminocrotônico (BORMANN, 2000).

Os receptores GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub> são insensíveis aos BDZs (BORMANN, 2000) e, por conseguinte, não serão discutidos aqui.

## 2.3. BENZODIAZEPÍNICOS

### 2.3.1. Descoberta dos BZDs

A história dos BDZs tem início em meados de 1930, em Cracow, Polônia; onde o químico farmacêutico Leo Sternbach descobriu uma família de compostos que foram denominados Heptodiazinas (STERNBACH, 1979). Nos laboratórios da Companhia Roche (Basileia, Suíça), o químico sintetizou a família de derivados 1,4-BDZs; que em 1950, tiveram suas propriedades farmacológicas estudadas por Lowel Randall, em New Jersey, EUA. A denominação que estas drogas receberam se deve ao fato de sua estrutura central consistir em um anel de benzeno com um de sete membros de 1,4-diazepina (RANDALL, 1961).

O primeiro benzodiazepínico utilizado na clínica, o clordiazepóxido, foi descoberto acidentalmente, quando se percebeu que a estrutura originalmente atribuída à molécula havia mudado inesperadamente durante o processo de síntese (RANDALL, 1961; STERNBACH, 1979). Na sua fase de experimentação pré-clínica em animais, o composto demonstrou-se relevante pelos efeitos sedativos, anticonvulsivantes e antiagressivos sobre o comportamento de camundongos, bem como sobre o comportamento de macacos *Cynomolgu*, além de baixa toxicidade (RANDALL, 1961). A propriedade de diminuir a agressão defensiva, uma vez que animais bravios, tratados com a droga, tornavam-se dóceis; permite, até hoje, a manipulação de animais selvagens por veterinários e zoólogos (GRAEFF, 2012).

Inicialmente, o clordiazepóxido foi denominado metaminodiazepóxido, por apresentar efeitos semelhantes ao meprobamato, entretanto os primeiros testes clínicos revelaram uma reduzida aplicabilidade, uma vez que em doses altas causava disartria e ataxia em pacientes geriátricos (COHEN; HARRIS, 1961; LOPEZ-MUNOZ; ALAMO; GARCIA-GARCIA, 2011). Em pacientes esquizofrênicos, o clordiazepóxido reduzia significativamente a ansiedade, embora não tivesse uma ação antipsicótica (COHEN; HARRIS, 1961). Em um estudo realizado posteriormente com pacientes com neurose de angústia, que hoje seriam diagnosticados como portadores de “Transtorno generalizado de ansiedade” (TGA), os pesquisadores comprovaram a eficácia do clordiazepóxido. Estes concluíram que o

clordiazepóxido possibilitava o tratamento bem-sucedido de pacientes (com estados de ansiedade e tensão), muitos dos quais, até então, tinham-se mostrado refratários a todas as outras modalidades de tratamento (TOBIN; LEWIS, 1960). Após exaustivos testes, em 1960, sua eficácia clínica foi estabelecida. Era o início do que foi chamado naquela década de “a revolução dos benzodiazepínicos” (BERNIK, 1999).

Estudos posteriores mostraram que ao simplificar a estrutura química do clordiazepóxido (eliminando a sua cadeia lateral, de base e o radical N-óxido) eram obtidos compostos mais potentes (SCHWARTZ; POSTMA; GAUT, 1971; SCHWARTZ; POSTMA; KOLIS, 1971; STRONJNY, et al., 1977). O primeiro (um derivado 1-metil, com propriedades relaxantes musculares intensas) foi sintetizado por um grupo de Sternbach em 1959, após terem estudado a atividade do principal metabólito do clordiazepóxido, demoxepam (SCHWARTZ; POSTMA; KOLIS, 1971).

A seguir, em 1963, foi testado o análogo diazepam (Valium®), um protótipo de excelência, o que instigou a investigação mais dirigida de suas propriedades ansiolíticas. O diazepam apresentava-se como um composto cinco vezes mais potente que o clordiazepóxido, com um efeito mais curto, e com seus efeitos ansiolíticos e sedativos dissociados (GRAEFF, 2012; RANDALL, et al., 1961; STERNBACH, 1979). O primeiro benzodiazepínico não desenvolvido pela companhia La Roche, e o terceiro a ser introduzido no mercado norte-americano, foi o oxazepam. O oxazepam possui estrutura química semelhante ao diazepam, mas a sua ação farmacológica se assemelha ao clordiazepóxido (TOBIN, et al., 1964). Esse composto foi sintetizado por Stanley C. Bell dos laboratórios Wyeth (Philadelphia). Os ensaios clínicos com oxazepam, dirigidos por Joseph M. Tobin e Sidney Merlis, começaram em 1961, e a sua comercialização teve início em 1965, sob nome comercial Serax® (MERLIS; KOEPKE, 1975; TOBIN, et al., 1964).

Nas três décadas seguintes, muitos outros compostos foram introduzidos com propriedades ansiolíticas diurnas (“tranquilizantes”), hipnóticas noturnas, ou ambas (STERNBACH, 1979). Os mais sucedidos hipnóticos apresentados eram o nitrazepam (Mogadon®), flurazepam (Dalmane®), temazepam (Euhypnos®), triazolam (Halcion®), e sedativos: diazepam (Valium®), lorazepam (Ativan®) e alprazolam (Xanax®) (LADER, 1991b).

O uso de benzodiazepínicos aumentou demasiadamente durante os anos 1960 e no início de 1970, refletindo na segunda metade do século 20 como a “Era da Ansiedade.” Além da eficácia terapêutica, o principal motivo responsável pelo sucesso dos BDZs talvez tenha

sido a segurança em seu uso, pois houve um ganho enorme no índice terapêutico se comparado aos medicamentos disponíveis anteriormente (BERNIK, 1999).

Portanto, não causa surpresa seu uso na medicina geral, assim como na psiquiatria, ter aumentado significativamente nos vinte anos subsequentes ao seu lançamento (Bernik, 1999). No final da década de 70, medicamentos como o diazepam, tornaram-se, por larga margem, as drogas mais prescritas em todo o mundo para o tratamento das doenças que afetavam o sistema nervoso central (BEAUMONT, 1990; LADER, 1991a).

### **2.3.2. Farmacocinética dos BZDs**

Os BDZs exibem diferenças de início, intensidade e duração de seus efeitos, que podem em sua maioria ser explicadas por suas propriedades farmacocinéticas. Em geral, a farmacocinética dos BDZs é expressa por meio do modelo de dois compartimentos que representam espaços teóricos de distribuição da droga nos vários tecidos e fluídos do organismo, no entanto modelos de três compartimentos parecem ser mais apropriados para os compostos com alta solubilidade em lipídeos (BRUNTON LAURENCE L., 2011). Todos os BDZs tem alta lipossolubilidade e são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, independentemente da via de administração. Todos os benzodiazepínicos são completamente absorvidos, com exceção do clorazepato; este fármaco é rapidamente descarboxilado no suco gástrico a N-desmetildiazepam (nordazepam), que em seguida é completamente absorvido (BRUNTON LAURENCE L., 2011). Os fármacos que agem sobre os receptores de benzodiazepínicos podem ser divididos em quatro categorias com base em suas meias-vidas de eliminação: BDZ de ação ultrarrápida; agentes de curta ação (meias-vidas <6 horas; triazolam, zolpidem e zopiclona); agentes de ação intermediária (meias-vidas 6-24 horas; estalozam, temazepam); e agentes de longa ação (meias-vidas >24 horas, flurazepam, diazepam e quazepam) (BRUNTON LAURENCE L., 2011).

Por ser altamente lipossolúveis, os BDZs distribuem-se em todos os tecidos (GREENBLATT; FRIEDMAN; SHADER, 1987) e cruzam com facilidade a barreira hematoencefálica, penetrando velozmente no SNC, sendo a taxa de absorção o principal determinante do início de ação após a ingestão de doses únicas. Os BDZs também atravessam a barreira placentária, aumentando a chance de anomalias congênitas e complicações neonatais, além de causar sedação em recém-nascidos através da ingestão do leite materno (AUSTIN; MITCHELL, 1998a, 1998b).

Os BDZs mais apropriados para o uso como ansiolíticos e anticonvulsivantes são aqueles que atingem o pico mais lentamente, com declínio gradual da concentração, enquanto os mais indicados como indutores do sono são os mais lipossolúveis, devido a seu rápido início de ação. Os BDZs também ligam-se a proteínas plasmáticas e teciduais, atingindo taxas de ligação de 70% para o alprazolam e 99% para o diazepam (BRUNTON LAURENCE L., 2011). Assim, fatores que determinam um pequeno aumento de sua fração livre, como estados carenciais, podem levar a intensificação do efeito farmacológico (BERNIK, 1999).

O principal processo de biotransformação é a desmetilação no fígado, por ação de enzimas dos microsossomos hepáticos, particularmente CYPs 3A4 e 2C19 (BRUNTON LAURENCE L., 2011). O metabolismo do diazepam é mediado pela isoenzima 2C19 do sistema CYP 450; o alprazolam, midazolam e o triazolam são metabolizados pela isoenzima 3A3/4. Essas isoenzimas podem afetar a metabolização de benzodiazepínicos. Portanto, o uso concomitante desses medicamentos pode diminuir a taxa de metabolização e levar a maiores efeitos de ambas, aumentando o risco de acidentes (RAMAEKERS, et al., 1997).

Todos os BDZs são metabolizados por reações oxidativas, exceto o lorazepam e oxazepam que são metabolizados por conjugação. Muitos tem como metabólito comum o desmetildiazepam (ou nordiazepam), que é ativo e com meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) superior a 50 horas. O flurazepam, o flunitrazepam ( $t_{1/2}$ = 15 a 30 horas), o midazolam ( $t_{1/2}$ =1 a 3 horas) e o estazolam são metabolizados por oxidação, embora o flunitrazepam sofra também nitrorredução. O flurazepam, que tem meia-vida biológica curta, possui três metabólitos ativos principais: o hidroxietil, o aldeído e o desalquilflurazepam, este com meia-vida longa. O temazepam, o nitrazepam, o lormetazepam e o triazolam são transformados em metabólitos inativos. O metabolismo de benzodiazepínicos biotransformados por mecanismos de oxidação hepática, como o diazepam, pode ser comprometido em situações na quais há prejuízo das vias metabólicas de oxidação, tais como cirrose e outras doenças hepáticas, bem como quando há uso concomitante de drogas que induzam ou inibam o seu sistema enzimático de biotransformação (BERNIK, 1999).

Como a meia-vida de eliminação dos BDZs e de seus metabólitos é altamente variável (1 a 100 horas de duração) e muitos metabólitos são ativos, ao se administrar um BDZ deve-se considerar a contribuição dos vários metabólitos ativos que podem ocasionalmente ser maiores que os dos compostos originais. Além disso, deve-se presumir que a meia-vida de eliminação dos fármacos tem pouca relação com a sua duração da ação, uma vez que o tempo de biotransformação são distintos entre BDZs (BRUNTON LAURENCE L., 2011).

A duração dos efeitos, por sua vez, pode ser decorrente das diferenças entre as características de ligação dos compostos com seus receptores, isto é, a sua potência; e também é dependente do esquema de administração. No caso de doses únicas de BDZs muito lipossolúveis, a duração é determinada principalmente pela meia-vida de distribuição. Isso é válido para o diazepam que, após atingir o pico de concentração no sangue, é rápida e extensivamente distribuído nos tecidos, podendo levar à curta duração do efeito após doses únicas. Quando a administração é repetida, a meia-vida de eliminação é que determinará a ocorrência ou não de acúmulo do fármaco e/ou de seus metabólitos.

### **2.3.3. Farmacodinâmica dos BDZs**

Assim como ocorre para muitas substâncias, os efeitos farmacodinâmicos dos BDZs são necessariamente mediados por sua interação com sítios de reconhecimento no sistema nervoso central. Existem pelo menos duas categorias de sítios de reconhecimento para os BDZs. Uma delas é funcional e espacialmente associada aos receptores do ácido gama-aminobutírico do tipo A ( $GABA_A$ ) (RUDOLPH, et al., 1999). A outra categoria, independente dos receptores  $GABA_A$ , é denominada de receptor periférico de BDZs (RPB), predominantemente expressos na membrana celular de mitocôndrias, sendo responsável pelo controle da respiração celular (ANHOLT, et al., 1985).

#### *2.3.3.1. Efeitos farmacodinâmicos dos BDZs*

A interação de  $BDZ_S$  com sítios específicos de ligação no SNC, localizados próximos aos receptores de  $GABA_A$ , potencializa a ação do  $GABA_A$ , promovendo aumento da frequência de abertura do ionóforo de cloro (SIEGHART, 2015). Tendo em vista que os BDZs são inativos na ausência de  $GABA_A$ , eles podem ser denominados “moduladores alostéricos positivos” quando aumentam a afinidade do  $GABA_A$  pelo seu receptor e, conseqüentemente, a condutância de cloro, e moduladores alostéricos negativos, quando diminuem essa condutância. No entanto, os termos agonista e agonista inverso de BDZs, respectivamente, são os mais empregados para caracterizar esses ligantes. Além disso, a maioria dos efeitos exercidos por agonistas e agonistas inversos pode ser revertida ou prevenida por uma classe denominada antagonistas, que compete pela ligação com o receptor  $GABA_A$  (RUDOLPH, et al., 1999)

#### 2.3.3.1.1. Agonistas

Os agonistas BDZs são compostos clinicamente ativos disponíveis comercialmente, como o diazepam, flunitrazepam e nitrazepam, que aumentam a afinidade do receptor pelo GABA e, conseqüentemente, aumentam a frequência de abertura do canal de cloro (WIELAND; LUDDENS; SEEBURG, 1992a).

Embora haja poucas evidências de diferenças nos perfis farmacodinâmicos dos compostos BDZs, eles diferem em sua afinidade pelos receptores e assim a utilidade clínica de cada um deles varia consideravelmente (RUDOLPH, et al., 1999). Sua capacidade de deslocar [3H]diazepam de seus sítios de ação, medida pela constante  $K_i$ , constitui um índice de sua potência, que se correlaciona com seus efeitos farmacológicos (BERNIK, M. A.; SOARES, S., 1990; IVERSEN, NEAL; 1968). O  $K_i$  de compostos BDZs comercializados varia de 2 a 21 nM. Dentre os BDZs mais potentes utilizados clinicamente estão o clonazepam, o lorazepam, o flunitrazepam e alprazolam (BERNIK, 1999).

Há ainda compostos cuja atividade intrínseca é intermediária, isto é, sua capacidade de potencializar os efeitos do GABA não é tão intensa quanto a dos agonistas totais, sendo denominados agonistas parciais (por exemplo: abecarnil, imidazenil, bretazenil, Ro 43-9624, Ro 19-8022) (BERNIK, M. A.; SOARES, S., 1990).

#### 2.3.3.1.2. Agonistas inversos

Um aspecto farmacológico único do receptor BDZs é a possibilidade de modulação bidirecional, isto é, para esse receptor existem compostos que, competindo com os mesmos sítios de ligação, apresentam ações farmacológicas e comportamentais opostas aos dos BDZs convencionais (BERNIK, 1999). Ações ansiogênicas, pró-alerta, pró-mnemônica e pró-convulsivante são observadas com alguns compostos do grupo  $\beta$ -carbolinas, substâncias que têm sido utilizadas como instrumento de pesquisa da neuroquímica da ansiedade. Os agonistas inversos reduzem a ligação entre o GABA e seu receptor e assim diminuem a probabilidade de abertura dos canais de cloro. Seus efeitos são bloqueados por agonistas e antagonistas (BRUNTON LAURENCE L., 2011). O grande atrativo dos agonistas inversos é sua potencial utilidade na terapêutica de distúrbios associados com disfunções cognitivas, melhorando, por exemplo, a memória e a atenção (BERNIK, M. A.; SOARES, S., 1990).



#### 2.3.3.1.3. Antagonistas

O principal antagonista competitivo do sítio de ligação BDZ no receptor  $GABA_A$  é o flumazenil, que aparentemente não desencadeia qualquer efeito do GABA sobre o canal de cloro (MARTIN, J. R.; JENCK; MOREAU, 1995).

O uso desse composto é indicado quando os efeitos de BDZs devem ser rapidamente atenuados ou eliminados, como em anestesiologia e na superdosagem por múltiplas drogas. O flumazenil antagoniza tanto os efeitos eletrofisiológicos quanto comportamentais dos agonistas e agonistas inversos dos BDZs e das  $\beta$ -carbolinas (BRUNTON LAURENCE L., 2011). Alguns estudos sugerem que o flumazenil exibe atividade intrínseca e funciona como um agonista parcial ou agonista inverso em algumas circunstâncias. Em camundongos BALB/C, o flumazenil exerce comportamento ansiogênico, sugerindo um possível efeito do tipo agonista (NUTT; MALIZIA, 2001). Em pacientes com ansiedade, o flumazenil possui efeito ansiolítico, enquanto pacientes sem nenhum sinal de ansiedade, o flumazenil exerce função ansiogênica (BELZUNG; LE GUIQUET; CRESTANI, 2000).

#### 2.3.4. BDZs e receptores $GABA_A$

Os BDZs são amplamente prescritos como sedativos, ansiolíticos e hipnóticos em todo o mundo, sendo comumente utilizados no tratamento de convulsões (NAYLOR, 2014). Todos os BDZs atuam sobre o receptor  $GABA_A$  e potenciam o influxo de cloreto através de canais iônicos, promovendo hiperpolarização neuronal (HAYASHI, 1958). Os benzodiazepínicos se ligam as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  dos receptores  $GABA_A$ , sendo este um sítio de ligação distinto de outros moduladores alostéricos positivos, por exemplo, a ligação dos agonistas  $GABA_A$ , que ocorre entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (CHANG, et al., 1996). Além disso, o resíduo específico de histidina (H101) na subunidade  $\alpha_1$  do receptor  $GABA_A$  (WIELAND; LUDDENS; SEEBURG, 1992b) e resíduos homólogos nas subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_5$  (H101, H126 e H105, respectivamente) são cruciais para a ação dos BDZs (WIELAND; LUDDENS; SEEBURG, 1992a).

Estudos farmacológicos e comportamentais em ratos nocaute já correlacionam as isoformas específicas da subunidade  $\alpha$  com os efeitos dos benzodiazepínicos. Estes estudos revelaram que os receptores  $GABA_A$  que contém a subunidade  $\alpha_1$  medeiam os efeitos

sedativos, a amnésia anterógrada, e em parte os efeitos anticonvulsivantes do diazepam (RUDOLPH, et al., 1999); a subunidade  $\alpha_2$ , medeiam as ações ansiolíticas e em grande parte os efeitos miorreaxantes (CRESTANI, et al., 2001);  $\alpha_3$  e  $\alpha_5$  contribuem para ações miorreaxantes dos benzodiazepínicos, e também modulam os efeitos de memória temporal e espacial (COLLINSON, et al., 2002; CRESTANI, et al., 2001; LOW, et al., 2000).

Os receptores GABA<sub>A</sub> que contém as subunidades  $\alpha_4$  e  $\alpha_6$  são insensíveis aos BDZs, pois estes possuem um resíduo de arginina na posição fundamental de ligação (TAN; RUDOLPH; LUSCHER, 2011; WIELAND; LUDDENS; SEEBURG, 1992a, 1992b). Este conhecimento tem sido explorado para gerar várias linhagens de animais nocaute, sendo possível substituir o resíduo de histidina pela adição de um resíduo de arginina, levando a uma mutação e insensibilidade do receptor aos BDZs (WIELAND; LUDDENS; SEEBURG, 1992b). Os receptores GABA<sub>A</sub> que contenham tais subunidades mutantes são largamente insensíveis aos BDZs e, portanto, são ferramentas fundamentais para o estudo dos receptores GABA<sub>A</sub> e os efeitos farmacológicos de BDZs (TAN; RUDOLPH; LUSCHER, 2011).

Os benzodiazepínicos aumentam a frequência de abertura dos canais de cloreto na presença de baixas concentrações de GABA. Em concentrações de GABA semelhantes às aquelas observadas nas sinapses, a desativação do receptor é prolongada, indicando aumento da ligação do GABA e/ou probabilidade aumentada de abertura do canal (BORMANN, 2000). Como a concentração interna de cloreto  $[Cl^-]_i$  de neurônios maduros é mais baixa que a do  $Cl^-$  extracelular, a ativação dos canais seletivos de cloreto desvia a voltagem transmembrana neuronal para o potencial de equilíbrio do  $Cl^-$  ( $E_{Cl} \sim -70$  mV). O consequente influxo aumentado de  $Cl^-$  provoca hiperpolarização da membrana e diminui a excitabilidade neuronal, reduzindo a probabilidade de que estímulos excitatórios possam iniciar potenciais de ação (HAYASHI, 1958). Os canais de  $Cl^-$  abertos atenuam a mudança de potencial de membrana produzida por correntes sinápticas excitatórias, um efeito denominado *shunting* (SIEGEL, 2006). Esse processo fornece a explicação molecular para os efeitos inibitórios após a ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>.

A partir de suas propriedades como depressores do SNC, os BDZs cessam as crises epiléticas e também são empregados no tratamento adjuvante para prevenir as crises (NAYLOR, 2014). Entretanto, estudos clínicos e experimentais demonstram uma rápida redução da potência dos benzodiazepínicos com aumento da duração de crises epiléticas (NAYLOR, 2014). Indivíduos que apresentam SE, geralmente são responsivos ao tratamento com lorazepam (em torno de 60% dos pacientes), no entanto, voltam a ter crises epiléticas posteriormente, sendo que 40% desses pacientes não respondem mais ao tratamento

farmacológico (TREIMAN et al., 1998). Midazolam, que possui alta eficácia sobre crises convulsivas em crianças até 30 minutos, reduz 50% sua eficácia após essa janela temporal (KUTLU et al., 2003). Além disso, a eficácia do diazepam retal é significativamente reduzida após 15 minutos de crises epiléticas (KNUDSEN, 1979; SCOTT, 2005). Em estudos experimentais, a eficácia dos BDZs para interromper crises convulsivas reduz em torno de 50% ou mais, após 10-15 minutos (WALTON E TREIMAN, 1988; JONES et al., 2002). Fármacos anticonvulsivantes em geral, incluindo os agentes GABAérgicos, tornam-se completamente ineficazes após 35 minutos (MORRISETT et al., 1987).

A diminuição na eficácia dos BDZs está diretamente associada às alterações na farmacologia dos receptores GABA<sub>A</sub> (KAPUR E MACDONALD, 1989). Nesse aspecto, sabe-se que alterações dos gradientes de Cl<sup>-</sup> são determinantes para a diminuição da eficácia dos BDZs (STALEY, 1992). Estudos evidenciaram que a diminuição da [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>, o qual promove uma diminuição da hiperpolarização mediada pelos receptores GABA<sub>A</sub>, ocorre durante o SE (KAPUR E COULTER, 1995; LEE et al., 2010). Além disso, estudos mostram que o aumento da [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> facilita crises convulsivas (KELLEY, et al., 2016; KRISHNAN; BAZHENOV, 2011). Dessa forma, é provável que o mecanismo envolvido nas crises epiléticas que não respondem aos fármacos anticonvulsivantes convencionais seja a alteração dos gradientes de Cl<sup>-</sup>, o que compromete o equilíbrio entre excitação e inibição do SNC, e conseqüentemente interfere nos mecanismos regulatórios da atividade elétrica cerebral (CROWLEY, et al., 2016).

O entendimento dos mecanismos pelo quais os BDZs tornam-se ineficazes na interrupção das crises epiléticas, e principalmente o envolvimento da [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> sobre este efeito são imprescindíveis para o desenvolvimento de tratamentos eficazes sobre a modulação e controle de crises convulsivas. Além disso, a investigação do efeito dos BDZs sobre outros alvos moleculares, que desempenham importantes funções na regulação da excitabilidade cerebral, são extremamente úteis para o conhecimento e controle da epileptogênese.

### **3. HIPÓTESE**

Diazepam diminui a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do diazepam sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase contendo as isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2/3}$ .

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se o diazepam diminui a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.
- Verificar se a diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase pelo diazepam é mediada pelo sítio de ligação para benzodiazepínicos do receptor  $\text{GABA}_A$ .
- Verificar se o efeito do diazepam sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é dependente de cloreto.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos Swiss, pesando aproximadamente 30 gramas. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com 55% de umidade relativa do ar, com alimentação (água e comida) *ad libitum*. Os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com a legislação nacional e internacional de bem-estar animal, e com as diretrizes de ética e cuidado animal da Universidade Federal de Santa Maria (número do projeto: 3847260216; Apêndice F).

### 5.2. PREPARAÇÃO DAS FATIAS

Os camundongos foram eutanasiados por decapitação, e seus cérebros foram imediatamente dissecados e mantidos em tampão de dissecação. Foram feitas fatias coronais, com  $370 \mu\text{m}$  de espessura, do hipocampo e do córtex entorrinal usando o Vibrátomo (Leica). As fatias foram incubadas por 30 minutos em Fluido Cerebrospinal artificial (aCSF) contendo:  $\text{NaCl}$  125 mM,  $\text{KCl}$  2,5 mM,  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$  25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,25 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,

CaCl<sub>2</sub> 2 mM, Glicose 25 mM, Sacarose 10 mM; pH 7.4; e oxigenação (carbogênio) com 95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. As fatias permaneceram viáveis em torno de 60 minutos, e todos os experimentos foram realizados nesse período de tempo.

### **5.2.1. Experimento 1: Efeito do diazepam e flumazenil sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em fatias hipocampais e corticais**

O efeito do flumazenil e do diazepam na atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase foram investigados com a incubação de 3-4 fatias de hipocampo ou córtex entorrinal com diazepam (0; 0,05; 0,15; 0,5 μM) ou flumazenil (0; 0,005; 0,015; 0,05; 0,15; 0,5; 1,5 μM) por 10 minutos, a 37 ° C. Após a incubação, o meio de incubação foi descartado e as fatias foram homogeneizadas em Tris-HCl 30 mM, pH 7.4, para a determinação da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

### **5.2.2. Experimento 2: Efeito do flumazenil sobre a diminuição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida por diazepam em fatias hipocampais.**

Esse experimento tem como objetivo investigar se a diminuição na atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida por diazepam em fatias hipocampais envolve o sítio de ligação para benzodiazepínicos no receptor GABA<sub>A</sub>. As fatias hipocampais foram incubadas com diazepam (0,15 ou 0,50 μM por 10 minutos, 37 °C) na presença e/ou ausência de flumazenil (0,005 μM) no meio de incubação. A concentração de flumazenil utilizada não tinha efeito *per se* na atividade da enzima. Após a incubação, o meio de incubação foi descartado e as fatias foram homogeneizadas em Tris-HCl 30 mM, pH 7.4, para a determinação da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

### **5.2.3. Experimento 3: Efeito da redução de cloreto no meio sobre diminuição da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida por diazepam**

Neste experimento, nós testamos se a diminuição na atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida por diazepam é dependente do cloreto. Fatias hipocampais foram incubadas

em aCSF com baixa concentração de cloreto contendo (em mM):  $C_2H_3NaO_2$  120, KCl 3,5;  $NaH_2PO_4$  1,25;  $MgSO_4$  2;  $CaCl_2$  2;  $NaHCO_3$  26; Glucose 10; ou aCSF contendo: NaCl 125 mM; KCl 2,5 mM;  $NaH_2CO_3$  25 mM;  $NaH_2PO_4$  1,25 mM;  $MgCl_2$  1 mM;  $CaCl_2$  2 mM; Glicose 25 mM; Sacarose 10 mM; pH 7.4, oxigenação (carbogênio) com 95%  $O_2$  e 5% de  $CO_2$ , sob temperatura experimental de 20-23°C, e meio de incubação a 37°C. Após a incubação, o meio de incubação foi descartado e as fatias foram homogeneizadas em Tris-HCl 30 mM, pH 7.4, para a determinação da atividade da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase.

### 5.3. ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $Na^+,K^+$ -ATPASE

Imediatamente após a incubação, as fatias hipocâmpais e corticais foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 para o ensaio da atividade da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase. O meio de ensaio consistiu em: tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7.4; EDTA 0,1 mM; NaCl 50 mM; KCl 5 mM;  $MgCl_2$  6 mM; e 6,25  $\mu$ g de proteína, em um volume final de 250  $\mu$ L. O homogeneizado tecidual (hipocampo ou córtex entorrinal) foi incubado na presença e na ausência de ouabaína. Em roedores, a isoforma  $\alpha_{2/3}$  da  $Na^+,K^+$ -ATPase é mais sensível a ouabaína do que a isoforma  $\alpha_1$ . Dessa forma, a atividade das isoformas  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2/3}$  foi mensurada através da diferença entre as amostras não incubadas e amostras incubadas com ouabaína, utilizando 3  $\mu$ M (que inibe a subunidade  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) e 4 mM (que inibe ambas isoformas). A atividade da enzima  $Mg^+$ -ATPase foi mensurada através da atividade da ATPase na presença de 4 mM de ouabaína (Scavone, 2000). A reação foi iniciada pela adição de ATP 3 mM. Após 20 minutos a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de TCA (w/v) 10%. Condições saturantes de substrato foram utilizadas, a concentração de proteína (0,025 mg/mL) e tempo de incubação (20 min) foram escolhidos com base na linearidade da reação. Controles apropriados foram incluídos para a exclusão da hidrólise espontânea do ATP. A quantidade de fosfato inorgânico liberado no meio foi quantificado colorimetricamente, como descrito por Fiske and Subbarow (1925), utilizando  $KH_2PO_4$  como referência. Esse composto inorgânico forma um complexo com o molibdato de amônio, o qual é lido espectrofotometricamente a 880 nm (STRICKLAND AND PARSONS, 1968). A atividade da  $Mg^+$ -ATPase,  $\alpha_1$  and  $\alpha_{2/3}$  da enzima  $Na^+,K^+$ -ATPase foram expressas in nmol Pi/mg proteína/minuto.

## 6. MANUSCRITO

### **DIAZEPAM DECREASES $\alpha_{2/3}$ -SUBUNIT CONTAINING Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS**

Joseane Righes Marafiga<sup>a,b</sup>, André Luis Londero<sup>a,b</sup>, Cibele Boeira Batista Rosemberg<sup>a,b</sup>  
and Carlos Fernando Mello<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Graduation Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

\*Corresponding author (C.F. Mello)

Permanent Address:

Department of Physiology and Pharmacology

Center of Health Sciences

Federal University of Santa Maria

Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Tel: +55 55 3220 8870; fax: + 55 55 3220 8870

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br

## Abstract

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is ubiquitously expressed in the plasma membrane of all animal cells where serves as the principal regulator of intracellular ion homeostasis.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity is activated by  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  and current evidence indicates that total  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity is, in general, inhibited by anions. However, the effect of pharmacologically-induced  $\text{Cl}^-$  flux on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity is not established. In this study we investigated the effect of diazepam, a  $\text{GABA}_A$  receptor positive allosteric modulator, on  $\alpha_1$ - and  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Hippocampal and cortical slices were incubated with diazepam (0, 0.05, 0.15 or 0.5  $\mu\text{M}$ ) and/or flumazenil (0, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5 or 1.5  $\mu\text{M}$ ) for 10 minutes. After incubation the slices were homogenized and  $\alpha_1$  and  $\alpha_{2/3}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity were assayed using ouabain 3  $\mu\text{M}$  (that inhibits  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) and 4 mM (that inhibits both isoforms). Diazepam caused a 50% decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in the hippocampus, but did not alter enzyme activity in the entorhinal cortex. The effect of diazepam was prevented by flumazenil, indicating that the decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase was involved  $\text{GABA}_A$  receptors. Furthermore, a low chloride medium abolished the diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Our data suggests that  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the hippocampus is sensitive to the pharmacological effects of a benzodiazepine by  $\text{GABA}_A$  receptor-mediated mechanisms.

**Keywords:** *sodium pump; diazepam; chloride ion; hippocampus; entorhinal cortex.*

Chemical compounds studied in this article:

Diazepam (PubChem CID: 3016); Flumazenil (PubChem CID: 3373).

## 1. Introduction

The sodium pump ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) (EC 3.6.3.9) is a transmembrane protein localized at the plasma membrane of all mammalian cells. It carries three  $\text{Na}^+$  ions out and two  $\text{K}^+$  ions into



the cell using ATP hydrolysis energy (Skou, 1957). This enzyme is responsible for maintaining the resting potential of neural and glial cells (Dager and Swann, 1996; Horisberger et al., 1991; Trachtenberg et al., 1981), regulating cell volume, pH, driving the secondary active transport of ions ( $H^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{-3}$ ,  $SO_4^{-2}$ ), substrates (glucose and amino acids) and neurotransmitters across the plasma membrane (Blanco and Mercer, 1998), and aiding in the reestablishment of membrane potential after neuronal depolarization (Blanco and Mercer, 1998; Skou, 1957).

$Na^+,K^+$ -ATPase is a heterotrimer ( $\alpha_{1-4}$ ,  $\beta_{1-3}$  and  $\gamma$ ), and the kinetic properties of the isozymes are mainly determined by the type of  $\alpha$  subunit (catalytic) expressed. The catalytic subunit of  $Na^+,K^+$ -ATPase is expressed in various forms ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ), the proportions of which may differ in various tissues (Blanco and Mercer, 1998; Matchkov and Krivoi, 2016). In the central nervous system,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  are considered “housekeeping” isoforms, while the  $\alpha_3$  isoform is predominantly activated in situations involving high neuronal activity (Blanco and Mercer, 1998; Jewell and Lingrel, 1991). With depolarization and the repeated firing of action potentials, the  $Na^+$  and  $K^+$  gradients are dissipated. Under these conditions, while the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ - subunits are working at saturation, the  $\alpha_3$  will be activated (Blanco and Mercer, 1998) protecting neurons against of  $[Na^+]_i$  and  $[Ca^{2+}]_i$  increase and general loss of the  $Na^+$  electrochemical gradient (Holm et al., 2016). The  $\alpha_1$ -subunit has an ubiquitous cellular distribution, while the  $\alpha_2$ -subunit is more abundantly expressed in brain glial cells (Peng et al., 1997; Sweadner, 1992). The  $\alpha_3$ -subunit is primarily expressed in neurons (Peng et al., 1997; Sweadner, 1992), while the  $\alpha_4$ -subunit has been found only in testis (Shamraj and Lingrel, 1994; Woo et al., 2000).

The malfunction of this enzyme has been associated with neuronal hyperexcitability, cell depolarization (Lees, 1991), seizures and neuronal death (Figuera et al., 2006; Furian et al., 2007; Jamme et al., 1995; Oliveira et al., 2009). Accordingly,  $Na^+,K^+$ -ATPase activity is decreased in animal models of epilepsy (Brines et al., 1995; Fernandes et al., 1996; Vaillend et al., 2002) and in *post-mortem* hippocampal tissue from epileptic patients (Grisar and Delgado-Escueta, 1986). In fact, disruption of the genes encoding  $Na^+,K^+$ -ATPase are associated with epilepsy (Benarroch, 2011; Bottger et al., 2012; Heinzen et al., 2014).

$Na^+,K^+$ -ATPase activity is regulated by several mechanisms. It is specifically inhibited by cardiac glycosides and stimulated by increased  $Na^+$  and  $K^+$  concentrations (MacGregor and Walker., 1993). Accordingly, it has been suggested that  $Na^+,K^+$ -ATPase activation by intracellular sodium is involved in seizure cessation (Krishnan and Bazhenov, 2011; Thompson and Prince, 1986). Moreover, lyotropic anions such as chloride ( $Cl^-$ ), nitrite ( $NO_3^-$ ),

thiocyanate (SCN), and perchlorate (ClO<sub>4</sub>) as well as their sodium salts, decrease enzyme activity (Ganea et al., 1999; Norby and Esmann, 1997). These anions affect the equilibrium between two phosphorylated conformations of the enzyme (Klodos et al., 1995; Klodos and Plesner, 1992; Post and Suzuki, 1991), E<sub>1</sub> conformation that exchange of three Na<sup>+</sup> against two K<sup>+</sup> ions on the cytoplasmic side and vice versa on the extracellular side in the E<sub>2</sub> conformation (Pavlov and Sokolov, 2000). Post and Suzuki (1991) suggested that these anions might also modify protein folding or the structure of the specific water molecule that attacks the active site of the phosphate group. Electrostatic effects on proteins are important to maintain their structure as well as stability and biological function and, especially in enzymes, they play a decisive role in substrate recognition and transition-state stabilization (Allewell and Oberoi, 1991; Matthew, 1985; Warshel et al., 1984). In line with this view, there is amounting evidence that sodium pump turnover is accelerated as the cell interior is made more positive and that the inhibitory effect of external sodium on forward pumping is more pronounced at negative membrane potentials (De Weer, 1994) confirming the view that, as expected for any electrogenic process, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is sensitive to alterations in membrane potential. However, it remains unknown whether pharmacologically-regulated GABA<sub>A</sub> receptor anionic flux alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. This is important because chloride accumulation in the intracellular milieu is known to facilitate seizures (Kelley et al., 2016; Krishnan and Bazhenov, 2011).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Male adult Swiss mice (25-30 g) were maintained on a 12 h light–12 h dark cycle at 22 ± 1 °C, 55% relative humidity, with food (Supra, Santa Maria, Brazil) and water *ad libitum*. The procedures used in the present study complied with the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – NIH Publications N° 80-23, revised 1996), and guidelines on animal care of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Santa Maria (process number 3847260216).

## 2.2. Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diazepam and flumazenil were diluted in aCSF containing (in mM): 125 NaCl; 2.5 KCl; 25 NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 25 D-glucose; 10 sucrose; pH 7.4.

## 2.3. Slice preparation

Mice were killed by decapitation and had their brains immediately dissected and placed in ice-cold dissecting buffer. Coronal slices (370 µm thick) of the hippocampus and entorhinal cortex were prepared using a Vibratome (Leica). Slices were incubated for 30 min in a pre-gassed (carbogen with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) aCSF containing (in mM): 125 NaCl; 2.5 KCl; 25 NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 25 D-glucose; 10 sucrose; pH 7.4. Slices maintained viability for more than 60 min after preparation, and all experiments were performed within this time window.

### 2.3.1. Experiment 1: Effect of diazepam and flumazenil on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of cortical and hippocampal slices

The effect of diazepam and flumazenil on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was investigated by incubating 3-4 hippocampal or cortical slices with diazepam (0, 0.05, 0.15 or 0.50 µM) or flumazenil (0, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5 or 1.5 µM) for 10 min at 37 °C. Diazepam concentrations and incubation time were chosen based on previous studies (Drexler et al., 2010; Horvat et al., 2006). After the incubation, the medium was discarded and slices were gently homogenized in ice-cold 30 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, for determination of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. The final protein concentration in the incubation medium was set at 0.125 mg/mL. Protein content was estimated by the method of Bradford (Bradford, 1976).

### 2.3.2. Experiment 2: Effect of flumazenil on diazepam-induced decrease of $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity

This experiment aimed to investigate whether the diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity involved the benzodiazepine binding site on the  $\text{GABA}_A$  receptors. Hippocampal slices were incubated with diazepam (0.15 or 0.50  $\mu\text{M}$  for 10 min at 37 °C) in the presence or absence of flumazenil (0.005  $\mu\text{M}$ ) in the incubation medium. This dose of flumazenil had no effect on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity *per se*. After the incubation, the medium was discarded and slices were gently homogenized in ice-cold 30 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, for determination of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity.

### 2.3.3. Experiment 3: Effects of low chloride concentration on diazepam-induced decrease of $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity

In this experiment we tested the hypothesis that diazepam-induced decrease of  $\alpha_{2/3}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity depends on  $\text{Cl}^-$  ions. Hippocampal slices were incubated in low  $[\text{Cl}^-]$  aCSF solution containing (in mM): 120  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ , 3.5 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 Glucose; or aCSF containing (in mM): 125 NaCl; 2.5 KCl; 25  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ; 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 2  $\text{CaCl}_2$ ; 25 D-glucose; 10 sucrose; both were equilibrated with carbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), pH 7.4 at the experimental temperature of 20-23°C, and left for 30 min at 37°C. Three to four slices were transferred to the medium containing (in  $\mu\text{M}$ ): 0, 0.15 or 0.50 of diazepam, for 10 min at 37 °C. After the incubation, the medium was discarded and slices were gently homogenized in ice-cold 30 mM Tris HCl buffer, pH 7.4, to assess the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity.

### 2.4. $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity determination

Immediately after the incubation, hippocampal or entorhinal cortex slices were gently homogenized in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 and assayed for  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

activity. The assay medium consisted of (in mM) 30 Tris–HCl buffer, pH 7.4; 0.1 EDTA; 50 NaCl; 5 KCl; 6 MgCl<sub>2</sub> and 6.25 µg of protein, in a final volume of 250 µL. Cell lysate was incubated in the presence or absence of ouabain. In rodents, the  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoform is 1,000 times more sensitive to ouabain than the  $\alpha_1$ -subunit containing enzyme (Kinoshita et al., 2014). Therefore, the activity of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_{2/3}$ -containing isoforms was measured as the difference between ouabain-untreated and ouabain-treated samples using 3 µM (that inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoforms containing  $\alpha_2$  and  $\alpha_3$  subunits) or 4 mM ouabain (that inhibits all isoforms) (Oliveira et al., 2009). The Mg<sup>+</sup>-ATPase activity corresponded to the remaining ATPase activity in the presence of 4 mM ouabain (Scavone et al., 2000). The reaction was started by the addition of 3 mM ATP. After 20 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of (w/v) 10% trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used and protein concentration (0.025 mg/mL) and incubation time (20 min) were chosen in order to ensure the linearity of the reaction. Appropriate controls were included to exclude the non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) released was quantified colorimetrically, as described by Fiske and Subbarow (Fiske and Subbarow, 1925), using KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as a reference standard. This inorganic compound forms a complex with molybdate, which can be read spectrophotometrically at 880 nm (Strickland and Parsons, 1972). The Mg<sup>+</sup>-ATPase,  $\alpha_1$  and  $\alpha_{2/3}$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activities were expressed in nmol Pi/mg protein/min.

### 2.5. Statistical Analyses

Mg<sup>+</sup>-ATPase,  $\alpha_1$  and  $\alpha_{2/3}$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity data were analyzed by one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test and are expressed as mean + S.E.M. A probability of  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

Figure 1 shows the effect of diazepam on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of hippocampal slices. Diazepam (0.15 and 0.50 µM) significantly decreased the  $\alpha_{2/3}$  subunit-containing Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-

ATPase activity [ $F(3, 24) = 7.962, p = 0.0007$ , Fig. 1A], but did not alter  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity [ $F(3, 24) = 0.1106, p = 0.95$ , Fig. 1B]. Diazepam did not alter  $\alpha_1$ - or  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activities in cortical slices (data not shown).

Since diazepam decreased  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity in hippocampal slices, we also investigated whether flumazenil altered  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity. Flumazenil did not alter  $\alpha_{2/3}$ - or  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activities [ $F(6,28) = 2.1, p = 0.08$ ], Fig. 2A; [ $F(6,28) = 1.01, p = 0.43$ ], Fig. 2B; respectively].

We next investigated whether the diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity involved the benzodiazepine binding site at the  $\text{GABA}_A$  receptors. Statistical analysis of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity revealed a significant pretreatment (control or flumazenil) by treatment (control or diazepam) interaction [ $F(5, 51) = 4.01; p = 0.024$ , Fig. 3A]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that flumazenil prevented diazepam-induced decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity in hippocampal slices. Our data corroborate previous studies that have shown that the effect of nanomolar concentrations of diazepam are antagonized by flumazenil (Drexler et al., 2010; Walters et al., 2000).

We next asked whether diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity depended  $\text{GABA}_A$  receptor-mediated  $\text{Cl}^-$  influx. For this purpose, we incubated hippocampal slices in a low  $[\text{Cl}^-]$  aCSF solution. Hippocampal slices were then incubated with diazepam (0.15 and 0.50  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity was assessed. Statistical analysis of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity data revealed a significant interaction between pretreatment (aCSF or Low  $\text{Cl}^-$  aCSF) and treatment (control or diazepam: 0.15 and 0.50  $\mu\text{M}$ ) [ $F(5, 42) = 4.15, p = 0.023$ , Fig. 4A]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that incubation of the slices in a low  $[\text{Cl}^-]$  medium abolished diazepam-induced decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity. Statistical analysis of  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity data revealed only a significant effect of pretreatment [ $F(5,42) = 21.03, p < 0.001$ , Figure 4B]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that a low  $[\text{Cl}^-]$  aCSF medium consistently increases  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity of the hippocampal slices. The  $\text{Mg}^+$ -ATPase activity was not altered by pharmacological treatments (data not shown).

#### 4. Discussion

In the current study we showed that diazepam, a GABA<sub>A</sub> receptor agonist, decreased  $\alpha_{2/3}$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampal, but not in cortical slices. Flumazenil at concentration that had no effect on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity *per se* (0.005  $\mu$ M) prevented diazepam-induced decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. In addition, diazepam-induced decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was abolished if slices were incubated with diazepam in a low Cl<sup>-</sup> concentration medium.

The effect of diazepam on total Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity has been previously studied both *in vitro* (Horvat et al., 2006) and *ex vivo* (Calderon et al., 2010; Eroglu et al., 1984; Rekhtman et al., 1980). The systemic injection of diazepam, at the doses of 2 or 5 mg/kg, does not alter total activity Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in cerebral cortex and whole brain of rats (Calderon et al., 2010; Rekhtman et al., 1980). On the other hand, the systemic injection of a high dose of diazepam (10 mg/kg) increases total Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in brain homogenates of mice (Eroglu et al., 1984). Curiously, *in vitro*, diazepam (0.2-60 mM) has no effect on rat synaptosomal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity or on reconstituted porcine Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Horvat et al., 2006), but Ueda (1971) has shown that diazepam (0.60 mM) inhibits 50 per cent of enzyme activity from the microsomal fraction of rabbit brain (Ueda et al., 1971). A marked difference between our study and those studies that have reported diazepam-induced increase of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity or no effect of diazepam (*ex vivo*) is that most of those studies have used cerebral cortex or whole brain preparations. In this regard, diazepam also did not inhibit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex in our assays, though we have used slices of hippocampus and entorhinal cortex. A second important difference between our assays and those carried out by other groups is that in our assays we assessed the effects of diazepam on  $\alpha_{2/3}$ -subunit and on  $\alpha_1$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activities. Since diazepam affected only  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, it is plausible that our study was able to show an inhibitory effect of diazepam because of its tissue- and subunit-specificity. In this regard it is interesting that  $\alpha_3$  subunit immunoreactivity co-localizes with GAD67 in the hippocampal subfields (Bottger et al., 2011) and that these cells are GABAergic interneurons (Richards et al., 2007). Therefore, it is possible that at least part of the currently reported inhibitory effects of diazepam on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity occurs in these cells. However, Watts and colleagues (1991) have shown by using *in situ* hybridization histochemistry abundant labelling of the pyramidal cell layer when they have used an  $\alpha_3$ -directed probe (Watts et al., 1991). For this

reason, we cannot rule out an effect on pyramidal neurons in our study. At the time of birth, the alpha 2 isoform is expressed in neuronal cell bodies at all levels in the brain, as well as in glial cells (Moseley et al., 2003). As the nervous system matures, the distribution of alpha 2 isoform becomes gradually limited to glial cells, arachnoid membrane, and a few types of neurons in the adult (Peng et al., 1997; Sweadner, 1992). Since we have prepared slices from adult mice, one might consider that glial cells may also be a target of the currently described effects of diazepam. In fact, it has been shown that diazepam and phenobarbital potentiate GABA<sub>A</sub>-receptor mediated Cl<sup>-</sup> efflux in hippocampal astrocytes in culture (Fraser et al., 1995). However, the finding that the effect of diazepam is abolished by a low [Cl<sup>-</sup>] in the incubation medium strongly suggests that it is due to a primary Cl<sup>-</sup> influx and, consequently, may not involve astrocytes. Regardless the cell type affected by GABA<sub>A</sub> currents, it is interesting that a functional coupling between the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha 2 subunit and the K-Cl cotransporter KCC<sub>2</sub> has been proposed, resulting in extracellular GABA increase and depolarizing Cl<sup>-</sup> currents in neurons from the ventrolateral medulla of *Atp1a2*<sup>-/-</sup> mice (Ikeda et al., 2004).

Two lines of experimental evidence support a role for GABA<sub>A</sub> receptor in the currently described inhibitory effect of diazepam on  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. First, the effect of diazepam was prevented by the GABA<sub>A</sub> antagonist flumazenil. Second, the inhibitory effect of diazepam was abolished in a low [Cl<sup>-</sup>] medium. These findings suggest a role for Cl<sup>-</sup> currents in diazepam-induced decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Moreover, they are also evidence for a lack of direct effect of diazepam on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase or surrounding lipid/protein environment. If diazepam directly inhibited the enzyme, this effect should be relatively resistant to modifications in the chloride content or the presence of a very low concentration (0.005  $\mu$ M) of the benzodiazepine antagonist flumazenil. In addition, hippocampal and cortical slices were removed from the incubation medium (with diazepam) and were homogenized in Tris-HCl buffer (in the absence of diazepam) before the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity assay. Therefore, only the diazepam that diffused into the slice, i.e. a very low amount, was present in the ATPase assay. Moreover, this low amount of diazepam was diluted in the Tris-HCl homogenizing buffer, making a direct effect of diazepam on the enzyme sound unlikely.

Several lines of evidence support that diazepam is a positive allosteric modulator of GABA<sub>A</sub> receptors (Tan et al., 2011). This potentiating action is induced by a change in conformation that allows for an increase in receptor affinity for GABA (Campo-Soria et al., 2006; Tan et al., 2011), increase single channel conductance (Eghbali et al., 1997) and single channel open



probability (Rogers et al., 1994). It is well established that binding to the benzodiazepine site enhances GABA<sub>A</sub> receptor mediated Cl<sup>-</sup> current by increasing the frequency of GABA<sub>A</sub> receptor opening (Engel and Pedley, 2008). Subsequent studies also have suggested that benzodiazepines also influence GABA<sub>A</sub> receptor gating (Downing et al., 2005; Gravielle, 2016). Moreover, GABA<sub>A</sub> receptor activation by a positive allosteric modulator induces a fast-acting Cl<sup>-</sup> flux that usually causes synaptic inhibition (Hayashi, 1958). Transmembrane Cl<sup>-</sup> gradient determines whether Cl<sup>-</sup> flows into or out of a cell through GABA<sub>A</sub> receptor-operated channels (Alvarez-Leefmans and Nogueron, 1989; Brumback and Staley, 2008). Accordingly, the intracellular Cl<sup>-</sup> concentration depends on the cell type, on expression of Cl<sup>-</sup> transporters, the fixed “Donnan” charges inside and outside the cell, as well as on water properties and transport (Delpire and Staley, 2014). The most common cellular response elicited by GABA<sub>A</sub> receptors in mature hippocampal slices is Cl<sup>-</sup> influx and synaptic inhibition (Hayashi, 1958; Tan et al., 2011). In fact, this seems the mechanism by which diazepam decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in our assays, since this effect is abolished by decreased [Cl<sup>-</sup>] in the incubation (extracellular) medium.

It is fairly known that electrostatic effects on proteins alter their structure as well as stability and biological function (Allewell and Oberoi, 1991; Matthew, 1985; Warshel et al., 1984). Accordingly, amounting evidence indicates the inhibitory effect of external sodium on forward pumping of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is more pronounced at negative membrane potentials (De Weer, 1994) indicating that Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is sensitive to alterations in membrane potential. However, since ionic gradients were disrupted when slices were homogenized to measure enzyme activity, it seems unlikely that the current decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is due to electrogenic Cl<sup>-</sup> flux. A long-lasting post-translational modification of enzyme structure, such as phosphorylation or deamidation of the enzyme (Adav et al., 2014; Poulsen et al., 2010), seems to be a more plausible explanation for the currently described decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. For this reason, more studies have to be performed to define the mechanisms by which GABA<sub>A</sub>-mediated Cl<sup>-</sup>-flux decreases the activity of  $\alpha_{2/3}$ -subunit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity.

In summary, this study shows that diazepam induces a decrease in the activity of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus, but not in the entorhinal cortex. This effect involves the benzodiazepine binding site at the GABA<sub>A</sub> receptor and depends on chloride influx. Our results indicate that Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus is sensitive to the pharmacological effects of a benzodiazepine.

## Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS. CFM is the recipient of a productivity fellowship of CNPq (307812/2014-6).

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Adav, S.S., Ravindran, A., Sze, S.K., 2014. Study of *Phanerochaete chrysosporium* secretome revealed protein glycosylation as a substrate-dependent post-translational modification. *J Proteome Res* 13, 4272-4280.
- Allewell, N.M., Oberoi, H., 1991. Electrostatic effects in protein folding, stability, and function. *Methods Enzymol* 202, 3-19.
- Alvarez-Leefmans, F.J., Nogueron, I., 1989. Intracellular chloride homeostasis in vertebrate nerve cells. *Acta Physiol Scand Suppl* 582, 17.
- Benarroch, E.E., 2011. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76, 287-293.
- Blanco, G., Mercer, R.W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275, F633-650.
- Bottger, P., Doganli, C., Lykke-Hartmann, K., 2012. Migraine- and dystonia-related disease-mutations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases: relevance of behavioral studies in mice to disease symptoms and neurological manifestations in humans. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 855-871.

- Bottger, P., Tracz, Z., Heuck, A., Nissen, P., Romero-Ramos, M., Lykke-Hartmann, K., 2011. Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 519, 376-404.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brines, M.L., Tabuteau, H., Sundaresan, S., Kim, J., Spencer, D.D., de Lanerolle, N., 1995. Regional distributions of hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase, cytochrome oxidase, and total protein in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 36, 371-383.
- Brumback, A.C., Staley, K.J., 2008. Thermodynamic regulation of NKCC1-mediated Cl<sup>-</sup> cotransport underlies plasticity of GABA(A) signaling in neonatal neurons. *J Neurosci* 28, 1301-1312.
- Calderon, G.D., Esquivel, G.J., Garcia, E.H., Osnaya, N.B., Juarez Olguin, H., 2010. Effects of marijuana and diazepam on lipid peroxidation, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, and levels of glutathione and 5-HTP in rat brain. *Acta Biol Hung* 61, 135-144.
- Campo-Soria, C., Chang, Y., Weiss, D.S., 2006. Mechanism of action of benzodiazepines on GABAA receptors. *Br J Pharmacol* 148, 984-990.
- Dager, S.R., Swann, A.C., 1996. Advances in brain metabolism research: toward a moving picture of neural activity. *Biol Psychiatry* 39, 231-233.
- De Weer, P., Rakowski, D., Gadsby, J.C., 1994. The Sodium Pump: Structure Mechanism, Hormonal Control and its Role in Disease. New York: Springer, 472-482.
- Delpire, E., Staley, K.J., 2014. Novel determinants of the neuronal Cl<sup>(-)</sup> concentration. *J Physiol* 592, 4099-4114.
- Downing, S.S., Lee, Y.T., Farb, D.H., Gibbs, T.T., 2005. Benzodiazepine modulation of partial agonist efficacy and spontaneously active GABA(A) receptors supports an allosteric model of modulation. *Br J Pharmacol* 145, 894-906.

- Drexler, B., Zinser, S., Hentschke, H., Antkowiak, B., 2010. Diazepam decreases action potential firing of neocortical neurons via two distinct mechanisms. *Anesth Analg* 111, 1394-1399.
- Eghbali, M., Curmi, J.P., Birnir, B., Gage, P.W., 1997. Hippocampal GABA(A) channel conductance increased by diazepam. *Nature* 388, 71-75.
- Engel, J.J., Pedley, T.A., 2008. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Vol. 3, p. 783.
- Eroglu, L., Keyer-Uysal, M., Baykara, S., 1984. Effects of lithium, diazepam and propranolol on brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in stress-exposed mice. *Arzneimittelforschung* 34, 762-763.
- Fernandes, M.J., Naffah-Mazzacoratti, M.G., Cavalheiro, E.A., 1996. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Int* 28, 497-500.
- Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. *Neurobiol Dis* 22, 611-623.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem* 66, 375.
- Fraser, D.D., Duffy, S., Angelides, K.J., Perez-Velazquez, J.L., Kettenmann, H., MacVicar, B.A., 1995. GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15, 2720-2732.
- Furian, A.F., Figuera, M.R., Oliveira, M.S., Ferreira, A.P., Fiorenza, N.G., de Carvalho Myskiw, J., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., Royes, L.F., 2007. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. *Neurochem Int* 50, 164-171.
- Ganea, C., Babes, A., Lupfert, C., Grell, E., Fendler, K., Clarke, R.J., 1999. Hofmeister effects of anions on the kinetics of partial reactions of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Biophys J* 77, 267-281.
- Gravielle, M.C., 2016. Activation-induced regulation of GABAA receptors: Is there a link with the molecular basis of benzodiazepine tolerance? *Pharmacol Res* 109, 92-100.

- Grisar, T., Delgado-Escueta, A.V., 1986. Astroglial contribution in human temporal lobe epilepsy: K<sup>+</sup> activation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. *Brain Res* 364, 1-11.
- Hayashi, T., 1958. Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature* 182, 1076-1077.
- Heinzen, E.L., Arzimanoglou, A., Brashear, A., Clapcote, S.J., Gurrieri, F., Goldstein, D.B., Johannesson, S.H., Mikati, M.A., Neville, B., Nicole, S., Ozelius, L.J., Poulsen, H., Schyns, T., Sweadner, K.J., van den Maagdenberg, A., Vilsen, B., Group, A.A.W., 2014. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurol* 13, 503-514.
- Holm, T.H., Isaksen, T.J., Glerup, S., Heuck, A., Bottger, P., Fuchtbauer, E.M., Nedergaard, S., Nyengaard, J.R., Andreasen, M., Nissen, P., Lykke-Hartmann, K., 2016. Cognitive deficits caused by a disease-mutation in the alpha3 Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase isoform. *Sci Rep* 6, 31972.
- Horisberger, J.D., Lemas, V., Kraehenbuhl, J.P., Rossier, B.C., 1991. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 53, 565-584.
- Horvat, A., Momic, T., Petrovic, S., Nikezic, G., Demajo, M., 2006. Selective inhibition of brain Na,K-ATPase by drugs. *Physiol Res* 55, 325-338.
- Ikeda, K., Onimaru, H., Yamada, J., Inoue, K., Ueno, S., Onaka, T., Toyoda, H., Arata, A., Ishikawa, T.O., Taketo, M.M., Fukuda, A., Kawakami, K., 2004. Malfunction of respiratory-related neuronal activity in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha2 subunit-deficient mice is attributable to abnormal Cl<sup>-</sup> homeostasis in brainstem neurons. *J Neurosci* 24, 10693-10701.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7, 333-337.
- Jewell, E.A., Lingrel, J.B., 1991. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J Biol Chem* 266, 16925-16930.
- Kelley, M.R., Deeb, T.Z., Brandon, N.J., Dunlop, J., Davies, P.A., Moss, S.J., 2016. Compromising KCC2 transporter activity enhances the development of continuous seizure activity. *Neuropharmacology* 108, 103-110.

- Kinoshita, P.F., Yshii, L.M., Vasconcelos, A.R., Orellana, A.M., Lima Lde, S., Davel, A.P., Rossoni, L.V., Kawamoto, E.M., Scavone, C., 2014. Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. *J Neuroinflammation* 11, 218.
- Klodos, I., Fedosova, N.U., Plesner, L., 1995. Influence of intramembrane electric charge on Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 270, 4244-4254.
- Klodos, I., Plesner, L., 1992. The influence of membrane charge on the kinetic properties of Na,K-ATPase. *Acta Physiol Scand Suppl* 607, 235-239.
- Krishnan, G.P., Bazhenov, M., 2011. Ionic dynamics mediate spontaneous termination of seizures and postictal depression state. *J Neurosci* 31, 8870-8882.
- Lees, G.J., 1991. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* 16, 283-300.
- MacGregor S.E., Walter .J., 1993. Inhibitors of the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-atpase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 105, 1-9.
- Matchkov, V.V., Krivoi, II, 2016. Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na,K-ATPase. *Front Physiol* 7, 179.
- Matthew, J.B., 1985. Electrostatic effects in proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 14, 387-417.
- Moseley, A.E., Lieske, S.P., Wetzell, R.K., James, P.F., He, S., Shelly, D.A., Paul, R.J., Boivin, G.P., Witte, D.P., Ramirez, J.M., Sweadner, K.J., Lingrel, J.B., 2003. The Na,K-ATPase alpha 2 isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice. *J Biol Chem* 278, 5317-5324.
- Norby, J.G., Esmann, M., 1997. The effect of ionic strength and specific anions on substrate binding and hydrolytic activities of Na,K-ATPase. *J Gen Physiol* 109, 555-570.
- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F., Ferreira, J., Calixto, J.B., Otalora, L.F., Garrido-Sanabria, E.R., Mello, C.F., 2009. Prostaglandin E2 modulates

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109, 416-426.

Pavlov, K.V., Sokolov, V.S., 2000. Electrogenic ion transport by Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Membr Cell Biol* 13, 745-788.

Peng, L., Martin-Vasallo, P., Sweadner, K.J., 1997. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J Neurosci* 17, 3488-3502.

Post, R.L., Suzuki, K., 1991. A Hofmeister effect on the phosphoenzyme of Na,K-ATPase. *Soc Gen Physiol Ser* 46, 201-209.

Poulsen, H., Morth, P., Egebjerg, J., Nissen, P., 2010. Phosphorylation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Lett* 584, 2589-2595.

Rekhtman, M.B., Samsonova, N.A., Kryzhanovskii, G.N., 1980. [Electrical activity and Na, K-ATPase levels in an epileptic focus caused by application of penicillin to rat cerebral cortex and the effect of diazepam on them]. *Neirofiziologiya* 12, 349-357.

Richards, K.S., Bommert, K., Szabo, G., Miles, R., 2007. Differential expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunits in mouse hippocampal interneurons and pyramidal cells. *J Physiol* 585, 491-505.

Rogers, C.J., Twyman, R.E., Macdonald, R.L., 1994. Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* 475, 69-82.

Scavone, C., Glezer, I., Demarchi Munhoz, C., de Sena Bernardes, C., Pekelmann Markus, R., 2000. Influence of age on nitric oxide modulatory action on Na(+), K(+)-ATPase activity through cyclic GMP pathway in proximal rat trachea. *Eur J Pharmacol* 388, 1-7.

Shamraj, O.I., Lingrel, J.B., 1994. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12952-12956.

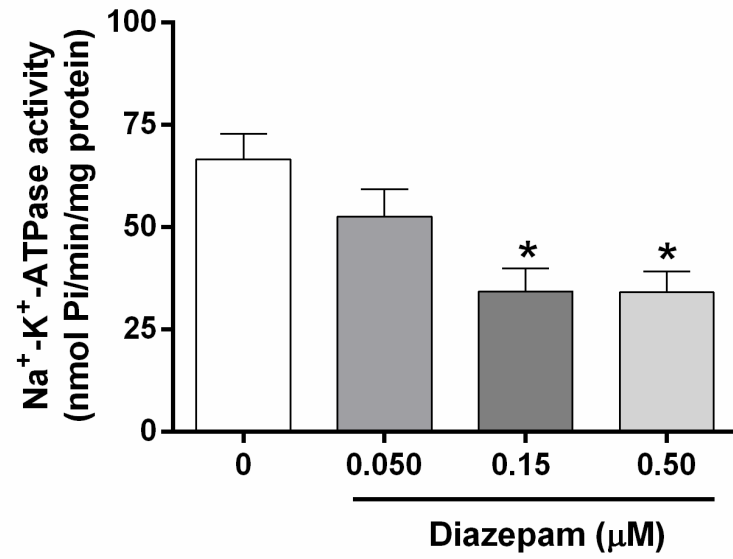
Skou, J.C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23, 394-401.

- Strickland, J., Parsons, T., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin, 167.
- Sweadner, K.J., 1992. Overlapping and diverse distribution of Na-K ATPase isozymes in neurons and glia. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl, S255-259.
- Tan, K.R., Rudolph, U., Luscher, C., 2011. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* 34, 188-197.
- Thompson, S.M., Prince, D.A., 1986. Activation of electrogenic sodium pump in hippocampal CA1 neurons following glutamate-induced depolarization. *J Neurophysiol* 56, 507-522.
- Trachtenberg, M.C., Packey, D.J., Sweeney, T., 1981. In vivo functioning of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated ATPase. *Curr Top Cell Regul* 19, 159-217.
- Ueda, I., Wada, T., Ballinger, C.M., 1971. Sodium- and potassium-activated ATPase of beef brain--effects of some tranquilizers. *Biochem Pharmacol* 20, 1697-1700.
- Vaillend, C., Mason, S.E., Cuttle, M.F., Alger, B.E., 2002. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. *J Neurophysiol* 88, 2963-2978.
- Walters, R.J., Hadley, S.H., Morris, K.D., Amin, J., 2000. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci* 3, 1274-1281.
- Warshel, A., Russell, S.T., Churg, A.K., 1984. Macroscopic models for studies of electrostatic interactions in proteins: limitations and applicability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4785-4789.
- Watts, A.G., Sanchez-Watts, G., Emanuel, J.R., Levenson, R., 1991. Cell-specific expression of mRNAs encoding Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase alpha- and beta-subunit isoforms within the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7425-7429.
- Woo, A.L., James, P.F., Lingrel, J.B., 2000. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 275, 20693-20699.



Figure 1

(A)



(B)

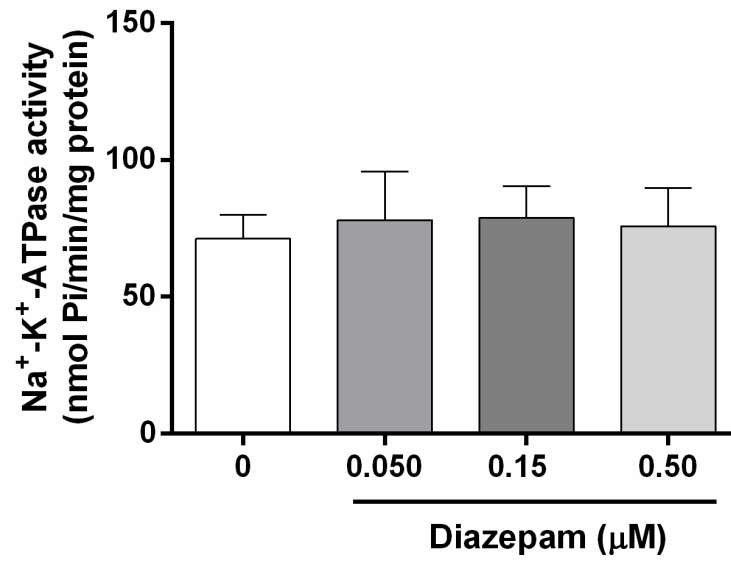


Figure 2

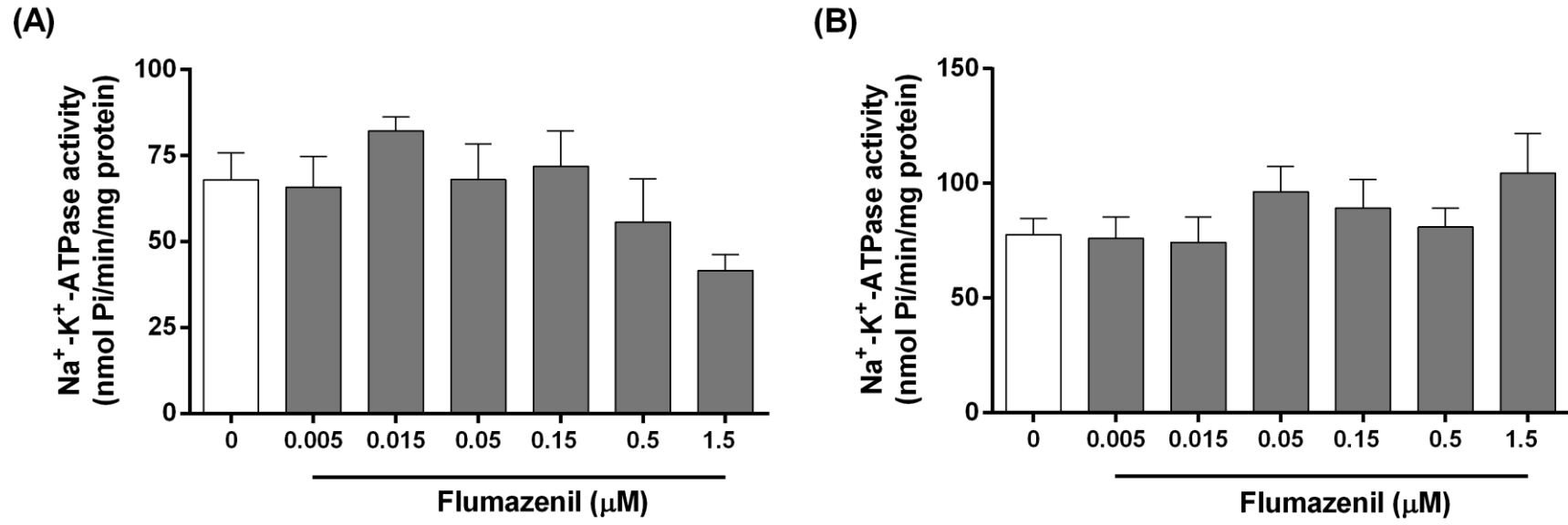
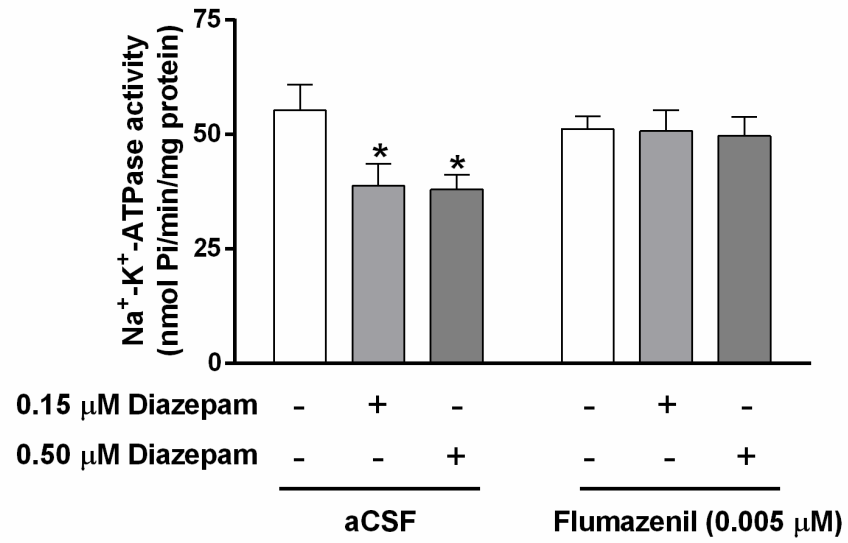


Figure 3

(A)



(B)

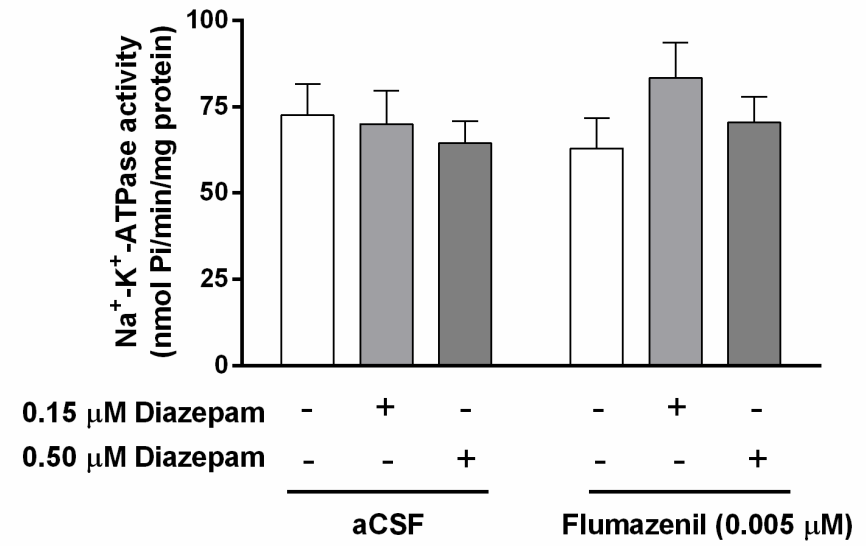
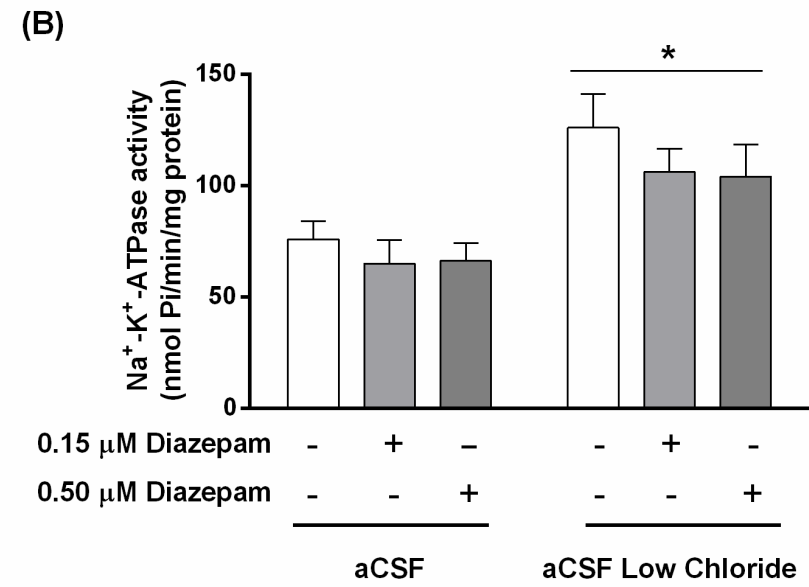
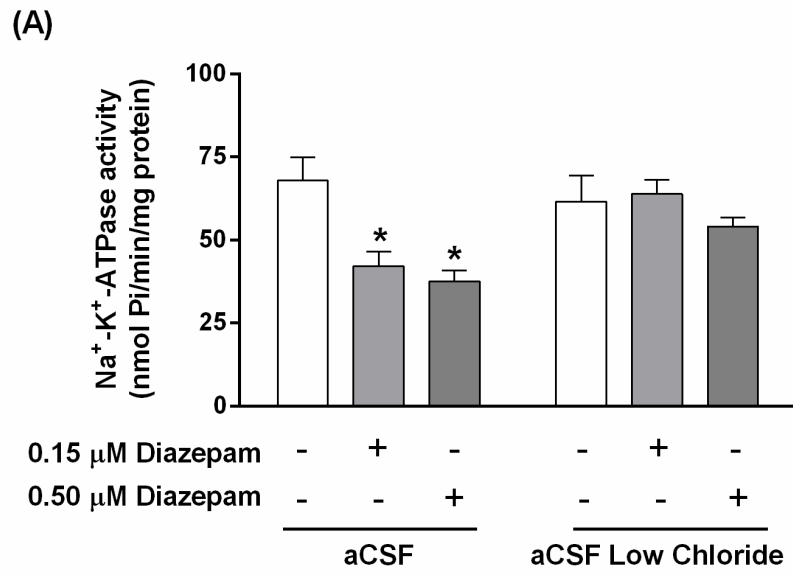


Figure 4



## Highlights

- Diazepam decreases  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in hippocampus.
- The effects of diazepam on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase were tissue- and subunit-specific.
- Diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity involves  $\text{GABA}_A$  receptors.
- Diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity depends on chloride.

## Figure Captions

**Figure 1- Effect of diazepam (0.05, 0.15 or 0.50  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of mice hippocampal slices.** Diazepam decreased the  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in mice hippocampal slices (A), but it did not alter the  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase subunit (B). Data are presented in nmol Pi/mg protein/min, as mean + S.E.M., for  $n = 9$  in each group. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnet's test. \* Indicates a significant difference within group compared with control group ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2- Effect of flumazenil (0.005, 0.015, 0.5, 0.15, 0.5 or 1.5  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of mice hippocampal slices.** Flumazenil did not alter the  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in mice hippocampal slices (A) and the  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase subunit (B). Data are presented in nmol Pi/mg protein/min, as mean + S.E.M., for  $n = 5$  in each group. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnet's test. \* Indicates a significant difference within group compared with control group ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3- Effect of flumazenil (0.005  $\mu\text{M}$ ) on diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of mice hippocampal slices.** Flumazenil prevents diazepam-induced decreased of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in mice hippocampal slices (A), but it did not alter the  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity subunit (B). Data are presented in nmol Pi/mg protein/min, as mean + S.E.M., for  $n = 9-10$  in each group. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test. \*Indicates a significant difference compared with control group ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4- Effect of low  $[\text{Cl}^-]$  medium on diazepam-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of mice hippocampal slices.** Low $[\text{Cl}^-]$  aCSF medium abolishes the diazepam-induced decrease of  $\alpha_{2/3}$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (A) and consistently increased  $\alpha_1$ -subunit containing  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity (B) in hippocampal slices. Data are

presented in nmol Pi/mg protein/min, as mean + S.E.M., for  $n = 8$  in each group. The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity was analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test.

\*Indicates a significant difference compared with control group ( $p < 0.05$ ).

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, o diazepam diminuiu a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase contendo as subunidades  $\alpha_{2/3}$  em fatias hipocâmpais, e não alterou a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em fatias corticais. Além disso, a diminuição na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase desencadeada pelo diazepam foi prevenida por flumazenil, sugerindo que o efeito do diazepam sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é decorrente da ativação farmacológica do receptor  $\text{GABA}_A$ , e não por ação direta na enzima. Nossos resultados também mostraram que a diminuição da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é dependente da concentração do cloreto, uma vez que o diazepam não teve efeito sobre atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no meio de incubação com reduzida concentração deste íon. Esses dados sugerem que a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo é sensível a efeitos farmacológicos dos benzodiazepínicos por meio de mecanismos ativados por receptores  $\text{GABA}_A$ . No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação pelo qual a ativação do receptor  $\text{GABA}_A$  modula a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

## REFERÊNCIAS

- ALLEWELL, N. M.; OBEROI, H. Electrostatic effects in protein folding, stability, and function. **Methods Enzymol**, v.202, n., p.3-19, 1991.
- AMIN, J.; WEISS, D. S. Homomeric rho 1 GABA channels: activation properties and domains. **Receptors Channels**, v.2, n.3, p.227-236, 1994.
- AMIN, J.; WEISS, D. S. Insights into the activation mechanism of rho1 GABA receptors obtained by coexpression of wild type and activation-impaired subunits. **Proc Biol Sci**, v.263, n.1368, p.273-282, 1996.
- ANHOLT, R. R., et al. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.233, n.2, p.517-526, 1985.
- APELL, H. J. Toward an understanding of ion transport through the Na,K-ATPase. **Ann N Y Acad Sci**, v.986, n., p.133-140, 2003.
- APERIA, A., et al. Phosphorylated Mr 32,000 dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in renal tubule cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.7, p.2798-2801, 1991.
- APERIA, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **J Intern Med**, v.261, n.1, p.44-52, 2007.
- AUSTIN, M. P.; MITCHELL, P. B. Psychotropic medications in pregnant women: treatment dilemmas. **Med J Aust**, v.169, n.8, p.428-431, 1998a.
- AUSTIN, M. P.; MITCHELL, P. B. Use of psychotropic medications in breast-feeding women: acute and prophylactic treatment. **Aust N Z J Psychiatry**, v.32, n.6, p.778-784, 1998b.
- BAUMANN, S. W.; BAUR, R.; SIGEL, E. Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. **J Biol Chem**, v.277, n.48, p.46020-46025, 2002.
- BEAUMONT, G. The management of anxiety in general practice. **Postgrad Med J**, v.66 Suppl 2, n., p.S41-44, 1990.
- BELZUNG, C.; LE GUIQUET, A. M.; CRESTANI, F. Flumazenil induces benzodiazepine partial agonist-like effects in BALB/c but not C57BL/6 mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.148, n.1, p.24-32, 2000.
- BENARROCH, E. E. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v.76, n.3, p.287-293, 2011.
- BERNIK, M. A.; SOARES, M. B.; SOARES, C. N. [Benzodiazepines: patterns of use, tolerance and dependence]. **Arq Neuropsiquiatr**, v.48, n.1, p.131-137, 1990.



- BERNIK, M. A. Benzodiazepínicos: Quatro décadas de experiência. v., n., p., 1999.
- BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **Am J Physiol**, v.275, n.5 Pt 2, p.F633-650, 1998.
- BLANCO, G.; SANCHEZ, G.; MERCER, R. W. Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. **Arch Biochem Biophys**, v.359, n.2, p.139-150, 1998.
- BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v.21, n.1, p.16-19, 2000.
- BOTTGER, P.; DOGANLI, C.; LYKKE-HARTMANN, K. Migraine- and dystonia-related disease-mutations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases: relevance of behavioral studies in mice to disease symptoms and neurological manifestations in humans. **Neurosci Biobehav Rev**, v.36, n.2, p.855-871, 2012.
- BOWERY, N. G.; SMART, T. G. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. **Br J Pharmacol**, v.147 Suppl 1, n., p.S109-119, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, n., p.248-254, 1976.
- BRINES, M. L., et al. Regional distributions of hippocampal Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase, cytochrome oxidase, and total protein in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v.36, n.4, p.371-383, 1995.
- BRUNTON LAURENCE L., C. B., Knollmann BC. . **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 2011.
- CALDWELL, P. C.; KEYNES, R. D. The permeability of the squid giant axon to radioactive potassium and chloride ions. **J Physiol**, v.154, n., p.177-189, 1960.
- CAPENDEGUY, O.; HORISBERGER, J. D. The role of the third extracellular loop of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit in a luminal gating mechanism. **J Physiol**, v.565, n.Pt 1, p.207-218, 2005.
- CARRANZA, M. L.; FERAILLE, E.; FAVRE, H. Protein kinase C-dependent phosphorylation of Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit in rat kidney cortical tubules. **Am J Physiol**, v.271, n.1 Pt 1, p.C136-143, 1996.
- CASTILLO, J. P., et al. Mechanism of potassium ion uptake by the Na(+)/K(+)-ATPase. **Nat Commun**, v.6, p.7622, 2015.
- CHANG, Y., et al. Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. **J Neurosci**, v.16, n.17, p.5415-5424, 1996.
- CHENG, X. J., et al. Regulation of rat Na(+)-K(+)-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. **Am J Physiol**, v.273, n.6 Pt 1, p.C1981-1986, 1997.

- CHIBALIN, A. V., et al. Phosphorylation of the catalytic alpha-subunit constitutes a triggering signal for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase endocytosis. **J Biol Chem**, v.273, n.15, p.8814-8819, 1998.
- COBB, S. R., et al. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. **Nature**, v.378, n.6552, p.75-78, 1995.
- COHEN, I. M.; HARRIS, T. H. Effects of chlordiazepoxide in psychiatric disorders. **South Med J**, v.54, n., p.1271-1276, 1961.
- COLLINSON, N., et al. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. **J Neurosci**, v.22, n.13, p.5572-5580, 2002.
- CONTO, M. B.; VENDITTI, M. A. In vitro studies of the influence of glutamatergic agonists on the Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase and K<sup>(+)</sup>-p-nitrophenylphosphatase activities in the hippocampus and frontal cortex of rats. **J Negat Results Biomed**, v.11, n., p.12, 2012.
- CRESTANI, F., et al. Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. **Mol Pharmacol**, v.59, n.3, p.442-445, 2001.
- CROWLEY, T., et al. Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. **Brain Behav Immun**, v.54, n., p.260-277, 2016.
- CURTIS, D. R. Pharmacological investigations upon inhibition of spinal motoneurons. **J Physiol**, v.145, n.1, p.175-192, 1959.
- DAGER, S. R.; SWANN, A. C. Advances in brain metabolism research: toward a moving picture of neural activity. **Biol Psychiatry**, v.39, n.4, p.231-233, 1996.
- DE WEER, P., R. Fo Rakowski, Do C. Gadsby. **The Sodium Pump**. 1994.
- DOBRETSOV, M.; STIMERS, J. R. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. **Front Biosci**, v.10, n., p.2373-2396, 2005.
- DOSTANIC-LARSON, I., et al. Physiological role of the alpha1- and alpha2-isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.290, n.3, p.R524-528, 2006.
- DREXLER, B., et al. Diazepam decreases action potential firing of neocortical neurons via two distinct mechanisms. **Anesth Analg**, v.111, n.6, p.1394-1399, 2010.
- ELLIOTT, K. A.; VAN GELDER, N. M. Occlusion and metabolism of gamma-aminobutyric acid by brain tissue. **J Neurochem**, v.3, n.1, p.28-40, 1958.
- FERNANDES, M. J.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E. A. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v.28, n.5-6, p.497-500, 1996.

FIGHERA, M. R., et al. GM1 ganglioside prevents seizures, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylentetrazole. **Neurobiol Dis**, v.22, n.3, p.611-623, 2006.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. **J. Biol. Chem**, v.66, n., p.375, 1925.

FISONE, G., et al. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, v.269, n.12, p.9368-9373, 1994.

FLOREY, E. An inhibitory and an excitatory factor of mammalian central nervous system, and their action of a single sensory neuron. **Arch Int Physiol**, v.62, n.1, p.33-53, 1954.

FLOREY, E.; MC, L. H. The effects of factor I and of gamma-aminobutyric acid on smooth muscle preparations. **J Physiol**, v.145, n.1, p.66-76, 1959.

FUJISAWA, H., et al. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. **Jpn J Pharmacol**, v.15, n.4, p.327-334, 1965.

FURIAN, A. F., et al. Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum. **Neurochem Int**, v.50, n.1, p.164-171, 2007.

GANEVA, C., et al. Hofmeister effects of anions on the kinetics of partial reactions of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Biophys J**, v.77, n.1, p.267-281, 1999.

GASSMANN, M.; BETTLER, B. Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. **Nat Rev Neurosci**, v.13, n.6, p.380-394, 2012.

GRAEFF, F. G. F. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2012.

GREENBLATT, D. J.; FRIEDMAN, H. L.; SHADER, R. I. Correlating pharmacokinetics and pharmacodynamics of benzodiazepines: problems and assumptions. **Psychopharmacol Ser**, v.3, n., p.62-71, 1987.

GRISAR, T.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Astroglial contribution in human temporal lobe epilepsy: K<sup>+</sup> activation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in bulk isolated glial cells and synaptosomes. **Brain Res**, v.364, n.1, p.1-11, 1986.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v.12, n.2, p.141-149, 1992.

HAEFELY, W.; KULCSAR, A.; MOHLER, H. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. **Psychopharmacol Bull**, v.11, n.4, p.58-59, 1975.

HAYASHI, T. Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. **Nature**, v.182, n.4642, p.1076-1077, 1958.

- HEINZEN, E. L., et al. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. **Lancet Neurol**, v.13, n.5, p.503-514, 2014.
- HODGKIN, A. L.; HOROWICZ, P. The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibres. **J Physiol**, v.153, n., p.370-385, 1960.
- HOLM, T. H., et al. Cognitive deficits caused by a disease-mutation in the alpha3 Na(+)/K(+)-ATPase isoform. **Sci Rep**, v.6, n., p.31972, 2016.
- HORISBERGER, J. D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology (Bethesda)**, v.19, n., p.377-387, 2004.
- HORVAT, A., et al. Selective inhibition of brain Na,K-ATPase by drugs. **Physiol Res**, v.55, n.3, p.325-338, 2006.
- HUGHES, B. A., et al. cAMP stimulates the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in frog retinal pigment epithelium. **Am J Physiol**, v.254, n.1 Pt 1, p.C84-98, 1988.
- HUSSAIN, T.; ABDUL-WAHAB, R.; LOKHANDWALA, M. F. Bromocriptine stimulates Na<sup>+</sup>, K(+)-ATPase in renal proximal tubules via the cAMP pathway. **Eur J Pharmacol**, v.321, n.2, p.259-263, 1997.
- IVERSEN, L. L.; NEAL, M. J. The uptake of [3H]GABA by slices of rat cerebral cortex. **J Neurochem**, v.15, n.10, p.1141-1149, 1968.
- JAMME, I., et al. Modulation of mouse cerebral Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v.7, n.1, p.333-337, 1995.
- JEWELL, E. A.; LINGREL, J. B. Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. **J Biol Chem**, v.266, n.25, p.16925-16930, 1991.
- JONES DM, et al. Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Lipilocarpine model of status epilepticus. **Epilepsy Res**, 50: 301-12, 2002.
- KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu Rev Biochem**, v.71, n., p.511-535, 2002.
- KAPUR J, COULTER DA. Experimental status epilepticus alters gamma-aminobutyric acid type A receptor function in CA1 pyramidal neurons. **Ann Neurol**, 38: 893-900, 1995.
- KAPUR J, STRINGER JL, LOTHMAN EW. Evidence that repetitive seizures in the hippocampus cause a lasting reduction of GABAergic inhibition. **J Neurophysiol**, 61: 417-26, 1989.
- KELLEY, M. R., et al. Compromising KCC2 transporter activity enhances the development of continuous seizure activity. **Neuropharmacology**, v.108, n., p.103-110, 2016.

- KINOSHITA, P. F., et al. Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. **J Neuroinflammation**, v.11, n., p.218, 2014.
- KLODOS, I.; PLESNER, L. The influence of membrane charge on the kinetic properties of Na,K-ATPase. **Acta Physiol Scand Suppl**, v.607, n., p.235-239, 1992.
- KLODOS, I.; FEDOSOVA, N. U.; PLESNER, L. Influence of intramembrane electric charge on Na,K-ATPase. **J Biol Chem**, v.270, n.9, p.4244-4254, 1995.
- KNUDSEN FU. Rectal administration of diazepam in solution in the acute treatment of convulsions in infants and children. **Arch Dis Child**, 54: 855-7, 1979.
- KOSICKA, B., et al. [Gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and glutamate decarboxylase (GAD) activity of the brain of rats with extrapyramidal syndrome after acute manganese chloride poisoning]. **Neuropatol Pol**, v.23, n.2, p.191-200, 1985
- KRISHNAN, G. P.; BAZHENOV, M. Ionic dynamics mediate spontaneous termination of seizures and postictal depression state. **J Neurosci**, v.31, n.24, p.8870-8882, 2011.
- KRNJEVIC, K.; SCHWARTZ, S. Is gamma-aminobutyric acid an inhibitory transmitter? **Nature**, v.211, n.5056, p.1372-1374, 1966.
- KRNJEVIC, K.; SCHWARTZ, S. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. **Exp Brain Res**, v.3, n.4, p.320-336, 1967.
- KUFFLER, S. W.; EDWARDS, C. Mechanism of gamma aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. **J Neurophysiol**, v.21, n.6, p.589-610, 1958.
- KULLMANN, D. M., et al. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA<sub>A</sub> receptors in the CNS: where and why? **Prog Biophys Mol Biol**, v.87, n.1, p.33-46, 2005.
- KUTLU NO, et al. Buccal midazolam for treatment of prolonged seizures in children. **Brain Dev**, 25: 275-8, 2003.
- LADER, M. Dependence on psychotherapeutic drugs. **Trans Med Soc Lond**, v.108, n., p.53-60, 1991a.
- LADER, M. History of benzodiazepine dependence. **J Subst Abuse Treat**, v.8, n.1-2, p.53-59, 1991b.
- LEES, G. J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res Brain Res Rev**, v.16, n.3, p.283-300, 1991.
- LEE HH, JURD R, MOSS SJ. Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. **Mol Cell Neurosci**, 45: 173-9, 2010.
- LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry**. 2004.
- LI, K. X.; SPERELAKIS, N. Isoproterenol- and insulin-induced hyperpolarization in rat skeletal muscle. **J Cell Physiol**, v.157, n.3, p.631-636, 1993.

- LI, S.; STYS, P. K. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v.107, n.4, p.675-683, 2001.
- LINGREL, J., et al. Functional roles of the alpha isoforms of the Na,K-ATPase. **Ann N Y Acad Sci**, v.986, n., p.354-359, 2003.
- LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C.; GARCIA-GARCIA, P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. **J Anxiety Disord**, v.25, n.4, p.554-562, 2011.
- LOW, K., et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v.290, n.5489, p.131-134, 2000.
- LYNCH, C. J., et al. Differences in the role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase during alpha 1-adrenergic events in rat and rabbit aorta. **Pharmacology**, v.33, n.4, p.221-234, 1986.
- MACGREGOR SE.; JM., W. Inhibitors of the Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-atpase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v.105, n.1, p.1-9, 1993.
- MARCAIDA, G., et al. Glutamate induces a calcineurin-mediated dephosphorylation of Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase that results in its activation in cerebellar neurons in culture. **J Neurochem**, v.66, n.1, p.99-104, 1996.
- MARSHALL, F. H., et al. GABA(B) receptors function as heterodimers. **Biochem Soc Trans**, v.27, n.4, p.530-535, 1999.
- MARTIN, D. L.; RIMVALL, K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. **J Neurochem**, v.60, n.2, p.395-407, 1993.
- MARTIN, J. R.; JENCK, F.; MOREAU, J. L. Comparison of benzodiazepine receptor ligands with partial agonistic, antagonistic or partial inverse agonistic properties in precipitating withdrawal in squirrel monkeys. **J Pharmacol Exp Ther**, v.275, n.1, p.405-411, 1995.
- MATCHKOV, V. V.; KRIVOI, II. Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na,K-ATPase. **Front Physiol**, v.7, n., p.179, 2016.
- MATTHEW, J. B. Electrostatic effects in proteins. **Annu Rev Biophys Biophys Chem**, v.14, n., p.387-417, 1985.
- MCQUAIL, J. A.; FRAZIER, C. J.; BIZON, J. L. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. **Trends Mol Med**, v.21, n.7, p.450-460, 2015.
- MERLIS, S.; KOEPKE, H. H. The use of oxazepam in elderly patients. **Dis Nerv Syst**, v.36, n.5 Pt. 2, p.27-29, 1975.
- MIDDLETON, J. P., et al. Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells. **J Biol Chem**, v.268, n.21, p.15958-15964, 1993.

- MILLER, L. P., et al. Studies on the regulation of GABA synthesis: substrate-promoted dissociation of pyridoxal-5'-phosphate from GAD. **J Neurochem**, v.30, n.2, p.361-369, 1978
- MOBASHERI, A., et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Biosci Rep**, v.20, n.2, p.51-91, 2000.
- MOHLER, H.; OKADA, T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. **Science**, v.198, n.4319, p.849-851, 1977.
- MORRISETT RA, JOPE RS, SNEAD OC. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. **Exp Neurol**, 97: 193-200, 1987.
- MOSELEY, A. E., et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v.27, n.3, p.616-626, 2007.
- NAYLOR DE. Treating acute seizures with benzodiazepines: does seizure duration matter? **Epileptic Disord**, 16 (Suppl. 1): S69-S83, 2014.
- NISHI, A., et al. Regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **J Neurochem**, v.73, n.4, p.1492-1501, 1999.
- NORBY, J. G.; ESMANN, M. The effect of ionic strength and specific anions on substrate binding and hydrolytic activities of Na,K-ATPase. **J Gen Physiol**, v.109, n.5, p.555-570, 1997.
- NUTT, D. J.; MALIZIA, A. L. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **Br J Psychiatry**, v.179, n., p.390-396, 2001.
- OKADA, Y.; SHIMADA, C. Distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate decarboxylase (GAD) activity in the guinea pig hippocampus--microassay method for the determination of GAD activity. **Brain Res**, v.98, n.1, p.202-206, 1975.
- OLIVEIRA, M. S., et al. Prostaglandin E2 modulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem**, v.109, n.2, p.416-426, 2009.
- OLSEN, R. W., et al. Isolation of pharmacologically distinct GABA-benzodiazepine receptors by protein chemistry and molecular cloning. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v.46, n., p.35-49, 1990.
- OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nat Rev Neurosci**, v.3, n.9, p.715-727, 2002.
- PAVLOV, K. V.; SOKOLOV, V. S. Electrogenic ion transport by Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Membr Cell Biol**, v.13, n.6, p.745-788, 2000.

- PENG, L.; MARTIN-VASALLO, P.; SWEADNER, K. J. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. **J Neurosci**, v.17, n.10, p.3488-3502, 1997.
- PINAL, C. S.; TOBIN, A. J. Uniqueness and redundancy in GABA production. **Perspect Dev Neurobiol**, v.5, n.2-3, p.109-118, 1998.
- PINARD, A.; SEDDIK, R.; BETTLER, B. GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. **Adv Pharmacol**, v.58, n., p.231-255, 2010.
- PONTIGGIA, L.; WINTERHALTER, K.; GLOOR, S. M. Inhibition of Na,K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells. **FEBS Lett**, v.436, n.3, p.466-470, 1998.
- POST, R. L.; SUZUKI, K. A Hofmeister effect on the phosphoenzyme of Na,K-ATPase. **Soc Gen Physiol Ser**, v.46, n., p.201-209, 1991.
- POULSEN, H., et al. Phosphorylation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **FEBS Lett**, v.584, n.12, p.2589-2595, 2010.
- RAMAEKERS, J. G., et al. Considering the P450 cytochrome system as determining combined effects of antidepressants and benzodiazepines on actual driving performance of depressed outpatients. **Int Clin Psychopharmacol**, v.12, n.3, p.159-169, 1997.
- RANDALL, L. O. Pharmacology of chlordiazepoxide (Librium). **Dis Nerv Syst**, v.22(7)Suppl, n., p.7-15, 1961.
- RANDALL, L. O., et al. Pharmacological and clinical studies on Valium (T.M.) a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. **Curr Ther Res Clin Exp**, v.3, n., p.405-425, 1961.
- REIME KINJO, E., et al. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity is increased in the hippocampus after multiple status epilepticus induced by pilocarpine in developing rats. **Brain Res**, v.1138, n., p.203-207, 2007.
- ROBERTS, E.; FRANKEL, S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. **J Biol Chem**, v.187, n.1, p.55-63, 1950.
- RUDOLPH, U., et al. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. **Nature**, v.401, n.6755, p.796-800, 1999.
- SALVADORI, M. G., et al. Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures. **Epilepsia**, v.53, n.1, p.189-198, 2012.
- SARJA, T., et al. New method for measuring potential secondary stickies in deinked pulp filtrates. **Water Sci Technol**, v.50, n.3, p.207-215, 2004.
- SCAVONE, C., et al. Atrial natriuretic peptide modulates sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase through a mechanism involving cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. **J Pharmacol Exp Ther**, v.272, n.3, p.1036-1043, 1995.

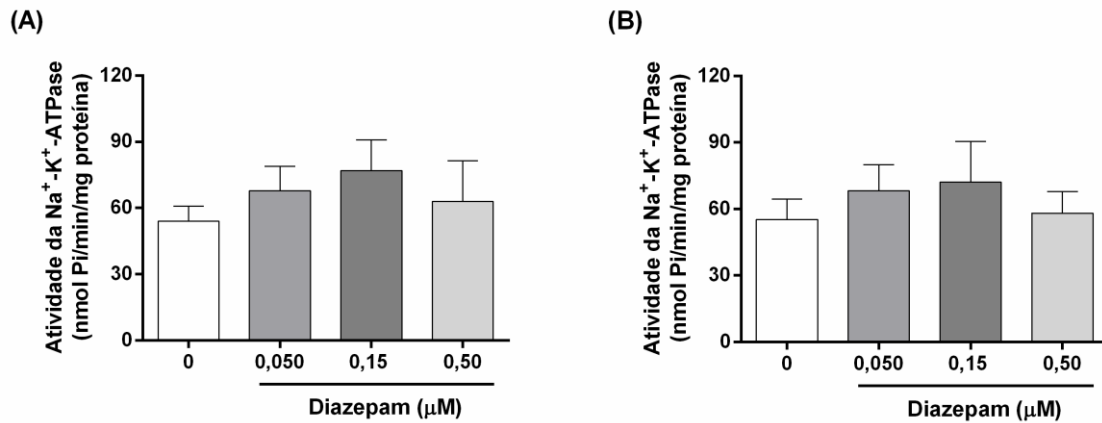


- SCAVONE, C., et al. Influence of age on nitric oxide modulatory action on Na(+), K(+)-ATPase activity through cyclic GMP pathway in proximal rat trachea. **Eur J Pharmacol**, v.388, n.1, p.1-7, 2000.
- SCHWARTZ, M. A.; POSTMA, E.; GAUT, Z. Biological half-life of chlordiazepoxide and its metabolite, demoxepam, in man. **J Pharm Sci**, v.60, n.10, p.1500-1503, 1971.
- SCHWARTZ, M. A.; POSTMA, E.; KOLIS, S. J. Metabolism of demoxepam, a chlordiazepoxide metabolite, in the dog. **J Pharm Sci**, v.60, n.3, p.438-444, 1971.
- SCOTT RC. Buccal midazolam as rescue therapy for acute seizures. **Lancet Neurol**, 4: 592-3, 2005.
- SIEGEL G, A. B., Albers RW e Molinoff Packey, D. J. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. **Elsevier**, v.7, 2006.
- SIEGHART, W. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. **Adv Pharmacol**, v.54, n., p.231-263, 2006.
- SIEGHART, W. Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. **Adv Pharmacol**, v.72, n., p.53-96, 2015.
- SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta**, v.23, n.2, p.394-401, 1957.
- STALEY K. Enhancement of the excitatory actions of GABA by barbiturates and benzodiazepines. **Neurosci Lett**, 146: 105-7, 1992.
- SOGHOMONIAN, J. J.; MARTIN, D. L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **Trends Pharmacol Sci**, v.19, n.12, p.500-505, 1998.
- SONNEWALD, U., et al. Direct demonstration by [13C]NMR spectroscopy that glutamine from astrocytes is a precursor for GABA synthesis in neurons. **Neurochem Int**, v.22, n.1, p.19-29, 1993.
- SORENSEN, T. L.; MOLLER, J. V.; NISSEN, P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. **Science**, v.304, n.5677, p.1672-1675, 2004.
- STAHL, S. M. Essential Psychopharmacology. **Medicine Cambridge**, v.4., 2013.
- STERNBACH, L. H. The benzodiazepine story. **J Med Chem**, v.22, n.1, p.1-7, 1979.
- STEWART, D. J.; SEN, A. K. Role of cyclic GMP in cholinergic activation of Na-K pump in duck salt gland. **Am J Physiol**, v.240, n.5, p.C207-214, 1981.
- STRICKLAND, J.; PARSONS, T. A practical handbook of seawater analysis. 1972.
- STRONJNY, N., et al. Determination of chlordiazepoxide, diazepam, and their major metabolites in blood or plasma by spectrophotodensitometry. **J Chromatogr**, v.143, n.4, p.363-374, 1977.

- SWEADNER, K. J. Overlapping and diverse distribution of Na-K ATPase isozymes in neurons and glia. **Can J Physiol Pharmacol**, v.70 Suppl, n., p.S255-259, 1992.
- SWEADNER, K. J., et al. Immunologic identification of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase isoforms in myocardium. Isoform change in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Circ Res**, v.74, n.4, p.669-678, 1994.
- TAN, K. R.; RUDOLPH, U.; LUSCHER, C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. **Trends Neurosci**, v.34, n.4, p.188-197, 2011.
- TANAKA, C. gamma-Aminobutyric acid in peripheral tissues. **Life Sci**, v.37, n.24, p.2221-2235, 1985.
- TAPPAZ, M. L.; BROWNSTEIN, M. J.; KOPIN, I. J. Glutamate decarboxylase (GAD) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in discrete nuclei of hypothalamus and substantia nigra. **Brain Res**, v.125, n.1, p.109-121, 1977.
- TAUB, M. L., et al. Regulation of the Na,K-ATPase activity of Madin-Darby canine kidney cells in defined medium by prostaglandin E1 and 8-bromocyclic AMP. **J Cell Physiol**, v.151, n.2, p.337-346, 1992.
- TEIXEIRA, V. L., et al. Isoform-specific regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase endocytosis and recruitment to the plasma membrane. **Ann N Y Acad Sci**, v.986, n., p.587-594, 2003.
- THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.279, n.3, p.C541-566, 2000.
- THOMPSON, S. M.; PRINCE, D. A. Activation of electrogenic sodium pump in hippocampal CA1 neurons following glutamate-induced depolarization. **J Neurophysiol**, v.56, n.2, p.507-522, 1986.
- TIURENKOV, I. N.; PERFILOVA, V. N. [GABA receptors: structure and functions]. **Eksp Klin Farmakol**, v.73, n.10, p.43-48, 2010.
- TOBIN, J. M.; LEWIS, N. D. New psychotherapeutic agent, chlordiazepoxide. Use in treatment of anxiety states and related symptoms. **JAMA**, v.174, n., p.1242-1249, 1960.
- TOBIN, J. M., et al. Clinical Evaluation of Oxazepam for the Management of Anxiety. **Dis Nerv Syst**, v.25, n., p.689-696, 1964.
- TRACHTENBERG, M. C.; PACKKEY, D. J.; SWEENEY, T. In vivo functioning of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated ATPase. **Curr Top Cell Regul**, v.19, n., p.159-217, 1981.
- TREIMAN DM, et al. A comparison of four treatments for generalized convulsive status epilepticus. Veterans Affairs Status Epilepticus Cooperative Study Group. **N Engl J Med**, 339: 792-8, 1998.
- VAILLEND, C., et al. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. **J Neurophysiol**, v.88, n.6, p.2963-2978, 2002.

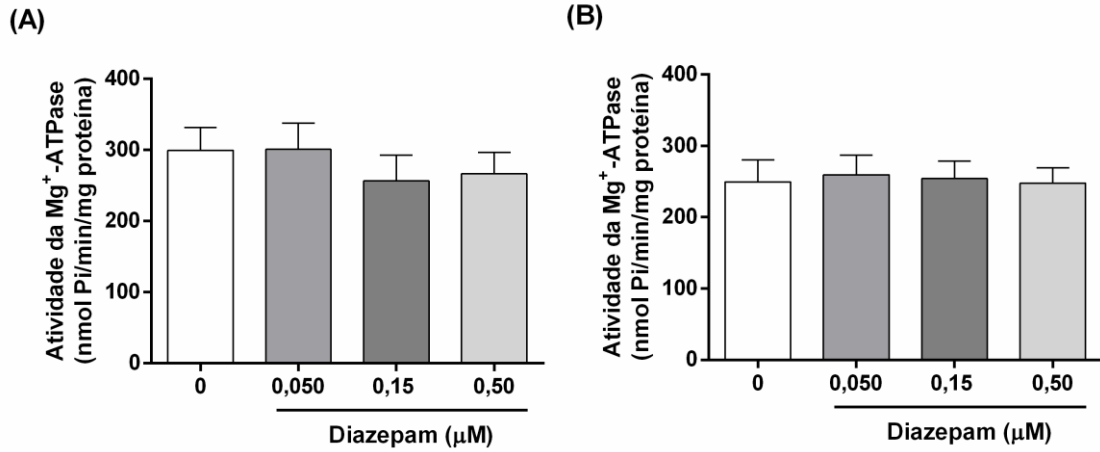
- VINCIGUERRA, M., et al. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the Na,K-pump in collecting duct principal cells. **Semin Nephrol**, v.25, n.5, p.312-321, 2005.
- WALTERS, R. J., et al. Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms. **Nat Neurosci**, v.3, n.12, p.1274-1281, 2000.
- WALTON NY, TREIMAN DM. Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam. **Exp Neurol**, 101: 267-75, 1988
- WIELAND, H. A.; LUDDENS, H.; SEEBURG, P. H. Molecular determinants in GABAA/BZ receptor subtypes. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v.47, n., p.29-40, 1992a.
- WIELAND, H. A.; LUDDENS, H.; SEEBURG, P. H. A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. **J Biol Chem**, v.267, n.3, p.1426-1429, 1992b.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. **J Biol Chem**, v.275, n.27, p.20693-20699, 2000.
- XIONG, Z. Q.; STRINGER, J. L. Extracellular pH responses in CA1 and the dentate gyrus during electrical stimulation, seizure discharges, and spreading depression. **J Neurophysiol**, v.83, n.6, p.3519-3524, 2000.

## APÊNDICE A – EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase EM FATIAS CORTICAIS



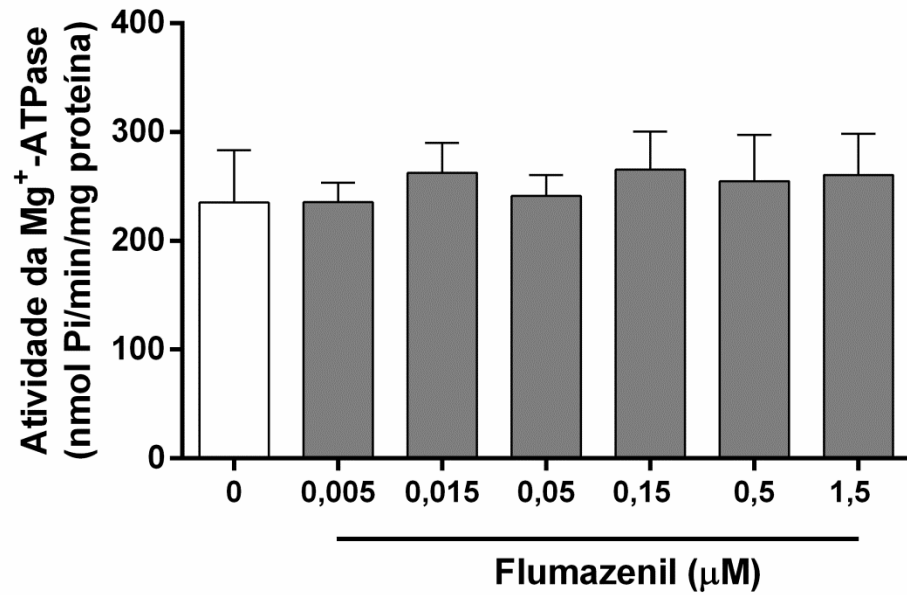
Apêndice A - Efeito do diazepam (0,05; 0,15 e 0,50 μM) na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em fatias corticais. Diazepam não alterou a atividade da enzima Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase contendo a subunidade α<sub>2/3</sub> (A) e α<sub>1</sub> [F(3, 27)= 1.045, *p*= 0,38; F(3, 27)= 0,8862, *p*= 0,46, respectivamente].

## APÊNDICE B – EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE A ATIVIDADE DA $Mg^{+}$ -ATPase EM FATIAS DE HIPOCAMPO E CÓRTEX ENTORRINAL



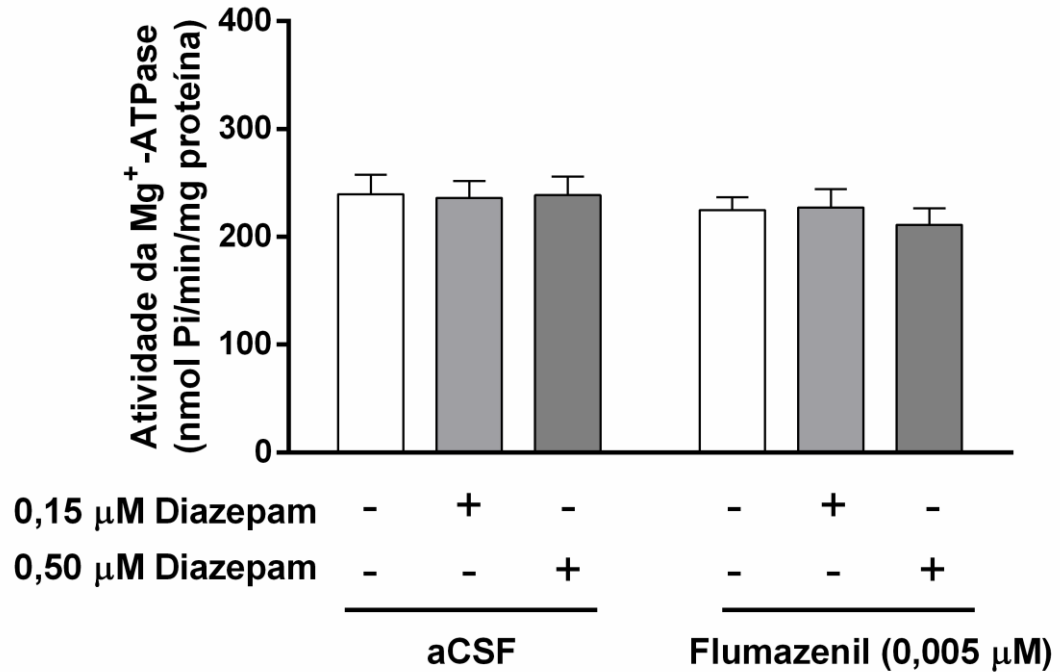
Apêndice B - Efeito do diazepam (0,05; 0,15 e 0,50  $\mu$ M) na atividade da  $Mg^{+}$ ATPase em fatias hipocâmpais. Diazepam não alterou a atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase em fatias de hipocampo (A) e córtex entorrinal (B) [ $F(3, 24) = 1.16$ ;  $p = 0,34$ ;  $F(3, 27) = 0,19$ ;  $p = 0,90$ , respectivamente].

**APÊNDICE C – EFEITO DO FLUMAZENIL SOBRE A ATIVIDADE DA  $Mg^{+}$ -ATPase EM FATIAS DE HIPOCAMPO**



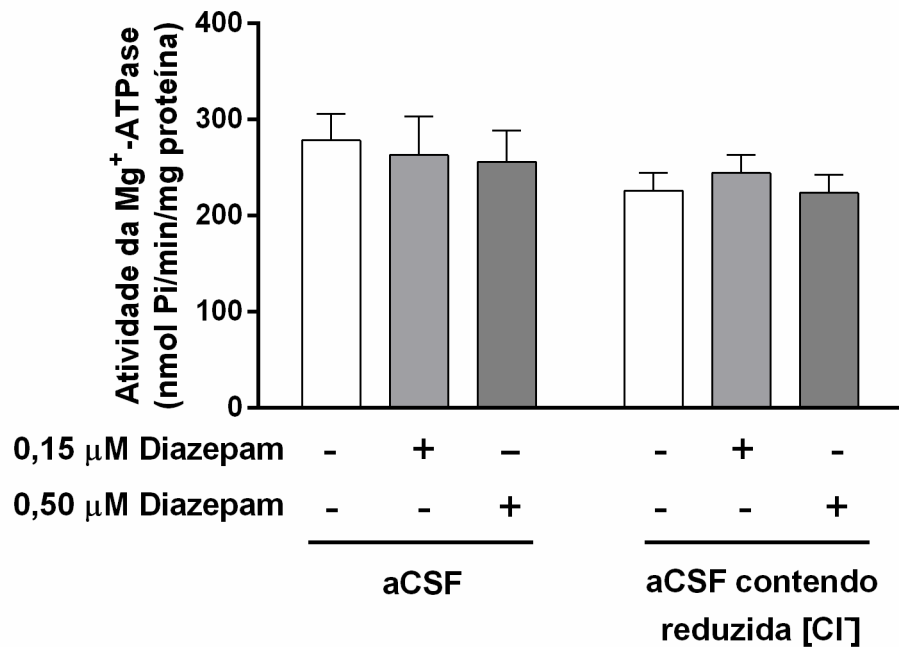
Apêndice C - Efeito do flumazenil sobre a atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase. Flumazenil não alterou a atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase em fatias de hipocampo [ $F(6,28) = 0,14$ ;  $p = 0,9882$ ].

**APÊNDICE D – ATIVIDADE DA  $Mg^{+}$ -ATPase NO ENSAIO DE PREVENÇÃO DO EFEITO DO DIAZEPAM POR FLUMAZENIL**



Apêndice D - Atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase no ensaio de prevenção do efeito do diazepam em fatias hipocâmpais. A atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase não foi alterada em fatias de hipocampo [F(5,51)= 0,18;  $p= 0,8277$ ].

**APÊNDICE E – EFEITO DA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO SOBRE A ATIVIDADE DA  $Mg^{+}$ -ATPase EM FATIAS DE HIPOCAMPO**



Apêndice E - Efeito da redução de concentração de cloreto no meio de incubação sobre a atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase. A atividade da  $Mg^{+}$ -ATPase não foi alterada em meio com baixa concentração de cloreto, em fatias de hipocampo [F(5,42)=2,37;  $p=0,131$ ].



## APÊNDICE F – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA-UFSM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da 

---

 Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase após crises epiléticas induzidas por Ácido Caínico em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 3847260216, sob a responsabilidade de **Carlos Fernando de Mello e equipe; Joseane Righes Marafiga; Ana Cláudia Jesse; André Londero; Fernanda Rossatto Temp** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 14/04/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity after kainic acid-induced seizures in mice", utilizing 204 Heterogenics mice (204 males), protocol number CEUA 3847260216, under the responsibility of **Carlos Fernando de Mello and team; Joseane Righes Marafiga; Ana Cláudia Jesse; André Londero; Fernanda Rossatto Temp** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 04/14/2016.

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

Vigência da Proposta: de [03/2016](#) a [03/2018](#)

Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [204](#)

Linagem: [Swiss](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Resumo: Dado o elevado número de pacientes com epilepsia que apresentam convulsões refratárias aos tratamentos atuais, torna-se importante a busca por novos alvos farmacológicos e o entendimento dos mecanismos envolvidos na indução e manutenção das crises epiléticas. Sabe-se que as crises epiléticas estão associadas à atividade hipersíncronica e repetitiva de um grupamento neuronal do encéfalo, porém existem mecanismos celulares e moleculares que não estão bem elucidados. Evidências indicam uma função crucial da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase no cérebro, a qual contribui para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potenciais de repouso e ação, captação e liberação de neurotransmissores, etc. Consequentemente, mudanças na atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase alteram diretamente a sinalização celular e a atividade neuronal, o que demanda atenção na área da pesquisa científica. Serão utilizados para o presente estudo camundongos Swiss machos, pesando em torno de 25 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais serão colocados em caixas de acrílico e habituados por 10 minutos. Um grupo de animais receberá Ácido Caínico (20 mg/Kg, i.p.) (Ben-Ari et al., 2000), veículo (PBS 0.2% i.p.), ou Diazepam (20 mg/Kg i.p.). Outro grupo de animais receberá administração de veículo (PBS 0.2% i.p.) e/ou Diazepam (20 mg/Kg i.p.). Após a injeção do agente convulsivante, os animais serão observados comportamentalmente para os seguintes parâmetros: latência para o primeiro episódio mioclônico; latência para a crise generalizada tônico-clônica; escala de Racine; número e duração das crises. Além disso, após a eutanásia, serão removidos para a análise o córtex e o hipocampo desses animais. Dessa forma, o objetivo desse estudo é investigar o efeito das convulsões induzidas por cainato sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em diferentes períodos de tempo após o início das crises epiléticas em camundongos e se as possíveis alterações na atividade da enzima são decorrentes da modificação no estado de fosforilação, carbonilação e nitratação da subunidade alfa ou lipoperoxidação.

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicidade (Labneuro), prédio 15 B.

Santa Maria, 16 de dezembro de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria