



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**ESPERMIDINA DIMINUI A ATIVIDADE DA ENZIMA  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase PELA VIA DE SINALIZAÇÃO  
NMDA/NOS/GMPc/PKG EM HIPOCAMPO DE RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Fabiano Barbosa Carvalho**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

**ESPERMIDINA DIMINUI A ATIVIDADE DA ENZIMA  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase PELA VIA DE SINALIZAÇÃO  
NMDA/NOS/GMPc/PKG EM HIPOCAMPO DE RATOS**

por

**Fabiano Barbosa Carvalho**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-orientador: Mauro Schneider Oliveira**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2011**

C331e Carvalho, Fabiano Barbosa

Espermidina diminui a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pela via de sinalização NMDA/NOS/GMPc/PKG em hipocampo de ratos / por Fabiano Barbosa Carvalho. – 2011.

81 f. : il. ; 31 cm

Orientadora: Maribel Antonello Rubin.

Coorientador: Mauro Schneider Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2011

1. Bioquímica 2. Espermidina 3. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 4. Receptor NMDA 5. Óxido Nítrico 6. PKG 7. Hipocampo I. Rubin, Maribel Antonello II. Oliveira, Mauro Schneider III. Título.

CDU 577.1

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave – CRB 10/1733  
Biblioteca Central da UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESPERMIDINA DIMINUI A ATIVIDADE DA ENZIMA  
Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase PELA VIA DE SINALIZAÇÃO  
NMDA/NOS/GMPc/PKG EM HIPOCAMPO DE RATOS**

elaborada por  
**Fabiano Barbosa Carvalho**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Comissão Examinadora**

---

**Maribel Antonello Rubin, Dr<sup>a</sup> (UFSM)  
(Presidente/ Orientadora)**

---

**Maria Rosa Chotilina Schetinger, Dr<sup>a</sup> (UFSM)  
(1<sup>o</sup> membro da banca)**

---

**Ana Flávia Furian, Dr<sup>a</sup> (UFSM)  
(2<sup>o</sup> membro da banca)**

**Santa Maria, 02 de dezembro de 2011**

Dedico este trabalho aos meus pais Ricardo e Gicelia por investirem nos meus sonhos, comemorando comigo cada vitória alcançada e me dando suporte nos momentos de dificuldade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu criador, e a Jesus Cristo por me abençoarem com oportunidade de viver com saúde e paz. Obrigado pela família maravilhosa no qual fui inserido, e pela oportunidade de continuar meus estudos e fazer pesquisa e ciência na Universidade Federal de Santa Maria. Peço que guiem meus passos por um caminho ético e digno, e que, de alguma forma, todos os meus esforços aqui em busca do conhecimento possam contribuir na vida de outras pessoas.

Agradeço aos meus pais Ricardo e Gicelia pelos exemplos de vida que me foram dados, e pela educação o qual fui submetido. Vocês formaram meu caráter, moldaram a minha personalidade e me prepararam para enfrentar todas as dificuldades da vida com muita fé e perseverança. Agradeço por abrirem mão de seus sonhos para que pudessem realizar o meu. A cada passo que dou na minha trajetória profissional, espero um dia retribuir tudo que me foi ofertado por vocês, sempre com muito amor. Amo vocês e que Deus nos abençoe com muita saúde, para que tenhamos sempre bons momentos em família!

Aos meus demais familiares, também quero deixar algumas palavras. As minhas irmãs Mariana e Rafaela obrigado por fazerem parte de todos os processos pelo qual passei e por permanecerem comigo em cada momento. Em especial a Rafa, obrigado pelas palavras de sabedoria e pelas orações constantes que influenciaram na tomada de minhas decisões e no meu sucesso. Obrigado pela sobrinha linda que me deste, o qual me faz muito feliz! Amo vocês.

Às minhas avós, agradeço por enfocarem a importância da educação para a vida. Obrigado vó Lany e vó Célia pelo amor incondicional, pela amizade e por todas as palavras de sabedoria que me auxiliaram nas minhas decisões. Vocês fazem parte de cada vitória que alcanço. Um grande beijo do eterno netinho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maribel sou grato pela recepção no LabNeuro, onde permitiu a realização do estágio e em seguida me aceitou como orientando no programa. A cada dia que passava, via uma pessoa maravilhosa e compreensiva! Uma orientadora exemplar, que sempre respeitou os meus limites e compreendeu as minhas dificuldades com muita paciência e dedicação, e também investiu no meu potencial. Obrigado professora por ser esta grande mestra, que me mostrou através

do seu exemplo que todas as dificuldades podem ser superadas. Muito obrigado por me aceitar como orientado e por ser essa amiga querida que levo guardada no meu coração. Grande abraço!

Descobri que na vida é impossível alcançar os objetivos que se deseja sozinho. Deus me abençoou com grandes amigos e quero agradecer aos meus irmãos de coração Thiago Soares, Roger Pontel e Fátima Abdalla que me acompanham desde a infância. Também merecem destaque e muitos agradecimentos Jeandre Jaques que me apresentou o Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicologia da UFSM. Insistiu que eu tentasse o processo seletivo me auxiliando desde o processo de aprovação no mestrado até a conclusão. Obrigado por tudo, deixo um grande abraço e que eu possa retribuir todos os esforços que você dedicou para me ajudar.

Aos meus colegas do LabNeuro, obrigado pela amizade e troca de conhecimento. Agradeço em especial àqueles que me estenderam a mão desde a entrada do laboratório e assim fizeram até o final do mestrado. Obrigado Sarinha, Cássia, Flávia, Raquele, Michelle, Daniela pela amizade e companheirismo.

Às minhas companheiras de bancada, obrigado pela paciência em trabalhar ao meu lado. A primeira, em especial, é a Patrícia Marisco. Nossa amizade já vinha de longa data. Foi minha professora na UNICRUZ, minha primeira orientadora em trabalhos de iniciação científica durante a graduação e também banca do meu TFG. Para minha surpresa, quando pedi estágio no Laboratório da Prof. Maribel, reencontro esta grande mestra e fui convidado a auxiliar nas suas atividades de doutorado. Que felicidade! A Pati, ou Prof. Pati, será sempre minha eterna mestra. Com ela aprendi coisas básicas desde a pipetagem, coleta de sangue, até o desenvolvimento de técnicas mais complexas que são desenvolvidas na Pós Graduação. É uma pessoa com grande competência profissional, detalhista e minuciosa nos experimentos, realizando tudo com perfeccionismo e cautela. Desta forma, ela me ensinou como trabalhar de forma que eu pudesse fazer meus ensaios com maior qualidade possível. Obrigado Pati pelos ensinamentos de vida e pela amizade. Você é um exemplo que desejo seguir para me tornar um excelente pesquisador e docente. Grande beijo. Em seguida, as minhas alunas de iniciação científica: Bruna Girardi e Anna Salla. Obrigado gurias pela dedicação e empenho em trabalhar comigo. Duas alunas muito aplicadas e inteligentes, que no momento que se tornaram minhas IC's contribuíram para acelerar os experimentos do meu

artigo. Bruninha e Anninha, obrigado pela ajuda! Vejo em vocês um futuro promissor, certamente serão grandes pesquisadoras!

Jessié Gutierrez, meu irmão, não há palavras que possam expressar meus agradecimentos. Tu és um exemplo de humildade e caráter. Impossível descrever o quanto me ajudaste nesses anos de mestrado. Discutimos junto muitos protocolos, artigos e resultados, e trabalhamos até de madrugada nos laboratórios fazendo inúmeros “ensaios” para vencermos o tempo em busca de resultados. Obrigado meu amigo por todo conhecimento compartilhado. E também pela companhia constante nas festas e bares. A amizade que fiz com você foi uma das melhores coisas que adquiri quando vim morar em Santa Maria. Que Deus me permita dividir contigo “muitas bancadas” num futuro próximo. Grande abraço.

Agradeço aos alunos do Laboratório da prof. Ester, da Prof. Rosa, do Prof. Juliano e do Prof Carlos Mello pela amizade que acabamos criando devido ao convívio diário no CCNE e CCS. Em especial agradeço a Beta, Naia, Juliano, Lú, Marília, Vitor Pimentel, Cláudia. Formamos uma grande família da bioquímica, o que torna as longas e exaustivas jornadas de trabalho mais agradável e divertida. Muito sucesso a todos vocês!

Aos professores Carlos Mello e Mauro Oliveira, colaborador e co-orientador deste trabalho. Obrigado pelos esclarecimentos, pela ajuda na tomada de decisões para os experimentos e, principalmente, pela contribuição na escrita do meu artigo. Através do conhecimento e da experiência científica de vocês consegui realizar este trabalho. Muito obrigado por dedicarem o seu tempo e paciência para o meu crescimento. Também agradeço a Prof. Maria Ester e ao Prof. Juliano Ferreira pela disposição, sempre oferecendo sugestões que acrescentaram nos meus experimentos. Grande abraço a todos vocês!

Aos professores da banca, muito obrigado pela disponibilidade e pelas contribuições na correção da minha dissertação!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica sou muito grato pela possibilidade da realização deste curso. Aqui além de todo conhecimento que obtive, tive a oportunidade de conhecer professores incríveis, pessoas fascinantes e, evidentemente, os amigos que fiz e levarei comigo por toda a vida. A UFSM e a Bioquímica Toxicológica fizeram e farão parte da minha vida, uma vez que me mostrou a importância da ciência e da pesquisa científica e também que, embora com pouco recurso, mas muita



dedicação, podemos fazer trabalhos de qualidade e contribuir ao mundo científico.  
Muito obrigado!

À CAPES deixo meu agradecimento pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Qualquer homem pode alcançar o êxito, se dirigir seus pensamentos numa direção e insistir neles até que aconteça alguma coisa. Aprenda a confiar em si mesmo e aprenderá o grande segredo da vida”.*

(Thomas Edison)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ESPERMIDINA DIMINUI A ATIVIDADE DA ENZIMA Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase PELA VIA DE SINALIZAÇÃO NMDA/NOS/GMPc/PKG EM HIPOCAMPO DE RATOS**

Autor: Fabiano Barbosa Carvalho  
Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-orientador: Mauro Scheiner Oliveira  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de dezembro de 2011.

A espermidina (SPD) é uma poliamina endógena com estrutura policatiônica presente no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. A SPD regula muitos processos biológicos, como o influxo de cálcio através dos receptores glutamatérgicos *N*-metil-D-aspartato (NMDA), o qual tem sido associado com a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e da via de sinalização da guanosina mono fosfato cíclica/proteína quinase dependente de GMPc (GMPc/PKG). Sabe-se que uma diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, bem como a sua expressão, prejudica diretamente a sinalização de neurotransmissores, comprometendo tanto aprendizado e a memória. A enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase estabelece os gradientes de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana de células excitáveis e desta forma mantém o potencial de membrana e contribui para o controle do volume e do pH celular. No entanto, não está bem definido se a SPD modula a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase no hipocampo de ratos. Neste estudo foi investigado se SPD altera a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em fatias de hipocampo de ratos, e o possível mecanismo envolvido neste processo. As fatias e o homogeneizado de hipocampo foram incubados com SPD (0,05-10 μM) por 30 minutos. SPD (0,5 e 1 μM) diminuíram a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em fatias, mas não no homogeneizado de hipocampo. MK-801 (100 μM), um antagonista não competitivo do receptor NMDA, arcaína (0,5 μM), um antagonista do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, e L-NAME (100 μM), um inibidor da NOS, preveniram o efeito inibitório da SPD (0,5 μM). ODN (10 μM), um inibidor da enzima guanilato ciclase, e KT5823 (2 μM), um inibidor da proteína quinase dependente de GMPc, também preveniram o efeito inibitório da SPD sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. SPD (0,5 e 1,0 μM) aumentaram os níveis de NO<sub>2</sub> *plus* NO<sub>3</sub> (NOx) nas fatias de hipocampo. MK-801 (100 μM) e arcaína (0,5 μM) preveniram o efeito da SPD (0,5 μM) sobre conteúdo de NOx. Estes resultados sugerem que a diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induzida pela SPD envolve a via de sinalização NMDA/NOS/GMPc/PKG.

Palavras-chave: Espermidina; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; Receptor NMDA; Óxido Nítrico; PKG, Hipocampo.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **SPERMIDINE INHIBITED Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase ACTIVITY ACROSS NMDA/ NOS/cGMP/PKG PATHWAY SIGNALING IN THE HIPPOCAMPUS OF THE RATS**

Author: Fabiano Barbosa Carvalho  
Advisor: Maribel Antonello Rubin  
Co-advisor: Mauro Schneider Oliveira  
Place and Date: Santa Maria, december 02<sup>th</sup>, 2011.

Spermidine (SPD) is an endogenous polyamine with polycationic structure present in the central nervous system of mammals. SPD regulates biological processes, such as Ca<sup>2+</sup> influx by glutamatergic *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor), which has been associated with nitric oxide synthase (NOS) and cGMP/PKG pathway activation and a decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats cerebral cortex synaptosomes. Decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, as well as decreased enzyme expression, directly impairs neurotransmitter signaling with deleterious consequences on learning and memory. The enzyme Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase establishes Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> gradients across membranes of excitable cells and by this means maintains membrane potential and controls intracellular pH and volume. However, it has not been defined whether SPD modulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus. In this study we investigated whether SPD alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in slices of hippocampus from rats, and possible underlying mechanisms. Hippocampal slices and homogenates were incubated with SPD (0.05-10 μM) for 30 minutes. SPD (0.5 and 1 μM) decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in slices, but not in homogenates. MK-801 (100 μM), a non-competitive antagonist of NMDA receptor, arcaine (0.5 μM), an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, and L-NAME (100 μM), a nitric oxide synthase inhibitor, prevented the inhibitory effect of SPD (0.5 μM). ODQ (10 μM), a guanylate cyclase inhibitor, and KT5823 (2 μM), a protein kinase G inhibitor, also prevented the inhibitory effect of SPD on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. SPD (0.5 and 1.0 μM) increased NO<sub>2</sub> plus NO<sub>3</sub> (NO<sub>x</sub>) levels in slices, MK-801 (100 μM) and arcaine (0.5 μM) prevented the effect of SPD (0.5 μM) on the NO<sub>x</sub> content. These results suggest that SPD-induced decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity involves NMDA/NOS/cGMP/PKG pathway.

Key-words: Spermidine; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; NMDA receptor; Nitric oxide; PKG; Hippocampus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	AMP cíclico
AMPA	Ácido -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AP-5	Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
ATP	Adenosina trifosfato
CO	Monóxido de carbono
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
GC	Guanilato ciclase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMP	Guanosina monofosfato
GMPC	GMP cíclico
L-NAME	<i>N</i> -arginina metil éster
MgluR	Receptor glutamatérgico metabotrópico
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
Receptor NMDA	Receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato
ODC	L- ornitina descarboxilase
SAM	S-adenosil-metionina
SAM-D	S-adenosil-metionina descarboxilada
SAMDC	S-adenosil-metionina descarboxilase
SNC	Sistema nervoso central
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase
PAO	Poliamina oxidase

PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PUT	Putrescina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das poliaminas .	23
Figura 2. Rotas de metabolismo e interconversão das poliaminas	25
Figura 3. Receptor NMDA	27
Figura 4. Reação catalisada pela NOS para a formação de NO.	28
Figura 5. Envolvimento do receptor NMDA na via de sinalização NOS/GMPc/PKG	29
Figura 6. Estrutura esquemática (A) e tridimensional (B) da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase e seus domínios	33
Figura 7. Ciclo catalítico da enzima Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase	34
Figura 8. Resíduos alvos para fosforilação por proteínas quinases	36
Figura 9. Vias de comunicação no hipocampo	39

## SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XIII
APRESENTAÇÃO.....	XV
1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	20
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
3.1 Poliaminas e sua estrutura .....	23
3.2 Síntese e metabolismo das poliaminas .....	24
3.3 Papel fisiológico das poliaminas.....	25
3.4 Poliaminas e o receptor NMDA .....	26
3.5 O óxido nítrico .....	27
3.6 Via de sinalização GMPc/PKG .....	29
3.7 Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	30
3.8 Estrutura e função da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase. ....	31
3.9 Ciclo reacional da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	33
3.10 Regulação da Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase.....	35
3.11 Poliaminas e a Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase .....	37
3.12 Hipocampo .....	38
5. CONCLUSÕES .....	69
REFERÊNCIAS.....	70



## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica, Conclusões desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido: European Journal of Pharmacology

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

As poliaminas putrescina, espermidina e espermina são aminas alifáticas que apresentam em sua estrutura grupamentos aminos protonados em pH fisiológico. Tal fenômeno confere às poliaminas uma estrutura policatiônica e as mesmas podem ser encontradas em diferentes tecidos (Carter, 1994). A poliamina espermidina (SPD) está amplamente distribuída no sistema nervoso central (SNC) e suas concentrações atingem os níveis de 0,5  $\mu\text{mol}$  por grama de tecido em hipocampo de ratos (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Seiler e Schmidt-Glenewinkel, 1975). Dentre suas propriedades biológicas, a SPD interage com sítios aniônicos de macromoléculas modulando o crescimento e a diferenciação celular. Além disso, SPD pode modular a atividade de canais iônicos (Johnson, 1996), incluindo canais de  $\text{K}^+$ , receptores glutamatérgicos do tipo  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) (Pellegrini-Giampietro, 2003) e *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Carter, 1994; Williams, 1997a; b; Janne, Alhonen *et al.*, 2005; Williams, 2009a).

De fato, evidências neuroquímicas e eletrofisiológicas mostram que as poliaminas modulam duplamente os receptores NMDA (Williams, Zappia *et al.*, 1994; Rock e Macdonald, 1995; Williams, 1997b). Desta forma, poliaminas em baixas concentrações (micromolares) aumentam a ligação de [ $^3\text{H}$ ]MK-801 e [ $^3\text{H}$ ]TCP no receptor NMDA, enquanto que em altas concentrações não alteram a ligação destes ligantes, resultando numa curva de concentração dose-resposta bifásica (Ransom e Stec, 1988; Sacaan e Johnson, 1990; Williams, 1997a; b).

A ativação do receptor NMDA se caracteriza pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual é essencial para a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e conseqüente

síntese de óxido nítrico (NO) (Prast e Philippu, 2001). O óxido nítrico é um gás neurotransmissor que possui a propriedade de estimular a enzima guanilato ciclase (GC) e com isso promover um aumento nos níveis intracelulares de GMP cíclico (GMPc) (Rubin e Ferrendelli, 1977; Garthwaite e Balazs, 1978), que é um segundo mensageiro necessário para ativar a proteína quinase dependente de GMPc (PKG).

Dentre os efeitos da PKG na neurotransmissão incluem aumento da liberação de neurotransmissores, dentre eles glutamato (Woody, Bartfai *et al.*, 1986; Branisteanu, Popescu *et al.*, 1988; Akamatsu, Inenaga *et al.*, 1993), e a capacidade de atuar como alvo pré-sináptico para mensageiros retrógrados no potencial de longa duração (LTP) (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Zhuo, Hu *et al.*, 1994; Arancio, Kandel *et al.*, 1995). Além disso, tem sido relatado o possível papel da PKG na regulação da atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Pontiggia, Winterhalter *et al.*, 1998; Munhoz, Kawamoto *et al.*, 2005).

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (EC 3.6.3.9) é uma enzima presente na membrana plasmática que desempenha um importante papel na manutenção da homeostase dos eletrólitos intracelulares em todos os tecidos restabelecendo os gradientes de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, extra e intracelular (Skou e Esmann, 1992). Além disso, a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase contribui para a manutenção do volume, do pH e das concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelulares, além do transporte de biomoléculas dependentes das concentrações de Na<sup>+</sup> (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994).

Tem sido descrito que o aumento nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular induzidas por glutamato diminuem a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em sinaptossomas do córtex cerebral e hipocampo de ratos, e o L-NAME, um inibidor da NOS, impede essa inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pelo glutamato (Avrova, Shestak *et al.*, 1999). Contudo, achados conflitantes têm sido reportados a respeito do efeito da

PKG sobre a atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, nos quais a PKG aumenta ou diminui a atividade desta enzima dependendo do modelo animal bem como o tipo de tecido analisado (Nathanson, Scavone *et al.*, 1995; Scavone, Scanlon *et al.*, 1995; Scavone, Glezer *et al.*, 2000; Munhoz, Glezer *et al.*, 2003; Munhoz, Kawamoto *et al.*, 2005; Scavone, Munhoz *et al.*, 2005).

É sabido que uma diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, bem como a sua expressão, prejudica diretamente a sinalização de neurotransmissores, comprometendo tanto o aprendizado e a memória quanto a atividade locomotora e ansiedade de ratos (Dos Reis, De Oliveira *et al.*, 2002; Moseley, Williams *et al.*, 2007). Experimentos *in vitro* mostram que o inibidor da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, a oubaína, aumenta o influxo de Ca<sup>2+</sup> em fatias de encéfalo de ratos (Fujisawa, Kajikawa *et al.*, 1965), induz a liberação de glutamato por transporte reverso de Na<sup>+</sup> na medula espinhal (Li e Stys, 2001) e causa morte em células hipocâmpais em ratos (Lees, Lehmann *et al.*, 1990). Em contrapartida, também foi encontrado que a inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase potencializa a neurotransmissão (Scuri, Lombardo *et al.*, 2007) e aumenta as correntes evocadas por receptores NMDA no hipocampo (Zhang, Guo *et al.*, 2011) bem como a expressão destes receptores no córtex e hipocampo de ratos (Bersier, Pena *et al.*, 2008; Bersier e Rodriguez De Lores Arnaiz, 2009).

Visto que nenhum estudo mostrou se baixas concentrações (micromolares) de SPD modulam a atividade da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, o presente estudo investigou se a poliamina SPD altera a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em hipocampo de ratos, e se a síntese de óxido nítrico e a via de sinalização NMDA/NOS/GMPc/PKG está envolvida neste efeito.

## 2. OBJETIVOS

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar o efeito da espermidina sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em hipocampo de ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Verificar se a SPD altera a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.
- 2) Investigar o envolvimento do receptor NMDA no efeito da SPD sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.
- 3) Avaliar se a enzima NOS e se a síntese de NO estão envolvidas no efeito da SPD sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.
- 4) Verificar se a via de sinalização  $\text{GMPc}/\text{PKG}$  está envolvida no efeito da SPD sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Poliaminas e a sua estrutura

O termo “poliaminas” é amplamente empregado para designar uma família de moléculas constituída pela putrescina, espermidina (SPD) e espermina, as quais estão presentes em células procarióticas e eucarióticas, plantas e animais (Thomas e Thomas, 2001). Quanto a sua caracterização estrutural, sabe-se que a putrescina é uma di-amina primária (1,4-butano diamina), espermidina é uma tri-amina (mono-*N*-3- aminopropil-1,4-diaminobutano), e espermina é uma tetra-amina (bis-*N*-3- aminopropil-1,4-diaminobutano). Estas aminas alifáticas simples são conectadas por átomos de nitrogênio e possuem respectivamente uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis (Carter, 1994; Williams, 1997b).

Os grupos amino das poliaminas são fortemente básicos, e em pH fisiológico encontram-se totalmente protonados conferindo a estas moléculas seu caráter policatiônico (Usherwood, 2000). A estrutura das poliaminas pode ser observada na figura 1.

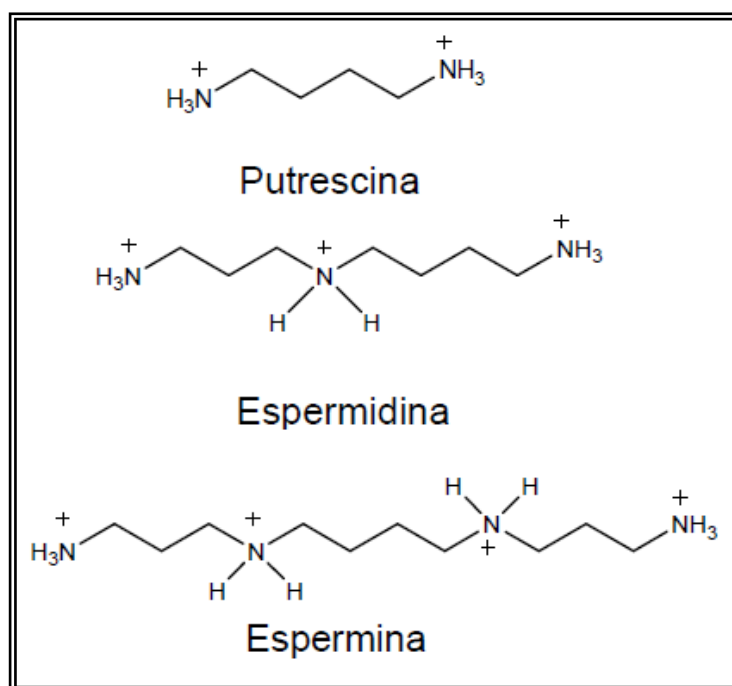


Figura 1. Estrutura química das poliaminas (adaptado de Williams, 1997b).

### 3.2 Síntese e metabolismo das poliaminas

A principal fonte de substrato para a síntese das poliaminas é originado no metabolismo de aminoácidos provenientes da alimentação (Teti, Visalli *et al.*, 2002). O precursor para a síntese de poliaminas endógenas é o aminoácido ornitina. No sistema nervoso central (SNC), a ornitina é formada a partir da ação hidrolítica da enzima arginase sobre o aminoácido arginina. A partir da formação da ornitina pela arginase, a síntese das poliaminas é iniciada (Carter, 1994).

A putrescina, primeira poliamina produzida no ciclo, é formada a partir de uma reação de descarboxilação da ornitina através da enzima ornitina descarboxilase (ODC). Uma vez formada, a putrescina serve como precursor imediato para a síntese de SPD e espermina. A produção de SPD requer um grupo aminopropil que é fornecido pela ação de duas enzimas: a S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), que descarboxila a S-adenosilmetionina (SAM), e a espermidina sintase, uma enzima transferase que catalisa a transferência do grupamento aminopropil da SAM para a putrescina. O produto da ação destas duas enzimas é a SPD, principal precursor para a síntese de espermina (Tabor, Rosenthal *et al.*, 1958; Tabor e Tabor, 1984; Urdiales, Medina *et al.*, 2001).

A formação da espermina também requer um grupamento aminopropil que é fornecido pela ação da SAMDC sobre a SAM, e a espermina sintase promove a transferência deste aminopropil para a SPD formando espermina (Tabor, Rosenthal *et al.*, 1958; Tabor e Tabor, 1984; Urdiales, Medina *et al.*, 2001).

Esta rota de síntese de poliaminas é reversível, ou seja, a espermina pode ser convertida em SPD e esta em putrescina. O primeiro passo desta interconversão é a acetilação da espermina ou SPD na posição N<sup>1</sup>, catalisada pela enzima espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT). Após este passo, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa, por ação da enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupos aminopropil provenientes da S-adenosilmetionina descarboxilada (SAM-D) para formar SPD e putrescina. O produto destas reações permanece no ciclo e pode ser reutilizado na síntese das poliaminas (Urdiales, Medina *et al.*, 2001; Seiler, 2004). A síntese e o metabolismo das poliaminas podem ser visualizados na figura 2.

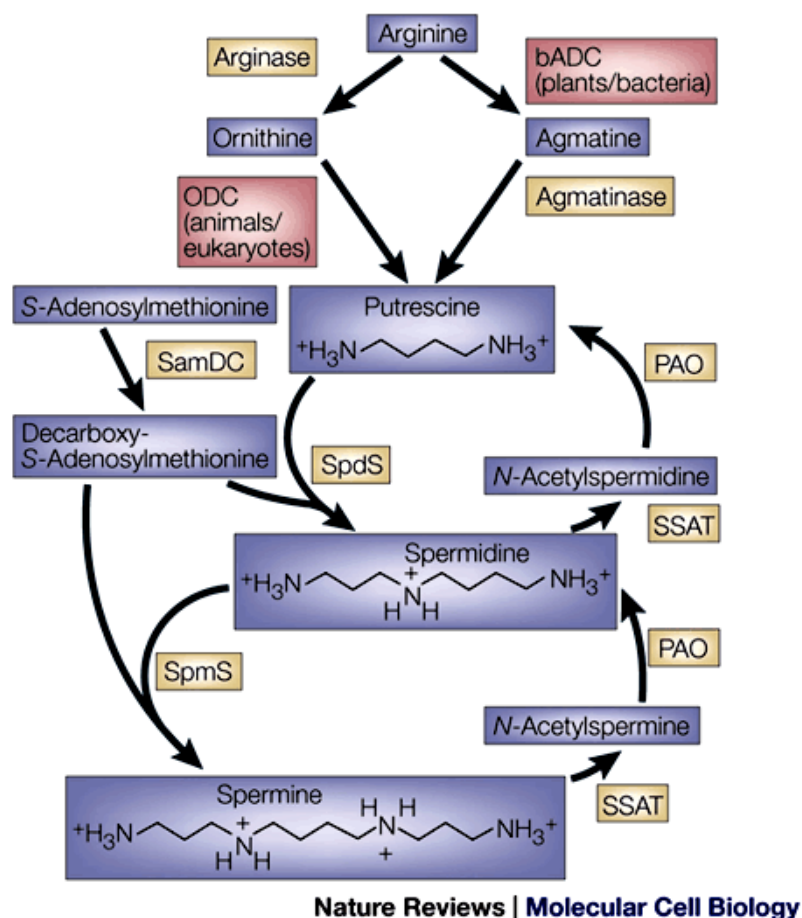


Figura 2. Rotas de metabolismo e interconversão das poliaminas (Coffino, 2001)

### 3.3 Papel fisiológico das poliaminas

Devido a sua natureza policatiônica, as poliaminas interagem com moléculas aniônicas. Estas interações eletrostáticas das poliaminas com as macromoléculas são responsáveis por grande parte de suas funções (Janne, Alhonen *et al.*, 2005). Entre seus papéis fisiológicos destacam-se a modulação do crescimento e da diferenciação celular (Tabor e Tabor, 1984), apoptose celular (Thomas e Thomas, 2001), estabilização dos ácidos desoxirribonucleico e ribonucleico (Igarashi e Kashiwagi, 2000), regulação da expressão gênica (Celano, Baylin *et al.*, 1989). Além disso, as poliaminas estão envolvidas promovendo a síntese de proteínas (Kashiwagi, Yamaguchi *et al.*, 1990; Igarashi, Saisho *et al.*, 1997; Yoshida, Meksuriyen *et al.*, 1999) e contribuindo para uma melhor função mitocondrial e metabolismo energético (Lenzen, Hickethier *et al.*, 1986; Lenzen, Munster *et al.*, 1992).

As poliaminas são descritas como importantes sinalizadores intracelulares no SNC e estudos têm apontado seu papel como neurotransmissores e neuromoduladores (Williams, Romano *et al.*, 1989; Williams, Romano *et al.*, 1991; Carter, 1994; Williams, 1997b; 2009b) uma vez que as poliaminas seguem os seguintes critérios:

a) as poliaminas são armazenadas em vesículas sinápticas; b) são liberadas de maneira  $\text{Ca}^{2+}$  dependente, através de um estímulo químico ou elétrico; c) existe um sistema de recaptção de alta afinidade para as poliaminas o qual regula seus níveis extracelulares bem como o tempo de efeito; d) dentre os alvos de ação das poliaminas se encontram canais iônicos (Williams, 1997a; b) tais como, canais de  $\text{K}^+$  retificadores de entrada, receptores AMPA, cainato e NMDA (Pellegrini-Giampietro, 2003).

### 3.4 Poliaminas e o receptor NMDA

O receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) é um receptor glutamatérgico formado por subunidades heteroméricas denominadas NR1, NR2 (A-D) e NR3 (A-B). Estas subunidades se agrupam formando um poro central com condutância seletiva para  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Quando o potencial de membrana está em repouso, o poro do receptor NMDA está bloqueado por íons  $\text{Mg}^{2+}$  os quais impedem a passagem de outros íons através do canal. Devido a uma despolarização prévia da membrana, decorrente da ativação de receptores glutamatérgicos AMPA, o  $\text{Mg}^{2+}$  é deslocado do poro permitindo a corrente de íons, ou seja, influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  e efluxo de  $\text{K}^+$  (Cotman, Monaghan *et al.*, 1988; Scatton, 1993; Lau e Zukin, 2007; Paoletti e Neyton, 2007)

De fato, evidências neuroquímicas e eletrofisiológicas demonstram que as poliaminas modulam duplamente os receptores NMDA (Williams, Zappia *et al.*, 1994; Rock e Macdonald, 1995; Williams, 1997b). Tem sido descrito que as poliaminas em baixas concentrações micromolares aumentam a ligação de  $[^3\text{H}]\text{MK-801}$  e  $[^3\text{H}]\text{TCP}$  para o receptor NMDA, enquanto que em altas concentrações não alteram a ligação destes ligantes, resultando numa curva de concentração dose-resposta bifásica (Ransom e Stec, 1988; Sacaan e Johnson, 1990; Williams, 1997a; b). A estrutura do receptor NMDA pode ser visualizada na figura 3.

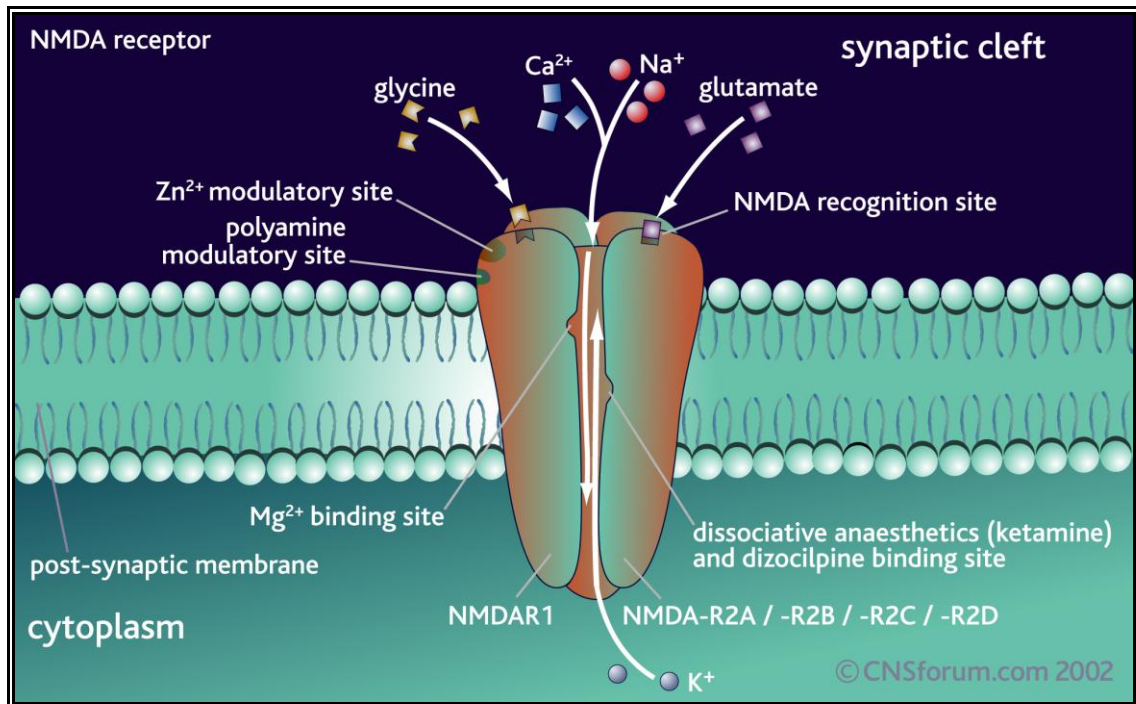


Figura 3. Receptor NMDA (Rang. et. al., 2001)

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrente da ativação do receptor NMDA ( Figura 3) é responsável pela ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares. Dentre elas se destacam a via NOS/GMPc/PKG. A ativação do receptor NMDA se caracteriza pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual é essencial para a ativação da NOS e conseqüente síntese de NO (Prast e Philippu, 2001).

### 3.5 O óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás neurotransmissor que possui a propriedade de estimular a enzima guanilato ciclase (GC) e com isso promover um aumento nos níveis intracelulares de GMPc (Rubin e Ferrendelli, 1977; Garthwaite e Balazs, 1978), que é um segundo mensageiro necessário para ativar a PKG.

A atuação do NO como mensageiro nas células do SNC foi inicialmente observada quando o glutamato, via receptores NMDA, estimulou a formação de NO em culturas de células granulares de cerebelo (Garthwaite, Charles *et al.*, 1988). Desde então, estudos relacionando a ativação de receptores NMDA com a produção de NO ganharam grande destaque tanto no contexto fisiológico (Ledo, Barbosa *et al.*, 2005) quanto nos processos de excitotoxicidade encontrados em diversas patologias cerebrais (Schroter, Andrabi *et al.*, 2005; Moncada e Bolanos, 2006;

Scott, Bowman *et al.*, 2007; Girouard, Wang *et al.*, 2009), dentre elas a Doença de Alzheimer (Fernandez-Vizarra, Fernandez *et al.*, 2004; Aliev, Palacios *et al.*, 2009).

O NO é neuromodulador das funções do SNC, que atua como um mensageiro retrógrado, uma vez que é produzido enzimaticamente em células pós-sinápticas e difunde-se para atuar em células pré-sinápticas (Garthwaite, 1991; 1995; Vincent, 2010). O caráter apolar do NO permite a sua difusão pelas membranas biológicas sem a necessidade de transportadores e, nos neurônios, a sua síntese é estimulada pela ativação do receptor NMDA e pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através deste receptor glutamatérgico (Prast e Philippu, 2001; Vincent, 2010).

As enzimas NOS constituem um grupo de isoenzimas responsáveis pela síntese do NO. Três isoformas de NOS são conhecidas e todas apresentam uma relativa homologia, embora também possuam algumas peculiaridades e sejam produtos de genes distintos. A nNOS (neuronal), ou NOS I, foi a primeira a ser clonada em cerebelo de ratos; em seguida a NOS II, também chamada de iNOS (induzível) foi obtida de macrófagos; e a eNOS (endotelial), ou NOS III, foi encontrada nas células endoteliais (Yun, Dawson *et al.*, 1996; Kopff e Kowalczyk, 2002; Forstermann e Sessa, 2011). Tanto a nNOS quanto a iNOS podem ser encontradas em células hipocâmpais (Doyle e Slater, 1997)

A síntese do NO se dá a partir do aminoácido arginina. A formação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina serve como cofator para a NOS, e numa reação dependente de NADPH, o NO é formado junto com o aminoácido citrulina (Nelson e Cox, 2011). A reação pode ser vista na figura 4.

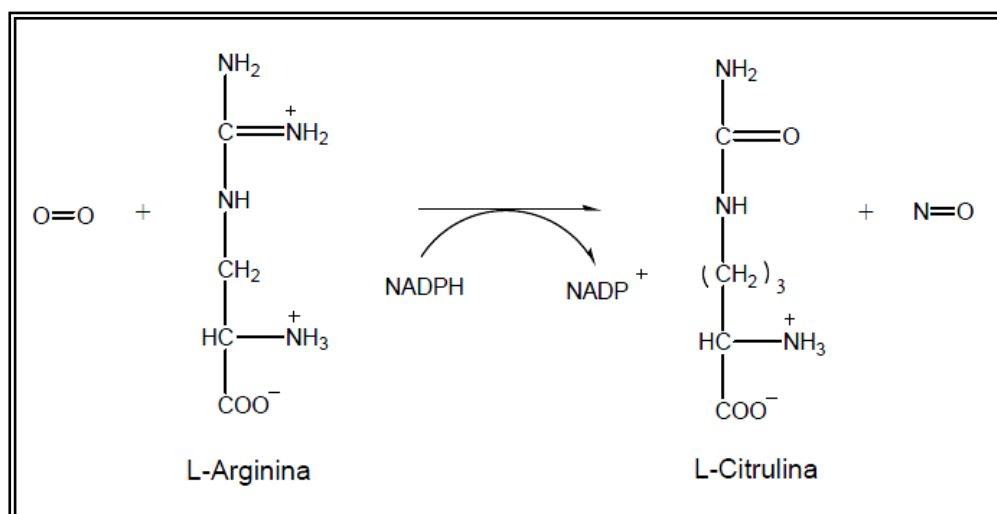


Figura 4. Reação catalisada pela NOS para a formação de NO (adaptado de Nelson and Cox, 2011).

### 3.6 Via de sinalização GMPc/PKG

O NO reage com  $\text{Fe}^{2+}$  encontrado no grupamento heme presente na estrutura de diversas proteínas e que também é utilizado como cofator de enzimas, ligando-se reversivelmente. Desta forma o NO é capaz de inibir a própria NOS (Assreuy, Cunha *et al.*, 1993) agindo como um regulador de sua síntese, ou ativar a guanilato ciclase solúvel (GCs), também denominada receptor de NO (Bellamy, Wood *et al.*, 2000; Bellamy e Garthwaite, 2002).

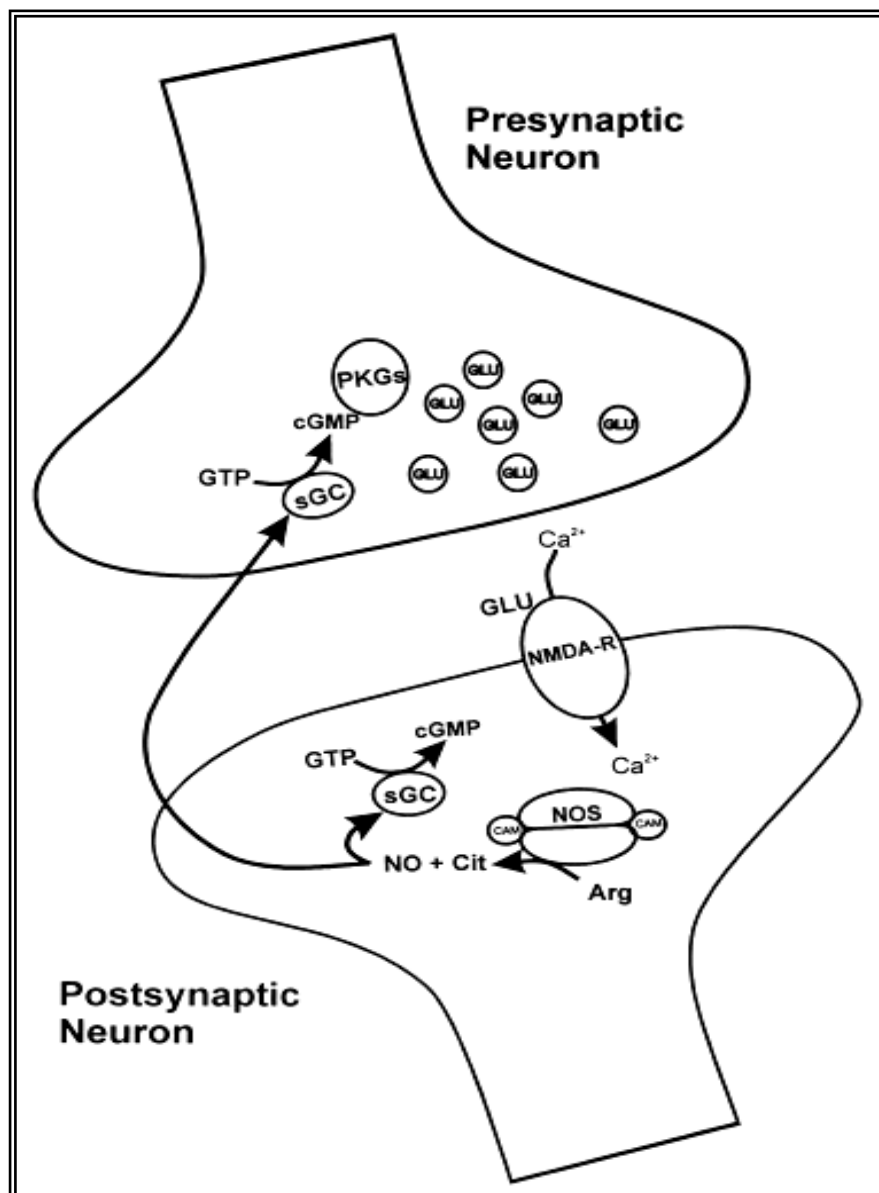


Figura 5. Envolvimento do receptor NMDA na via de sinalização NOS/GMPc/PKG (Kimura, Reynolds *et al.*, 2000).

A estimulação da enzima GC pelo NO promove a produção e aumento nos níveis de GMPc intracelular, e foi o primeiro mecanismo de ação descrito para o NO. Este segundo mensageiro modula diretamente a atividade de certos canais iônicos controlados por nucleotídeos e também ativa a PKG (Bellamy, Wood *et al.*, 2000; Prast e Philippu, 2001; Bellamy e Garthwaite, 2002).

Embora os mecanismos pelo qual o NO e o GMPc modulam a função neural ainda não estejam bem estabelecidos, a ativação da PKG e a fosforilação de proteínas intracelulares representam um importante papel em processos fisiológicos neuronais (Wang e Robinson, 1995; 1997). Dentre os efeitos biológicos ocasionados pela síntese de NO e ativação da via de sinalização GMPc/PKG está o estabelecimento do potencial de longa duração (LTP) em neurônios hipocâmpais. Tem sido demonstrado que um análogo do GMPc, o dibutilil GMPc, reverte a inibição da LTP em neurônios tratados com L-NAME, um inibidor da NOS (Haley, Wilcox *et al.*, 1992). Além disso, inibidores das enzimas GC e PKG produzem inibição da LTP também em fatias de hipocampo (Zhuo, Hu *et al.*, 1994). Outros estudos também apontam o envolvimento da PKG na regulação das correntes de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  (Meriney, Gray *et al.*, 1994), canais de  $\text{K}^+$  (Furukawa, Barger *et al.*, 1996), e na liberação de neurotransmissores (Akamatsu, Inenaga *et al.*, 1993; Pineda, Kogan *et al.*, 1996), como, por exemplo, a acetilcolina (Branisteanu, Popescu *et al.*, 1988).

### 3.7 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (*Sodium/potassium-exchanging ATPase*/EC 3.6.3.9) é uma enzima presente na membrana plasmática que desempenha um importante papel na manutenção da homeostase dos eletrólitos intracelulares em todos os tecidos. A partir de um sistema de transporte ativo movido pela hidrólise de moléculas de ATP, esta ATPase restabelece os gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , extra e intracelular (Skou e Esmann, 1992) e com isso, contribui para a manutenção do volume, do pH, das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, além do transporte de biomoléculas dependentes das concentrações de  $\text{Na}^+$  (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994). Esta enzima foi descoberta pelo pesquisador Jens Christian Skou que descreveu a atividade ATPásica desta enzima sobre a influência de



cátions em nervos periféricos no ano de 1957 (Skou, 1957). Esta descoberta rendeu a Skou, no ano de 1997, o prêmio Nobel de Química.

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é membro da família das ATPases, um grupo de proteínas integradas à membrana caracterizadas por um número conservado de seqüências específicas de aminoácidos, que hidrolizam o ATP e apresentam domínios hidrofóbicos responsáveis por formar as  $\alpha$ -hélices transmembrana (Burnay, Crambert *et al.*, 2003; Li, Crambert *et al.*, 2003; Crambert, Schaer *et al.*, 2004). Além disso, esta família também se caracteriza por apresentar um intermediário protéico fosforilado durante as reações do ciclo catalítico (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994; Kaplan, 2002). Também fazem parte desta família as enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase.

### 3.8 Estrutura e função da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase apresenta 3 subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A unidade funcional mínima desta enzima requer um heterodímero composto por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ . Este dímero pode estar co-localizado na subunidade  $\gamma$ , também conhecida como proteínas da família FXYD (Kaplan, 2002; Jorgensen, 2003; Jorgensen, Hakansson *et al.*, 2003).

A subunidade  $\alpha$  possui uma massa molecular de aproximadamente 113 kDa e aproximadamente 1020 resíduos de aminoácidos. Pelo menos 4 isoformas distintas já foram descritas:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ , sendo que estas se distribuem de maneira diferente conforme o tipo de tecido. A isoforma  $\alpha 1$  ocorre em quase todas as células; a  $\alpha 2$  é predominante em células musculares cardíacas e esqueléticas, neurônios e tecido adiposo; a  $\alpha 3$  ocorre no cérebro e coração e a  $\alpha 4$  especificamente nos testículos e epidídimo (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994; Blanco, Sanchez *et al.*, 1998). Na subunidade  $\alpha$  encontram-se os sítios de ligação para os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e o ATP. Além dos seus substratos, também apresenta o sítio alvo para glicosídeos cardiotônicos, como o inibidor oubaína (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994; Kaplan, 2002). As diferenças entre as isoformas da subunidade  $\alpha$  são mínimas, mas no que diz respeito à sensibilidade a inibidores como a oubaína, as isoformas  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  são muito mais sensíveis tendo um

IC<sub>50</sub> de 28,4 nM, enquanto que a isoforma  $\alpha 1$  apresenta um IC<sub>50</sub> de 89,4  $\mu$ M (Nishi, Fisone *et al.*, 1999; Nishi, Snyder *et al.*, 1999).

A subunidade  $\beta$  é formada por aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos e possui um tamanho de 55 kDa (Jorgensen, Hakansson *et al.*, 2003). Possui 3 isoformas:  $\beta 1$ , expressa predominantemente em todos os tecidos;  $\beta 2$ , expressa predominantemente no tecido muscular esquelético e em neurônios;  $\beta 3$ , expressa no fígado, rins e pulmão (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994; Kaplan, 2002). A subunidade  $\beta$  apresenta apenas um domínio transmembrana e sua dissociação da subunidade  $\alpha$  demonstrou perda da atividade ATPásica. Com isto, sugere-se que a subunidade  $\beta$  exerça um importante papel na estabilização da conformação ótima da subunidade  $\alpha$  na membrana plasmática (Beggah, Beguin *et al.*, 1999) e cooperando durante as alterações conformacionais no ciclo reacional da enzima (Kaplan, 2002; Jorgensen, Hakansson *et al.*, 2003; Horisberger, 2004).

A subunidade  $\gamma$  é a menor subunidade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase apresentando um peso molecular de aproximadamente 12 kDa e possuindo 50 resíduos de aminoácidos. Sabe-se que esta isoforma encontra-se em maior predominância em células renais (Therien, Karlish *et al.*, 1999) e a dissociação da subunidade  $\gamma$  do dímero  $\alpha\beta$  confere a enzima uma maior afinidade para íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> do que quando está associada a subunidade  $\gamma$  (Arystarkhova, Wetzel *et al.*, 1999). Além disso, a subunidade  $\gamma$  atua como um alvo modulatório da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Beguin, Wang *et al.*, 1997).

Na figura 7A, os 10 domínios transmembranas da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase são representados com  $\alpha$ -hélices. O domínio atuador (A, em vermelho) é constituído pelo primeiro segmento NH<sub>2</sub> terminal e o *loop* entre os segmentos 2 e 3.

O domínio de fosforilação (P, em azul) é composto das partes proximais e distais do *loop* intracelular entre os segmentos 4 e 5. Neste domínio se encontra o resíduo de aspartil D376 em que o fosfato do ATP é temporariamente transferido. O domínio do nucleotídeo (N, em verde) é composto por um *laço* intracelular que forma uma espécie de “bolsão” para a ligação do ATP. A subunidade  $\beta$  tem um único segmento transmembrana e uma curta porção NH<sub>2</sub> terminal intracelular. Porém, seu domínio extracelular é maior e apresenta vários sítios de glicosilação. As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  podem estar associadas a subunidade  $\gamma$ , pertencente a família de proteínas FXYD (Horisberger, 2004).

A figura 6B ilustra a estrutura tridimensional da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase mostrando os 3 diferentes domínios: autuador (laranja), fosforilação (azul), nucleotídeo (verde).

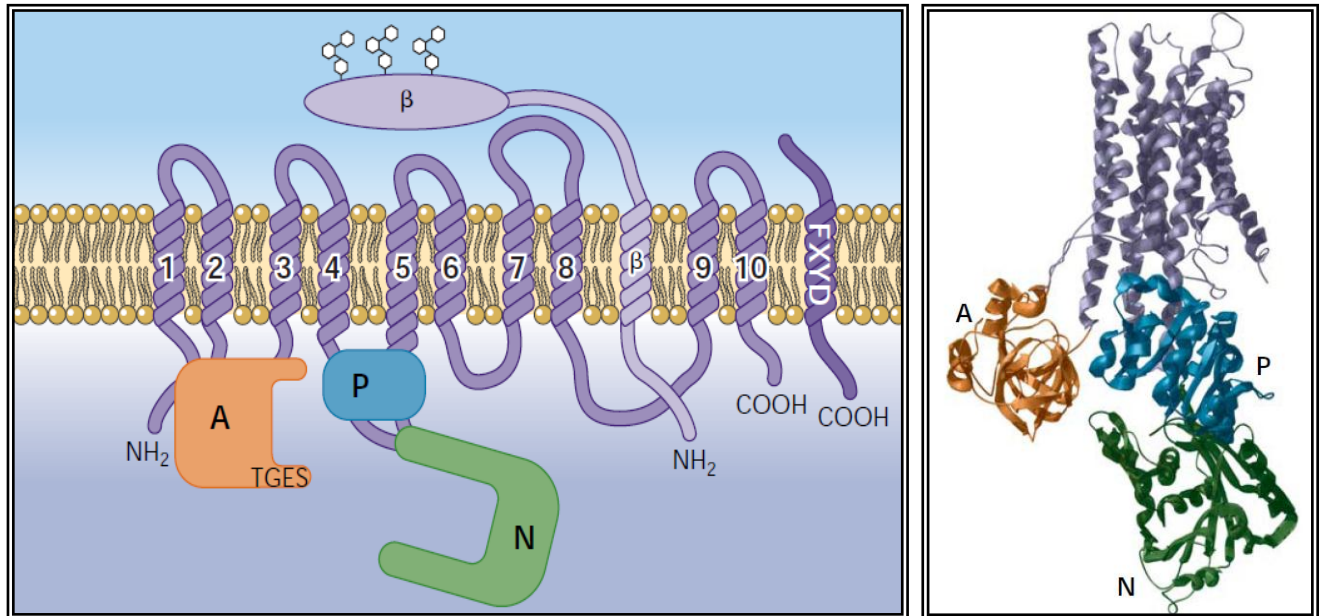


Figura 6. Estrutura esquemática (A) e tridimensional (B) da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e seus domínios (Horisberger, 2004).

### 3.9 Ciclo reacional da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase

Em condições fisiológicas a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase transfere três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular, dois íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular, hidrolisando uma molécula de ATP. Entretanto, esta enzima apresenta um complexo mecanismo de reação, sendo dividido em 4 etapas fundamentais e 2 estados conformacionais. O primeiro estado conformacional (E1) refere-se ao estado desfosforilado, com alta afinidade para íons  $\text{Na}^+$ . O segundo estado conformacional (E2) refere-se ao estado fosforilado, com alta afinidade para  $\text{K}^+$  (Lingrel e Kuntzweiler, 1994; Lingrel, Van Huysse *et al.*, 1994; Kaplan, 2002). Tal mecanismo pode ser esquematizado conforme a figura 7.

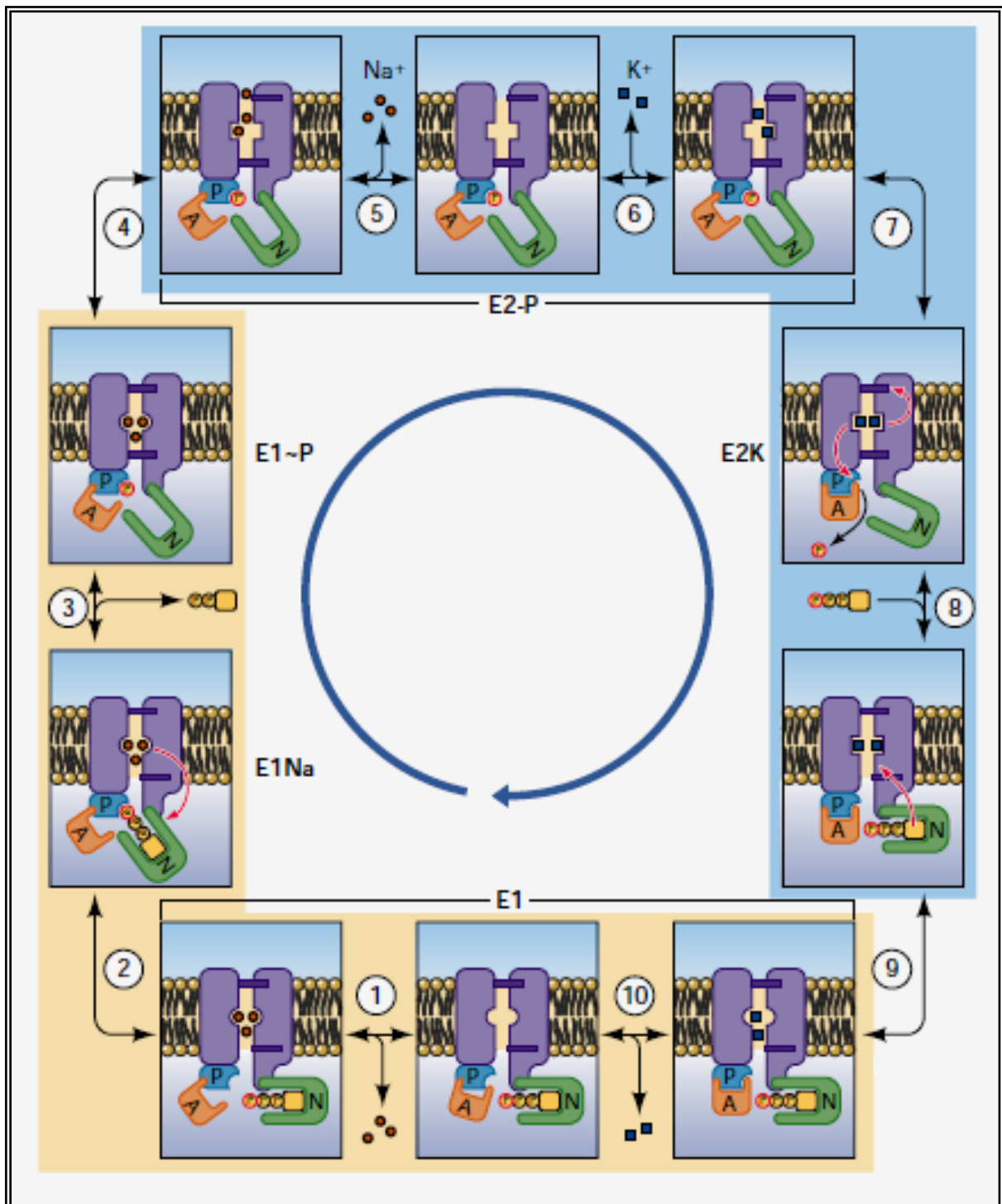


Figura 7. Ciclo catalítico da enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Horisberger, 2004).

Inicialmente, a enzima encontra-se desfosforilada. O ATP liga-se ao domínio nucleotídico (N) (1). Em seguida, ocorre a ligação de 3 íons sódio na face interna da enzima (2). Após a ligação dos íons Na<sup>+</sup>, ocorre a hidrólise do ATP com a transferência de um grupo Pi para o domínio fosfato (P) (3). A enzima fosforilada

sofre uma alteração conformacional expondo o sítio de ligação para  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular (4). Em seguida, os íons  $\text{Na}^+$  são liberados para o meio extracelular, contra o seu gradiente de concentração e os sítios de ligação para íons  $\text{K}^+$  são expostos ao meio extracelular (5). No próximo passo, 2 íons  $\text{K}^+$  ligam-se a enzima (6). A ligação dos íons  $\text{K}^+$  promove a desfosforilação da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (7). A desfosforilação da enzima promove uma alteração conformacional expondo o sítio com os íons  $\text{K}^+$  para o meio intracelular (8). A enzima desfosforilada apresenta baixa afinidade por íons  $\text{K}^+$ , liberando-os para o meio intracelular contra seu gradiente de concentração (9) (Horisberger, 2004).

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

A fosforilação de resíduos de aminoácidos é amplamente utilizada na regulação da atividade enzimática. A  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase é um importante alvo de fosforilação por apresentar resíduos alvo para diferentes proteínas quinases e assim manter a homeostase dos gradientes eletroquímicos neuronais (Yingst, 1988; Therien e Blostein, 2000; Poulsen, Morth *et al.*, 2010). Desta forma, a fosforilação destes resíduos permite o controle sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, e tal mecanismo vem sendo amplamente investigado (Han, Bossuyt *et al.*, 2010; Poulsen, Morth *et al.*, 2010).

Dentre as proteínas quinases capazes de modificar a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, as mais estudadas são a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e a proteína quinase C (PKC) (Han, Bossuyt *et al.*, 2010; Poulsen, Morth *et al.*, 2010). No entanto, estudos tem apontado um importante papel da PKG sobre a atividade desta enzima (Scavone, Scanlon *et al.*, 1995; Scavone, Glezer *et al.*, 2000; Munhoz, Kawamoto *et al.*, 2005; Scavone, Munhoz *et al.*, 2005).

Dentre os resíduos encontrados na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase encontram-se os de serina (Ser) 27, 63, 68 e, o mais descrito, 943. Além destes, a enzima possui também um resíduo de tirosina (Tyr) 10 e treonina (Thr) 96 (Poulsen, Morth *et al.*, 2010), que podem ser visualizados na figura 8.

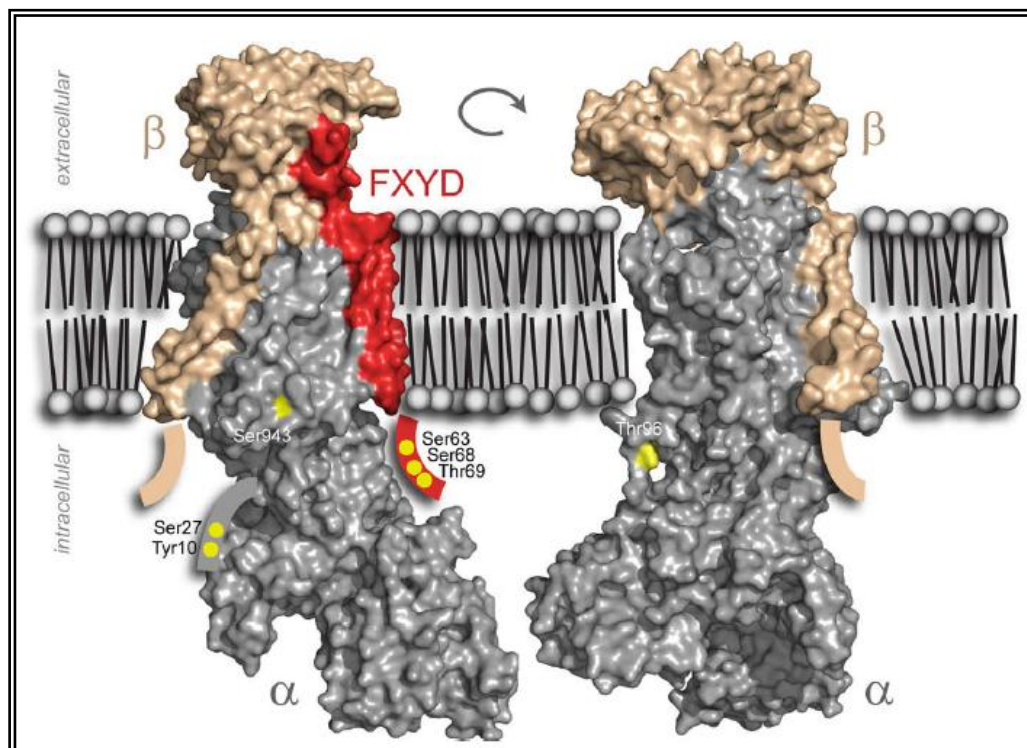


Figura 8. Resíduos alvos para fosforilação por proteínas quinases (Poulsen et al, 2010).

Dentre todos estes resíduos, já se observou um maior envolvimento da PKA (Fisone, Cheng *et al.*, 1994; Beguin, Beggah *et al.*, 1996; Cheng, Fisone *et al.*, 1997; Sweadner e Feschenko, 2001; Oliveira, Furian *et al.*, 2009; Han, Bossuyt *et al.*, 2010), e da PKC (Beguin, Beggah *et al.*, 1994; Cheng, Hoog *et al.*, 1997; Pedemonte, Pressley *et al.*, 1997; Feraille, Beguin *et al.*, 2000; Rangel, Malaquias *et al.*, 2001; Han, Bossuyt *et al.*, 2010) em fosforilar a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

O papel da PKG sobre a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase não está bem elucidado (Scavone, Scanlon *et al.*, 1995; Scavone, Glezer *et al.*, 2000; Scavone, Munhoz *et al.*, 2005). Estudos têm mostrado que a ativação da PKG aumenta a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em *Xenopus oocytes* (Fotis, Tatjanenko *et al.*, 1999), fatias da traquéia, estriado e cerebelo de ratos (Scavone, Glezer *et al.*, 2000; Munhoz, Kawamoto *et al.*, 2005; Scavone, Munhoz *et al.*, 2005), e diminui a atividade desta enzima em células endoteliais cerebrais (Pontiggia, Winterhalter *et al.*, 1998), da córnea, da íris e do plexo coróide de bovinos (Ellis, Nathanson *et al.*, 2000; Ellis, Nathanson *et al.*, 2001). Estes resultados mostram um efeito conflitante sobre a ativação da PKG e a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, uma vez que tal efeito varia conforme o tecido e modelo animal utilizado. Embora a PKG possa modular a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, ainda permanece desconhecido se o mecanismo de ação da PKG sobre a

atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase se dá por uma fosforilação direta nos resíduos de aminoácidos da enzima, ou por atuar indiretamente através da fosforilação de proteínas quinases/fosfatases e estas, por sua vez, atuam sobre a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.

Quanto a regulação da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, é sabido que uma diminuição da sua atividade, bem como da sua expressão, prejudica diretamente a sinalização de neurotransmissores, comprometendo tanto aprendizado e a memória quanto atividade locomotora e ansiedade de ratos (Dos Reis, De Oliveira *et al.*, 2002; Moseley, Williams *et al.*, 2007). Experimentos *in vitro* mostraram que o inibidor da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, oubaína, aumenta o influxo de Ca<sup>2+</sup> em fatias de encéfalo de ratos (Fujisawa, Kajikawa *et al.*, 1965), induz a liberação de glutamato por transporte reverso de Na<sup>+</sup> na medula espinhal (Li e Stys, 2001) e causa morte em células hipocámpais em ratos (Lees, Lehmann *et al.*, 1990). Em contrapartida, também foi encontrado que a inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase potencializa a neurotransmissão (Scuri, Lombardo *et al.*, 2007) e aumenta as correntes evocadas por receptores NMDA no hipocampo (Zhang, Guo *et al.*, 2011), bem como a expressão destes receptores no córtex e hipocampo de ratos (Bersier, Pena *et al.*, 2008; Bersier e Rodriguez De Lores Arnaiz, 2009).

### 3.11 Poliaminas e a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Alguns estudos têm mostrado o efeito de poliaminas sobre a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Tashima e Hasegawa, 1975; Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1977; Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1981; Charlton e Baylis, 1990). Têm-se discutido que a natureza policatiônica das poliaminas confere a elas a propriedade de modificar a atividade cinética da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Tashima e Hasegawa, 1975; Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1977; Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1981; Charlton e Baylis, 1990). Tal efeito se dá através das cargas positivas que as poliaminas apresentam em pH fisiológico, o que permite a sua interação com domínios ricos em resíduos de aminoácidos carregados negativamente na Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Johnson, Kuntzweiler *et al.*, 1995; Kuntzweiler, Wallick *et al.*, 1995).

Desta forma, conforme se aumenta gradativamente o número de cargas positivas da poliamina, maior é o seu efeito inibitório sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977; Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978). Isto porque foi demonstrado que as poliaminas diminuem a afinidade aparente da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase por íons  $\text{Na}^+$  competindo pelo seu sítio de ligação, bloqueando a formação do estado da enzima fosforilada (E-P), o qual é dependente de  $\text{Na}^+$ . Portanto, as poliaminas limitam as reações do ciclo enzimático da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978; Silva, Masui *et al.*, 2008).

Evidências experimentais suportam que SPD e espermina em concentrações na faixa de mM diminuem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membranas microsomais de ratos por competição com cátions monovalentes (Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978). Outro estudo demonstra que altas concentrações de SPD e espermina ( $>100 \mu\text{M}$ ) diminuem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase obtida de encéfalo de pintos (*Gallus domesticus*). Neste estudo a putrescina não apresentou efeito (Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977).

Baseado nestes achados, a hipótese para explicar tal efeito inibitório das poliaminas se dá pelo fato de atuarem como inibidores competitivos com cátions uma vez que um aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e ATP no meio reacional reverte essa inibição induzida pelas poliaminas (Tashima e Hasegawa, 1975; Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1977; Tashima, 1981).

### 3.12 Hipocampo

A poliamina espermidina (SPD) está amplamente distribuída no sistema nervoso central (SNC) e suas concentrações atingem os níveis de  $0,5 \mu\text{mol}$  por grama de tecido em hipocampo de ratos (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Seiler e Schmidt-Glenewinkel, 1975). O hipocampo está localizado no lobo temporal medial e possui grande importância nos processos cognitivos, sendo fundamental para a consolidação da memória. Esta estrutura cerebral apresenta a forma de cavalo marinho e possui duas camadas de neurônios: uma chamada de corno de Anon (CA); outra, giro denteado (DG). Para serem processadas, as informações chegam ao hipocampo através do córtex entorrinal (EC) por um feixe de neurônios chamados



via perforante. O ramo colateral de Schaffer (SC), no entanto, atua como fonte de saída das informações processadas no hipocampo (ver Figura 9) (Teyler e Discenna, 1986; Watts e Thomson, 2005).

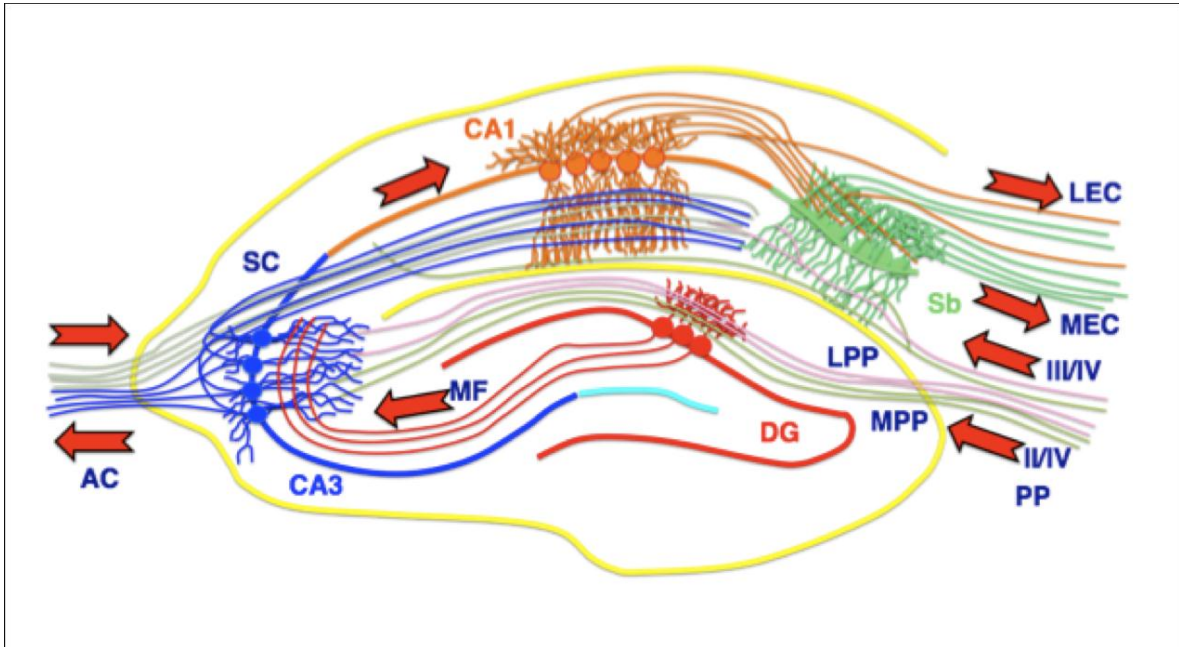


Figura 9. Vias de comunicação no hipocampo (Chevalyere e Siegelbaum, 2010).

Estudos com manipulações farmacológicas e bioquímicas no hipocampo podem alterar a memória de ratos em diferentes tarefas (Izquierdo, Fin *et al.*, 1995; Bernabeu, Schmitz *et al.*, 1996; Berlese, Sauzem *et al.*, 2005). Neste contexto, foi demonstrado que a administração intrahipocampal de SPD melhora a memória em ratos na tarefa da esQUIVA inibitória e que a arcaína, um antagonista das poliaminas para o receptor NMDA, previne seu efeito (Rubin, Boemo *et al.*, 2000; Guerra, Mello *et al.*, 2011). Além disso, também foi descrito que a síntese de óxido nítrico (Guerra, Mello *et al.*, 2006) e que a ativação da PKA e da proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (Guerra *et al.* 2011) estão envolvidas na melhora da memória induzida pela SPD.

Visto que a SPD possui importante papel no hipocampo modulando o receptor NMDA e atuando em processos de aprendizado e memória, compreender os efeitos biológicos da SPD sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e o envolvimento de vias de sinalização intracelulares neste efeito assume uma grande importância biológica.



#### 4.1 Manuscrito submetido para publicação na revista **European Journal of Pharmacology**

----- Mensagem encaminhada -----

**De:** maribel rubin <maribel.rubin@gmail.com>

**Para:** Fabiano Carvalho <fabiseco@yahoo.com.br>

**Enviadas:** Quinta-feira, 27 de Outubro de 2011 8:36

**Assunto:** Fwd: A manuscript number has been assigned to Spermidine decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats.

----- Forwarded message -----

**From:** **The European Journal of Pharmacology** <[ejp-office@pharm.uu.nl](mailto:ejp-office@pharm.uu.nl)>

**Date:** 2011/10/27

**Subject:** A manuscript number has been assigned to Spermidine decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats.

**To:** [maribel.rubin@gmail.com](mailto:maribel.rubin@gmail.com)

Dear Dr RUBIN,

Your submission entitled "Spermidine decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats." has been assigned the following manuscript number: EJP-35318.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

EJP Editorial Office  
Editorial Office  
European Journal of Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

--

Maribel A. Rubin  
Professora Associada Depto. Quimica, UFSM  
Fone (55) 3220 8053

**Spermidine decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats.**

Fabiano Barbosa Carvalho<sup>a</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>b</sup>, Patrícia da Costa Marisco<sup>b</sup>, Bruna Amanda Girardi<sup>a</sup>, Raquel Tonello<sup>a</sup>, Juliano Ferreira<sup>a</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>c</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departament of Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

<sup>b</sup>Departament of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

<sup>c</sup>Universidade Federal do Pampa - Campus Itaqui, Itaqui, RS 97650-000, Brazil.

\* Corresponding author. Tel./fax: + 55-55 3220 8053

*E-mail address:* [maribel.rubin@gmail.com](mailto:maribel.rubin@gmail.com) (M. A. Rubin)

Departament of Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

*Abbreviations:* Spermidine (SPD); NMDA receptor (N-methyl-D-aspartate receptors); NO (nitric oxide), cGMP (cyclic guanosine monophosphate); GC (guanylate cyclase); PKG (cGMP-dependent protein kinase); AMPAr ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor); NOS (nitric oxide synthase); NOx (NO<sub>2</sub> plus NO<sub>3</sub>).

## Abstract

Spermidine (SPD) is an endogenous polyamine with polycationic structure present in the central nervous system of mammals. SPD regulates biological processes, such as  $\text{Ca}^{2+}$  influx by glutamatergic *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor), which has been associated with nitric oxide synthase (NOS) and cGMP/PKG pathway activation and a decrease of  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity in rats cerebral cortex synaptosomes.  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase establishes  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  gradients across membranes of excitable cells and by this means maintains membrane potential and controls intracellular pH and volume. However, it has not been defined whether SPD modulates  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity in the hippocampus. In this study we investigated whether SPD alters  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity in slices of hippocampus from rats, and possible underlying mechanisms. Hippocampal slices and homogenates were incubated with SPD (0.05-10  $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes. SPD (0.5 and 1  $\mu\text{M}$ ) decreased  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity in slices, but not in homogenates. MK-801 (100  $\mu\text{M}$ ), a non-competitive antagonist of NMDA receptor, arcaïne (0.5  $\mu\text{M}$ ), an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, and L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), a nitric oxide synthase inhibitor, prevented the inhibitory effect of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ). ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), a guanylate cyclase inhibitor, and KT5823 (2  $\mu\text{M}$ ), a protein kinase G inhibitor, also prevented the inhibitory effect of SPD on  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity. SPD (0.5 and 1.0  $\mu\text{M}$ ) increased  $\text{NO}_2$  plus  $\text{NO}_3$  ( $\text{NO}_x$ ) levels in slices, MK-801 (100  $\mu\text{M}$ ) and arcaïne (0.5  $\mu\text{M}$ ) prevented the effect of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) on the  $\text{NO}_x$  content. These results suggest that SPD-induced decrease of  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity involves NMDA receptor/NOS/cGMP/PKG pathway.

**Keywords:** Spermidine;  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase; NMDA receptor; Nitric oxide; PKG; Hippocampus.

## 1. Introduction

Spermidine (SPD) is an aliphatic polyamine, which is present at high concentrations in the brain (Carter, 1994), particularly in the hippocampus (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Seiler e Schmidt-Glenewinkel, 1975; Liu, Gupta *et al.*, 2008). SPD interacts with anionic domains of macromolecules, modulating ion channel activity (Johnson, 1996), including those of glutamatergic  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) (Pellegrini-Giampietro, 2003) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Carter, 1994; Reynolds e Rothermund, 1995; Williams, 1997a; b; Janne, Alhonen *et al.*, 2005).

Accumulating body of evidence suggests that polyamines dually modulate the NMDA receptor (Williams, Zappia *et al.*, 1994; Rock e Macdonald, 1995; Williams, 1997b). Polyamines enhance [ $^3\text{H}$ ]MK-801 and [ $^3\text{H}$ ]TCP binding to the NMDA receptor at low micromolar concentrations but, at high concentrations, do not alter the binding of these ligands (Ransom e Stec, 1988; Sacaan e Johnson, 1990; Williams, 1997a; b). Accordingly, while low concentrations of polyamines enhance NMDA-evoked currents, high concentrations produce less enhancement or inhibit such currents (Sprosen e Woodruff, 1990; Rock e Macdonald, 1995; Williams, 1997b).

NMDA receptor activation causes  $\text{Ca}^{2+}$  influx and nitric oxide synthase (NOS) activation with consequent nitric oxide (NO) production (Prast e Philippu, 2001). NO stimulates guanylate cyclase (GC), increasing intracellular cyclic GMP (cGMP) levels (Rubin e Ferrendelli, 1977; Garthwaite e Balazs, 1978), which activates cGMP-dependent protein kinase (PKG). PKG-mediated effects on neurotransmission include inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  currents (Meriney, Gray *et al.*, 1994), increase of firing rate and neurotransmitter release (Woody, Bartfai *et al.*, 1986; Branisteanu, Popescu *et al.*, 1988; Akamatsu, Inenaga *et al.*, 1993). PKG has been implicated in long term potentiation (Anderson, Crossland *et al.*, 1975; Zhuo, Hu *et al.*, 1994; Arancio, Kandel *et al.*, 1995) and in  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase activity regulation (Pontiggia, Winterhalter *et al.*, 1998; Munhoz, Glezer *et al.*, 2003; Munhoz, Kawamoto *et al.*, 2005).

$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase (EC 3.6.3.9) plays a key role in the maintenance of intracellular electrolyte homeostasis (Skou e Esmann, 1992), and decreased enzyme activity or expression directly impairs signaling, with deleterious consequences on behavior (Dos Reis, De Oliveira *et al.*, 2002; Moseley, Williams *et al.*, 2007). The  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase inhibitor ouabain increases calcium influx in brain slices (Fujisawa,

Kajikawa *et al.*, 1965), induces glutamate release in the spinal cord (Li e Stys, 2001) and causes hippocampal cell death in rats (Lees, Lehmann *et al.*, 1990). In addition, glutamate decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity synaptosomal fractions, an effect that is prevented by L-NAME (Avrova, Shestak *et al.*, 1999). Moreover, it has been reported that, while PKG increases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in *Xenopus* oocytes (Fotis, Tatjanenko *et al.*, 1999), proximal trachea, striatum and cerebellum slices of rats (Scavone, Glezer *et al.*, 2000; Munhoz, Kawamoto *et al.*, 2005; Scavone, Munhoz *et al.*, 2005), it decreases enzyme activity in brain endothelial cells (Pontiggia, Winterhalter *et al.*, 1998), cornea, iris, lens and choroid plexus of bovine (Ellis, Nathanson *et al.*, 2000; Ellis, Nathanson *et al.*, 2001).

Accumulating evidence suggests that NO and SPD signaling pathways converge to cGMP/PKG pathway activation. However, until the present moment, no study has addressed whether SPD modulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Therefore, the aim of this study was to investigate whether SPD alters Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, and determine whether NMDA receptor/NOS/cGMP/PKG pathway is involved in such an effect.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (250-300 g), housed in plastic cages (five per cage) and maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 AM), in a temperature and humidity controlled environment were used. Food and water were available *ad libitum* (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil). All animal experimentation reported in this study was conducted in accordance with Brazilian law No. 11.794/2008, which is in agreement with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 068/2011). All efforts were made to reduce the number of animals used, as well as minimize their suffering.

## 2.2. Reagents

MK-801 (dizocilpine), N-[3-aminopropyl]-1.4-butanediamine trihydrochloride (spermidine); N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ] quinoxalin-1-one (ODQ); 2,3,9,10,11,12-hexahydro-10R-methoxy-2,9-dimethyl-1-oxo-9S,12R-epoxy-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6] benzodiazocine-10-carboxylic acid methyl ester (KT5823) were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). The 1,4-diguanidinobutane sulfate (araine) was obtained from Pfaltz & Bauer (Waterbury, CT, USA). KT5823 and araine were dissolved in 100 % dimethyl sulfoxide and then diluted with artificial cerebrospinal fluid (aCSF), in such a way that dimethyl sulfoxide concentration did not exceed 0.05 % in the incubated solution.

## 2.3. Preparation of slices

Animals were killed by decapitation and the hippocampus was immediately dissected and used for the preparation of slices (400  $\mu$ m thick) with a McIlwain tissue chopper. Slices were suspended in a pre-gassed (carbogen) aCSF containing (in mM): 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 22 NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1.8 MgCl<sub>2</sub>; 129.0 NaCl; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 3.5 KCl; 10 D-glucose, and pH was adjusted to 7.4 with carbogen. The viability of hippocampal slices was assessed after preparation by measuring lactate dehydrogenase activity with a standard commercial kit (Labtest, Porto Alegre, RS, Brasil). Hippocampal slices were viable for 60 min after preparation, and all experiments were performed in 30 or 60 min.

The effect of SPD (0.05-10  $\mu$ M) and drugs on hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was investigated by incubating 8–10 slices for 30 or 60 min at 37°C. After the incubation period, the medium was discarded and the slices were rinsed and gently homogenized in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for determination of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Drug concentrations used in this study were determined based on pilot experiments.

In those experiments designed to study the effect of SPD on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in homogenates, 8-10 hippocampal slices were homogenized and incubated with pre-gassed (carbogen) aCSF containing SPD (0.5-1  $\mu$ M) for 30 minutes. Then the homogenate was diluted in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for



determination of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. To investigate whether an intracellular component can block the inhibitory effect of SPD on the activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, 8-10 slices were incubated with tissue homogenate with pre-gassed (carbogen) aCFS containing SPD (0.5-1 μM) for 30 minutes. Then the homogenate was discarded and the slices were washed and homogenized in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for determination of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity.

#### 2.4. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity measurement

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was measured as previously described (Wyse, Streck *et al.*, 2000) with minor modifications. Briefly, 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 50 μg of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM), in a final volume of 350 μL. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 3 mM. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 70 μL of 50 % (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified colorimetrically, as previously described (Fiske e Subbarow, 1925), using NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as reference standard. Specific Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol of Pi/min/mg of protein.

#### 2.5. Assay of NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub> plus NO<sub>3</sub>) as a marker of NO synthesis

For NO<sub>x</sub> determination, an aliquot (200 μL) was homogenized in 200 mM Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and acetonitrile (96%, HPLC grade). After, the homogenate was centrifuged at 16,000 x g for 20 min at 4 °C and supernatant was separated for analysis of the NO<sub>x</sub> content as previously described (Miranda, Espey *et al.*, 2001). The resulting pellet was suspended in NaOH (6 M) for protein determination.

## 2.6. Protein determination

Protein content was determined colorimetrically (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (1 mg/mL) as standard.

## 2.7. Statistical analyses

Data were analyzed by a one- or two-way ANOVA. Post hoc analyses were carried out by the Student–Newman–Keuls (SNK) test. A probability of  $P < 0.05$  was considered significant. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## 3. Results

### 3.1. SPD decreases the $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in hippocampal slices

Figure 1 shows the effect of a 30 min- (Fig. 1A) or a 60 min-incubation (Fig. 1B) with SPD (0.05-10  $\mu\text{M}$ ) and (0.5-1  $\mu\text{M}$ ) respectively, on the activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in slices of hippocampus. Statistical analysis (one-way ANOVA followed by SNK Test) revealed that 30 min- and 60 min-incubation with SPD, at the concentrations of 0.5 and 1  $\mu\text{M}$  decreased  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity when compared with respective controls [F (6,42)=13.290,  $P < 0.001$ , Fig. 1A] and F [(2,12)=25.990,  $P < 0.001$ , Fig. 1B]. Figure 1C shows the results of the experiment designed to investigate whether SPD (0.5 and 1  $\mu\text{M}$ ) altered  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity by directly interacting with the enzyme in hippocampal homogenates. In this experimental condition SPD did not decrease  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity [F (2,12)=0.074,  $P > 0.05$ , Fig. 1C] suggesting that SPD-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity is not a direct effect on the enzyme and requires intact cells. Figure 1D shows the results of the experiment designed to investigate whether an intracellular component can block the inhibitory effect of SPD (0.5 and 1  $\mu\text{M}$ ) on the activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. In this experimental condition SPD decrease  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity [F (2,12)=9.236,  $P < 0.01$ , Fig. 1D], suggesting that the exposure of SPD to intracellular content by

incubating the slices plus homogenate does not prevent the inhibitory effect of SPD (0.5 and 1  $\mu\text{M}$ ) on the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in slices.

### 3.2. MK-801 and arcaine prevent the inhibitory effect of SPD

Figure 2 shows the effect of incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and MK-801 (100  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of rat hippocampal slices (Fig. 2A). Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant vehicle or spermidine versus vehicle or MK-801 interaction [F (1,20)=11.410,  $P < 0.05$ , Fig. 2A], suggesting that co-incubation with a non-competitive antagonist of the NMDA receptor prevents SPD-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Figure 2 shows the effect of co-incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and arcaine (0.5  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of rat hippocampal slices (Fig. 2B). Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant vehicle or spermidine versus vehicle or arcaine interaction [F (1,24)=4.540,  $P < 0.05$ , Fig. 2B], suggesting that co-incubation with an antagonist of the polyamine-binding site at the NMDA receptor prevents SPD-induced decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity.

### 3.3. L-NAME prevents the inhibitory effect of SPD

Figure 3 shows the effect of the co-incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and of L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), NOS inhibitor, on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in hippocampal slices. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant vehicle or spermidine versus vehicle or L-NAME interaction [F (1,20)=7.976,  $P < 0.05$ , Fig. 3], suggesting that co-incubation of L-NAME prevents the decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity induced by spermidine.

### 3.4. ODQ prevents the inhibitory effect of SPD

Figure 4 shows the effect of the co-incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), a GC inhibitor, on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in hippocampal slices. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant vehicle or spermidine versus vehicle or ODQ interaction [F (1,28)=7.397,  $P < 0.05$ , Fig. 4], suggesting that the incubation with ODQ prevents the decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity induced by spermidine.

### 3.5. KT5823, PKG inhibitor, prevents the inhibitory effect of SPD

Figure 5 shows the effect of the co-incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and KT-5823 (2  $\mu\text{M}$ ), a cGMP-dependent protein kinase selective inhibitor, on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity of hippocampal slices. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed also a significant vehicle or spermidine versus vehicle or KT-5823 interaction [F (1,24)=9.385,  $P < 0.05$ , Fig. 5], suggesting that the incubation with KT-5823 also prevents the decrease of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity induced by spermidine.

### 3.6. SPD increases the NOx content in slices of hippocampus

Figure 6 shows the effect of a 30 min incubation with SPD (0.5 and 1.0  $\mu\text{M}$ ) on the NOx content in slices of hippocampus. Statistical analysis (one-way ANOVA followed by SNK Test) revealed that 30 min-incubation with SPD, at the concentrations of 0.5 and 1  $\mu\text{M}$  increased NOx content when compared with respective control [F (2,20)=17.16,  $P < 0.001$ , Fig. 6]

### 3.7. MK-801 and arcaine prevents the increasing the NOx content induced by SPD

Figure 7A shows the effect of incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and MK-801 (100  $\mu\text{M}$ ) on NOx content in slices of hippocampus. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant vehicle or spermidine versus vehicle or MK-801 interaction [F (1,22)=6.720,  $P < 0.05$ , Fig. 7A], suggesting that co-incubation with a non-competitive antagonist of the NMDA receptor prevents SPD-induced increase of NOx levels. Figure 7B shows the effect of co-incubation of SPD (0.5  $\mu\text{M}$ ) and arcaine (0.5  $\mu\text{M}$ ) on NOx content of rat hippocampal slices. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant vehicle or spermidine versus vehicle or arcaine interaction [F (1,22)=4.840,  $P < 0.05$ , Fig. 7B], suggesting that co-incubation with an antagonist of the polyamine-binding site at the NMDA receptor prevents SPD-induced increase of NOx levels.

#### 4. Discussion

In this study we showed that spermidine decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampal slices of rats. We also showed that MK-801, arcaine, L-NAME, ODQ and KT5823 prevented the inhibitory effect of SPD on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Interestingly, SPD did not alter Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampal homogenates but decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity when incubated with slices plus homogenate. In addition, SPD increases the NO<sub>x</sub> levels in hippocampal slices and this effect was prevented by MK-801 and arcaine.

It has been shown that the polycationic nature of polyamines confers them the property of modifying the activity of many enzymes, among them, the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Tashima e Hasegawa, 1975; Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1977; Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978; Tashima, Hasegawa *et al.*, 1981; Charlton e Baylis, 1990). It has been previously argued that polyamine positive charges may interact with the cationic-binding domains of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, classically described to be rich in acidic amino acid residues in mammals (Johnson, Kuntzweiler *et al.*, 1995; Kuntzweiler, Wallick *et al.*, 1995). Accordingly, the effect of polyamines increases with the number of positive charges in the molecule (Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977; Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978). It has been described that polyamines decrease the apparent affinity of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase for Na<sup>+</sup> in the cytoplasmic site, blocking the formation of phosphoenzyme state formation (E-P), which is Na<sup>+</sup>-dependent. The polyamines also stabilize the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase phosphorylated intermediate, limiting the rate and the reaction cycle of this ATPase (Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978; Silva, Masui *et al.*, 2008).

Experimental evidence supports that both SPD and spermine (SPM), in the mM range, inhibit Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat brain microsomal membranes by competing with the monovalent activating cations involved in the ATPase reaction (Quarfoth, Ahmed *et al.*, 1978). Other studies performed with chick (*Gallus domesticus*) brain demonstrated that 40 μM SPM inhibited nearly 50% of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, while 100 μM SPD caused an inhibition of 20% (Heinrich-Hirsch, Ahlers *et al.*, 1977). The same study has shown that putrescine is devoid of effect. Heinrich-Hirsch and colleagues (1977) have suggested that this effect of polyamines is due to a competitive inhibition with cations, since increasing Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ATP concentrations reverses the inhibition.

The currently described inhibitory effect of SPD on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was observed only in hippocampal slices, suggesting that SPD requires an intact cellular system. Alternatively, one might argue that an intracellular component could block the inhibitory effect of SPD on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. We have investigated this possibility by incubating slices with tissue homogenates and SPD. Due to the polycationic nature of polyamine, negatively charged biomolecules present in the intracellular content could act as possible chelators of polyamines. Co-incubation of the SPD with slices plus homogenized hippocampal slices does not prevent the inhibitory effect of SPD on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in slices, showing that intracellular components do not block the inhibitory effect of SPD.

Since SPD positively modulates NMDA receptor conductance, we investigated whether the inhibitory effect of SPD on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity involved NMDA receptor-mediated mechanisms. MK-801, a non-competitive antagonist of the NMDA receptor, and arcaine, an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, prevented the inhibitory effect of SPD on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by SPD. This result suggests the involvement of NMDA receptor in this effect.

Previous studies have shown that NMDA decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats and mice cerebellum granule cells, and that this effect is attenuated by AP5 and MK-801, both antagonists of the NMDA receptor (Bulygina, Lyapina *et al.*, 2002; Boldyrev, Bulygina *et al.*, 2003; Boldyrev, Bulygina *et al.*, 2004). These data corroborate the results presented in this study, in which the NMDA receptor activation decreased Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. Curiously, a significant increase of free calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) coupled to a decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was found in synaptosomes from rat cerebral cortex and hippocampus after their exposure to glutamate (Tiurina, Sokolova *et al.*, 1998; Avrova, Shestak *et al.*, 1999). The presence of L-NAME in the incubation medium prevented the increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by glutamate and the inactivation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (Avrova, Shestak *et al.*, 1999). These studies suggest the involvement of NMDA receptors and nitric oxide synthase in glutamate-induced decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity.

It is known that NMDA receptor activation increases NO synthesis by increasing NOS activity (Sattler, Xiong *et al.*, 1999; Prast e Philippu, 2001). NO is a retrograde messenger which diffuses through the cellular membranes and most of NO-mediated physiological processes are thought to occur through the activation of

guanylate cyclase and PKG (East e Garthwaite, 1991). We found that L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, prevented the inhibitory effect of SPD on the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, indicating the involvement of NOS in this effect. These results are also in agreement with those studies that have shown that L-NAME prevents the decrease in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by arginine (Wyse, Bavaresco *et al.*, 2001; Delwing, Delwing *et al.*, 2008), and suggest that nitric oxide decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity.

Furthermore, we show that SPD increased levels of nitrate and nitrite (NO<sub>x</sub>) when incubated with slices of hippocampus. Co-incubation of SPD with MK-801 and arcaine showed that both prevent the increase of the content of NO<sub>x</sub> in slices. These results show that SPD increases the content of NO<sub>x</sub> and this effect occurs through the activation of NMDA receptor. In line with this view ODQ, a guanylate cyclase inhibitor, and KT5823, a PKG inhibitor, prevented the inhibitory effect provided by SPD, further supporting the role of cGMP/PKG pathway in the currently described decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity by SPD.

Fotis and colleagues (1999) have shown that PKG phosphorylates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, and by this means decreases activity in mammalian kidney cells and *Xenopus* oocytes. Although there is evidence that PKG directly phosphorylates the alpha subunit of the enzyme in oocytes, the target aminoacid residues are currently unknown. Moreover, it is not known whether brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is phosphorylated by PKG. Therefore, it is also possible that indirect mechanisms, unrelated to direct PKG-mediated phosphorylation of the pump modulated Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. In fact, there is evidence supporting that nNOS-derived NO activates extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Gallo e Iadecola, 2011). Since ERK pathway can modulate Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity depending on the tissue and animal used (Krasnikova, 1991; Al-Khalili, Kotova *et al.*, 2004; Zhong, Kotova *et al.*, 2004; Khundmiri, Ameen *et al.*, 2008), one might speculate its involvement in the currently reported effect of SPD. In addition, signaling pathway cGMP/PKG might activate protein phosphatase-1 which has been described to increase the activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in rat cerebellar slices, probably because sodium pump dephosphorylation accelerates enzyme catalytic cycle (Kawamoto, Munhoz *et al.*, 2008). Therefore, further studies are necessary to clarify this point.

While the exact mechanisms by which SPD decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity are not determined, the current study presents convincing evidence supporting a role

for NMDA receptor/NOS/cGMP/PKG pathway in this effect. The currently reported modulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity suggests this enzyme as a NMDA receptor target that may underlie some effects of glutamate. In this study (see Fig. 8), spermidine inhibits activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in slices of rat hippocampus via NMDA receptor and MK-801, arcaïne, L-NAME, ODQ and KT5823 prevents this effect, suggesting that NMDA receptor/NO/cGMP/PKG mechanisms are involved in the effect of SPD on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity.

#### Conflicts of Interest statement

There are no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.



## 5. References

- Akamatsu, N., K. Inenaga and H. Yamashita, 1993, Inhibitory effects of natriuretic peptides on vasopressin neurons mediated through cGMP and cGMP-dependent protein kinase in vitro, *J Neuroendocrinol* 5, 517.
- Al-Khalili, L., O. Kotova, H. Tsuchida, I. Ehren, E. Feraille, A. Krook and A.V. Chibalin, 2004, ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells, *J Biol Chem* 279, 25211.
- Anderson, D.J., J. Crossland and G.G. Shaw, 1975, The actions of spermidine and spermine on the central nervous system, *Neuropharmacology* 14, 571.
- Arancio, O., E.R. Kandel and R.D. Hawkins, 1995, Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons, *Nature* 376, 74.
- Avrova, N.F., K.I. Shestak, I.O. Zakharova, T.V. Sokolova and V.G. Leont'ev, 1999, The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions, *Neurochem Res* 24, 1101.
- Boldyrev, A., E. Bulygina, D. Carpenter and W. Schoner, 2003, Glutamate receptors communicate with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rat cerebellum granule cells: demonstration of differences in the action of several metabotropic and ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the sodium pump, *J Mol Neurosci* 21, 213.
- Boldyrev, A., E. Bulygina, O. Gerassimova, L. Lyapina and W. Schoner, 2004, Functional relationship between Na/K-ATPase and NMDA-receptors in rat cerebellum granule cells, *Biochemistry (Mosc)* 69, 429.
- 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.
- Branisteanu, D.D., L.M. Popescu, D.D. Branisteanu and I.D. Haulica, 1988, Cyclic GMP and protein kinase G inhibit the quantal transmitter release induced by protein kinase C, *Brain Res* 464, 263.

- Bulygina, E.R., L.Y. Lyapina and A.A. Boldyrev, 2002, Activation of glutamate receptors inhibits Na/K-ATPase of cerebellum granule cells, *Biochemistry (Mosc)* 67, 1001.
- Carter, C., 1994, *The Neuropharmacology of Polyamines*, American Press.
- Charlton, J.A. and P.H. Baylis, 1990, Stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by polyamines in the rat renal medullary cells of the thick ascending limb of Henle's loop, *J Endocrinol* 127, 377.
- Delwing, D., D. Delwing, C.S. Bavaresco and A.T. Wyse, 2008, Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration, *Brain Res* 1193, 120.
- dos Reis, E.A., L.S. de Oliveira, M.L. Lamers, C.A. Netto and A.T. Wyse, 2002, Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats, *Brain Res* 951, 151.
- East, S.J. and J. Garthwaite, 1991, NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway, *Neurosci Lett* 123, 17.
- Ellis, D.Z., J.A. Nathanson, J. Rabe and K.J. Sweadner, 2001, Carbachol and nitric oxide inhibition of Na,K-ATPase activity in bovine ciliary processes, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2625.
- Ellis, D.Z., J.A. Nathanson and K.J. Sweadner, 2000, Carbachol inhibits Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in choroid plexus via stimulation of the NO/cGMP pathway, *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1685.
- Fiske, C.H. and Y. Subbarow, 1925, The colorimetric determination of phosphorous., *Journal of Biological Chemistry* 66, 375.
- Fotis, H., L.V. Tatjanenko and L.A. Vasilets, 1999, Phosphorylation of the alpha-subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMP-dependent protein kinase results in stimulation of ATPase activity, *Eur J Biochem* 260, 904.
- Fujisawa, H., K. Kajikawa, Y. Ohi, Y. Hashimoto and H. Yoshida, 1965, Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine, *Jpn J Pharmacol* 15, 327.

- Gallo, E.F. and C. Iadecola, 2011, Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase, *J Neurosci* 31, 6947.
- Garthwaite, J. and R. Balazs, 1978, Supersensitivity to the cyclic GMP response to glutamate during cerebellar maturation, *Nature* 275, 328.
- Heinrich-Hirsch, B., J. Ahlers and H.W. Peter, 1977, Inhibition of Na,K-ATPase from chick brain by polyamines, *Enzyme* 22, 235.
- Janne, J., L. Alhonen, T.A. Keinanen, M. Pietila, A. Uimari, E. Pirinen, M.T. Hyvonen and A. Jarvinen, 2005, Animal disease models generated by genetic engineering of polyamine metabolism, *J Cell Mol Med* 9, 865.
- Johnson, C.L., T.A. Kuntzweiler, J.B. Lingrel, C.G. Johnson and E.T. Wallick, 1995, Glutamic acid 327 in the sheep alpha 1 isoform of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase is a pivotal residue for cation-induced conformational changes, *Biochem J* 309 ( Pt 1), 187.
- Johnson, T.D., 1996, Modulation of channel function by polyamines, *Trends Pharmacol Sci* 17, 22.
- Kawamoto, E.M., C.D. Munhoz, L.B. Lepsch, L. de Sa Lima, I. Glezer, R.P. Markus, C.L. de Silva, R. Camarini, T. Marcourakis and C. Scavone, 2008, Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity, *Neurobiol Aging* 29, 1712.
- Khundmiri, S.J., M. Ameen, N.A. Delamere and E.D. Lederer, 2008, PTH-mediated regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase requires Src kinase-dependent ERK phosphorylation, *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F426.
- Krasnikova, T.L., 1991, [The Na,K-ATPase pump and the lymphocyte adenylate cyclase system], *Tsitologiya* 33, 42.
- Kuntzweiler, T.A., E.T. Wallick, C.L. Johnson and J.B. Lingrel, 1995, Glutamic acid 327 in the sheep alpha 1 isoform of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase stabilizes a K<sup>(+)</sup>-induced conformational change, *J Biol Chem* 270, 2993.
- Lees, G.J., A. Lehmann, M. Sandberg and A. Hamberger, 1990, The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus, *Neurosci Lett* 120, 159.
- Li, S. and P.K. Stys, 2001, Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na<sup>(+)</sup>-dependent transport in spinal cord white matter, *Neuroscience* 107, 675.

- Liu, P., N. Gupta, Y. Jing and H. Zhang, 2008, Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats, *Neuroscience* 155, 789.
- Meriney, S.D., D.B. Gray and G.R. Pilar, 1994, Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> current modulated by cGMP-dependent protein kinase, *Nature* 369, 336.
- Miranda, K.M., M.G. Espey and D.A. Wink, 2001, A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide* 5, 62.
- Moseley, A.E., M.T. Williams, T.L. Schaefer, C.S. Bohanan, J.C. Neumann, M.M. Behbehani, C.V. Vorhees and J.B. Lingrel, 2007, Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice, *J Neurosci* 27, 616.
- Munhoz, C.D., I. Glezer, E.M. Kawamoto, A.P. Araujo, L.B. Lepscha, C.S. Planeta, R. DeLucia and C. Scavone, 2003, Changes in sodium, potassium-ATPase induced by repeated fencamfamine: the roles of cyclic AMP-dependent protein kinase and the nitric oxide-cyclic GMP pathway, *Neuropharmacology* 45, 1151.
- Munhoz, C.D., E.M. Kawamoto, L. de Sa Lima, L.B. Lepsch, I. Glezer, T. Marcourakis and C. Scavone, 2005, Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum, *Cell Biochem Funct* 23, 115.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., 2003, An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission, *Trends Neurosci* 26, 9.
- Pontiggia, L., K. Winterhalter and S.M. Gloor, 1998, Inhibition of Na,K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells, *FEBS Lett* 436, 466.
- Prast, H. and A. Philippu, 2001, Nitric oxide as modulator of neuronal function, *Prog Neurobiol* 64, 51.
- Quarfoth, G., K. Ahmed and D. Foster, 1978, Effects of polyamines on partial reactions of membrane (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase, *Biochim Biophys Acta* 526, 580.
- Ransom, R.W. and N.L. Stec, 1988, Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines, *J Neurochem* 51, 830.

- Reynolds, I.J. and K.D. Rothermund, 1995, Characterization of the effects of polyamines on the modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor by glycine, *Neuropharmacology* 34, 1147.
- Rock, D.M. and R.L. Macdonald, 1995, Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 463.
- Rubin, E.H. and J.A. Ferrendelli, 1977, Distribution and regulation of cyclic nucleotide levels in cerebellum, in vivo, *J Neurochem* 29, 43.
- Sacaan, A.I. and K.M. Johnson, 1990, Spermidine reverses arcaine's inhibition of N-methyl-D-aspartate-induced hippocampal [3H]norepinephrine release, *J Pharmacol Exp Ther* 255, 1060.
- Sattler, R., Z. Xiong, W.Y. Lu, M. Hafner, J.F. MacDonald and M. Tymianski, 1999, Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein, *Science* 284, 1845.
- Scavone, C., I. Glezer, C. Demarchi Munhoz, C. de Sena Bernardes and R. Pekelmann Markus, 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.
- Scavone, C., C.D. Munhoz, E.M. Kawamoto, I. Glezer, L. de Sa Lima, T. Marcourakis and R.P. Markus, 2005, Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na,K-ATPase activity, *Neurobiol Aging* 26, 907.
- Seiler, N. and T. Schmidt-Glenewinkel, 1975, Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system, *J Neurochem* 24, 791.
- Silva, E.C., D.C. Masui, R.P. Furriel, F.L. Mantelatto, J.C. McNamara, H. Barrabin, F.A. Leone, H.M. Scofano and C.F. Fontes, 2008, Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab *Callinectes danae* (Brachyura, Portunidae), *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149, 622.
- Skou, J.C. and M. Esmann, 1992, The Na,K-ATPase, *J Bioenerg Biomembr* 24, 249.
- Sprosen, T.S. and G.N. Woodruff, 1990, Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons, *Eur J Pharmacol* 179, 477.
- Tashima, Y. and M. Hasegawa, 1975, Specific inhibition of ouabain sensitive and K+-dependent p-nitrophenylphosphatase by polyamines, *Biochem Biophys Res Commun* 66, 1344.

- Tashima, Y., M. Hasegawa, L.K. Lane and A. Schwartz, 1981, Specific effects of spermine on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase, *J Biochem* 89, 249.
- Tashima, Y., M. Hasegawa, H. Mizunuma and Y. Sakagishi, 1977, Specific effects of spermine on ouabain-sensitive and potassium-dependent phosphatase activity of kidney plasma membranes. Specificity of the potassium sites, *Biochim Biophys Acta* 482, 1.
- Tiurina, I., T.V. Sokolova, V.S. Gonchar, V.V. Furaev, N.F. Avrova and V.A. Tiurin, 1998, [Inhibition of Na, K-adenosine triphosphatase by glutamate in cerebral cortex synaptosomes. Protective effect of alpha-tocopherol and superoxide dismutase], *Zh Evol Biokhim Fiziol* 34, 325.
- Williams, K., 1997a, Interactions of polyamines with ion channels, *Biochem J* 325 ( Pt 2), 289.
- Williams, K., 1997b, Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines, *Cell Signal* 9, 1.
- Williams, K., A.M. Zappia, D.B. Pritchett, Y.M. Shen and P.B. Molinoff, 1994, Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits, *Mol Pharmacol* 45, 803.
- Woody, C.D., T. Bartfai, E. Gruen and A.C. Nairn, 1986, Intracellular injection of cGMP-dependent protein kinase results in increased input resistance in neurons of the mammalian motor cortex, *Brain Res* 386, 379.
- Wyse, A.T., C.S. Bavaresco, C. Bandinelli, E.L. Streck, R. Franzon, C.S. Dutra-Filho and M. Wajner, 2001, Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration, *Neurochem Res* 26, 515.
- Wyse, A.T., E.L. Streck, S.V. Barros, A.M. Brusque, A.I. Zugno and M. Wajner, 2000, Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats, *Neuroreport* 11, 2331.
- Zhong, Z., O. Kotova, A. Davidescu, I. Ehren, K. Ekberg, H. Jornvall, J. Wahren and A.V. Chibalin, 2004, C-peptide stimulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinases in human renal tubular cells, *Cell Mol Life Sci* 61, 2782.
- Zhuo, M., Y. Hu, C. Schultz, E.R. Kandel and R.D. Hawkins, 1994, Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation, *Nature* 368, 635.

## Figure and legends

Figure 1

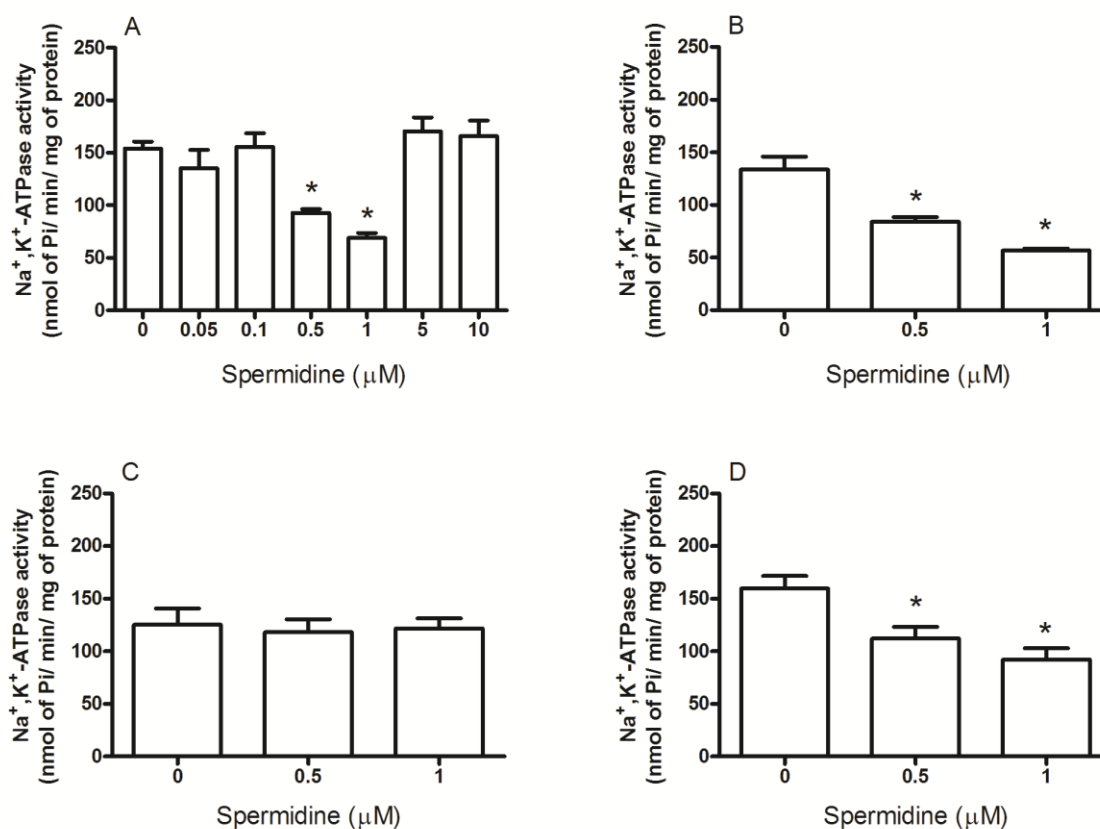


Fig. 1.

Effect of a 30 min (A) or a 60 min-incubation (B) with spermidine (0.05-10 μM) and (0.5-1 μM) respectively, on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of rat hippocampal slices. It is also shown the effect of a 30 min-incubation with spermidine (0.5 and 1 μM) on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of rat hippocampal homogenates (C) and rat hippocampal slices plus homogenates (D). Data are mean ± SEM for n = 7 (A), n = 5 (B), n = 5 (C) and n = 5 (D) in each group. \*Indicates a significant difference compared with control group.

Figure 2

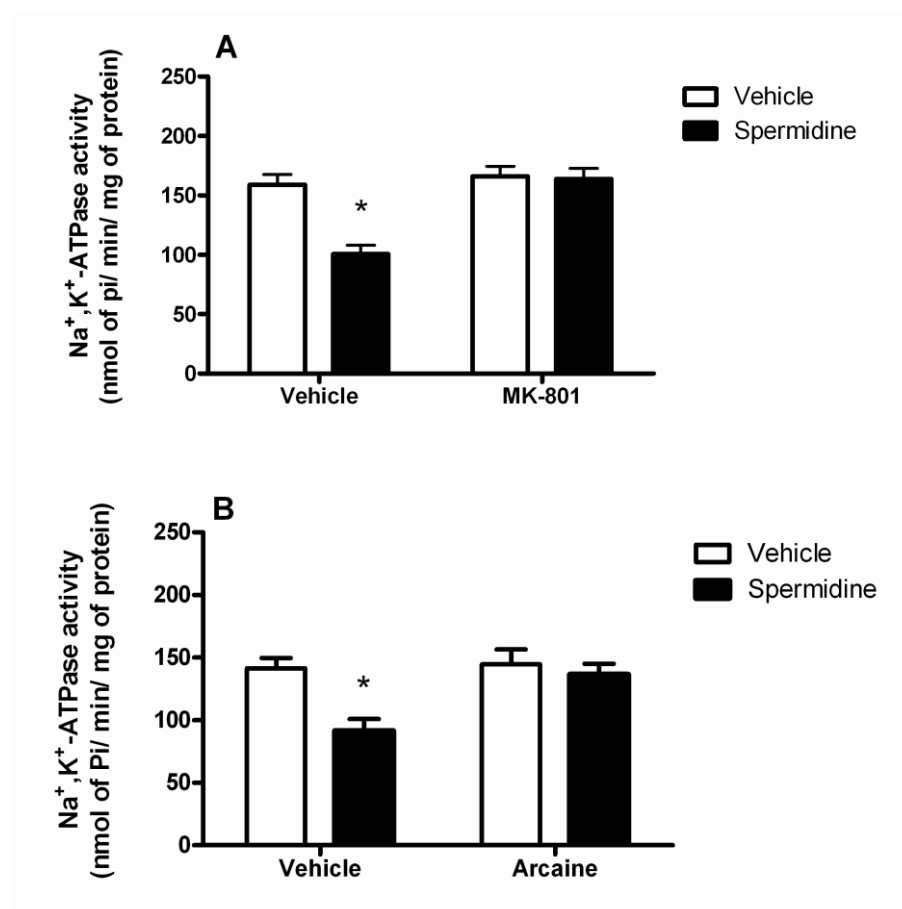


Fig. 2.

Effect of co-incubation of spermidine (0.5  $\mu$ M) and MK-801 (100  $\mu$ M) (A) or spermidine (0.5  $\mu$ M) and arcaine (0.5  $\mu$ M) (B) on Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean  $\pm$  SEM for n = 6 (A) and n = 7 (B) in each group.

\*Indicates a significant difference compared with control group.



Figure 3

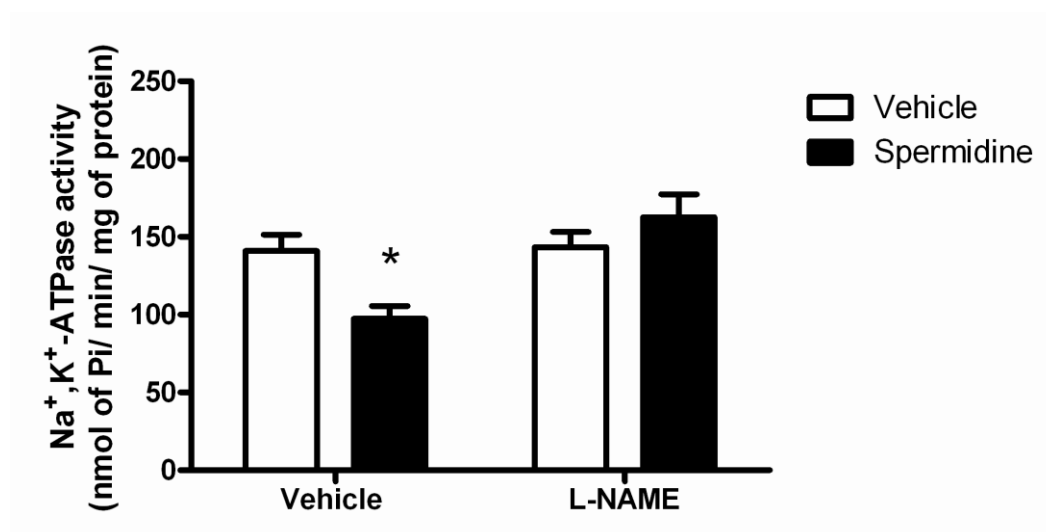


Fig. 3.

Effect of co-incubation of spermidine (0.5  $\mu$ M) and L-NAME (100  $\mu$ M) on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean  $\pm$  SEM for n = 6 in each group. \*Indicates a significant difference compared with control group.

Figure 4

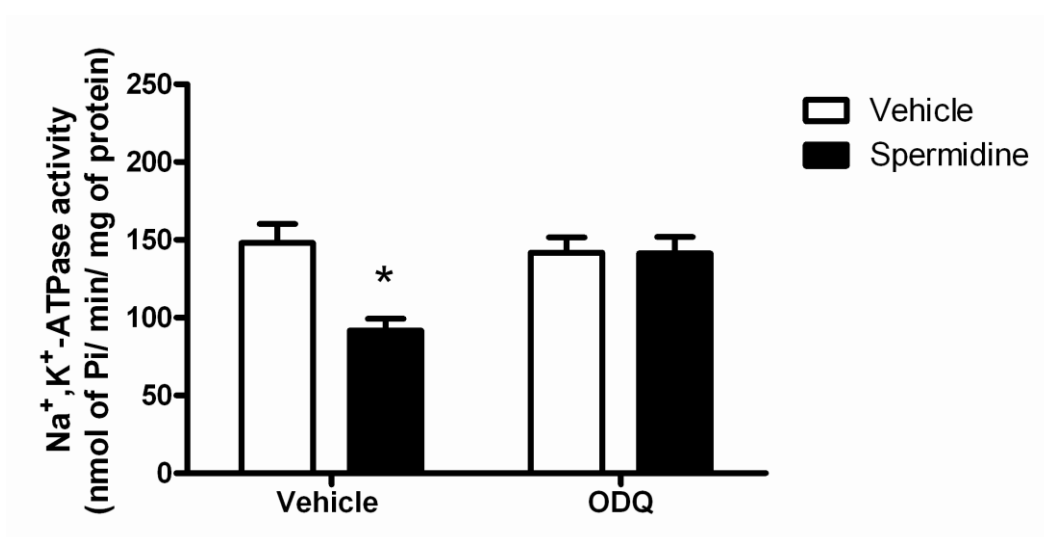


Fig. 4.

Effect of co-incubation of spermidine (0.5  $\mu$ M) and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (ODQ, 10  $\mu$ M) on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean  $\pm$  SEM for n = 8 in each group. \*Indicates a significant difference compared with control group.

Figure 5

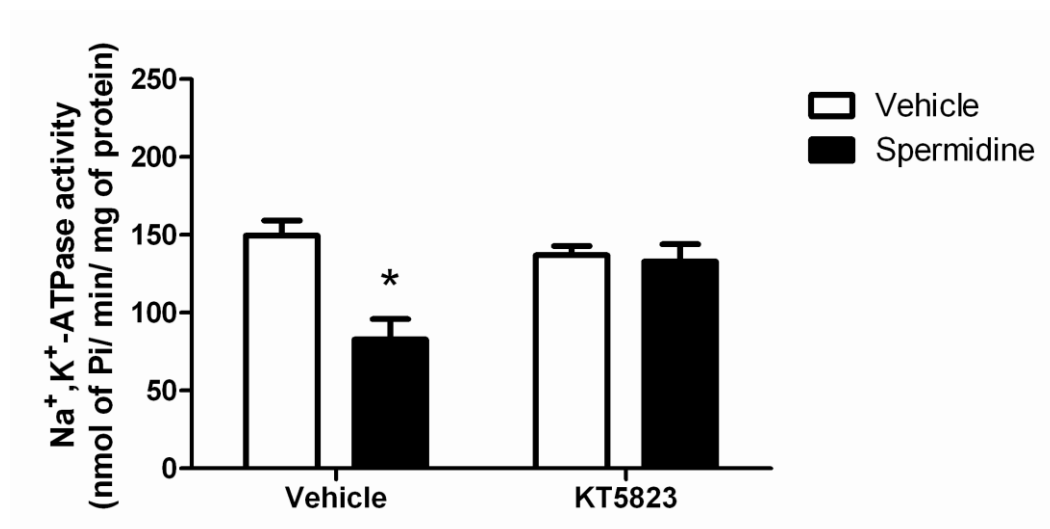


Fig. 5.

Effect of co-incubation of spermidine (0.5  $\mu$ M) and KT-5823 (2  $\mu$ M) on Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity of rat hippocampal slices. Data are mean  $\pm$  SEM for n = 7 in each group.

\*Indicates a significant difference compared with control group.

Figure 6

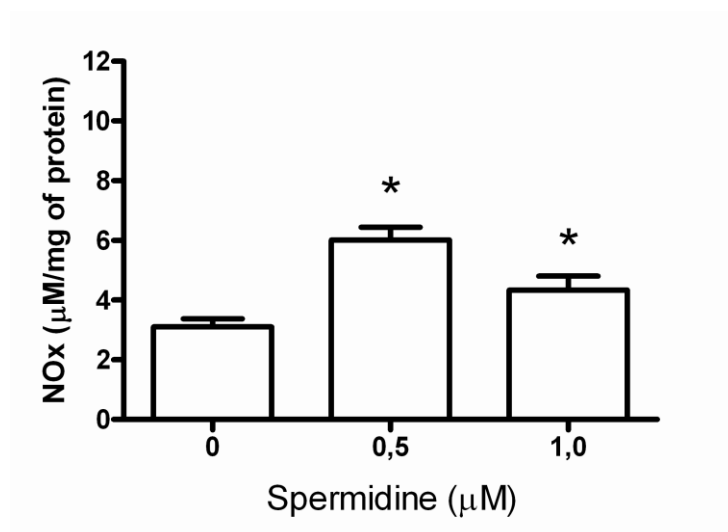


Fig. 6.

Effect of a 30 min incubation with spermidine (0.5 -1 µM) on NOx content of rat hippocampal slices. Data are mean  $\pm$  SEM for n = 10 in each group. \*Indicates a significant difference compared with control group.

Figure 7

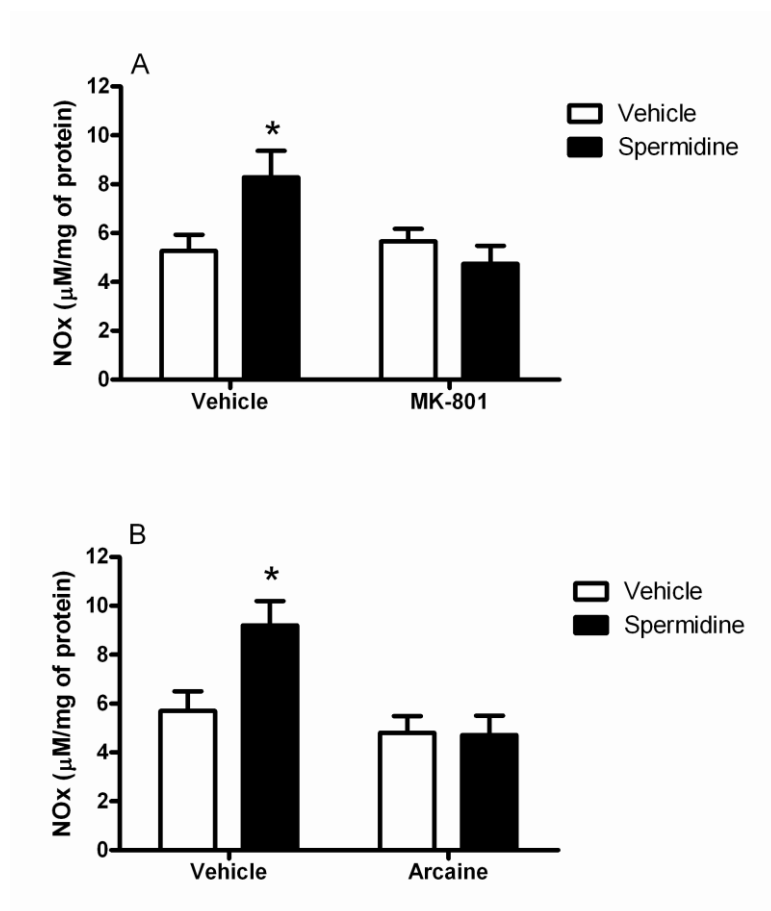


Fig. 7.

Effect of co-incubation of spermidine ( $0.5 \mu\text{M}$ ) and MK-801 ( $100 \mu\text{M}$ ) (A) or spermidine ( $0.5 \mu\text{M}$ ) and arcaine ( $0.5 \mu\text{M}$ ) (B) on NOx content of rat hippocampal slices. Data are mean  $\pm$  SEM for  $n = 7$  in each group. \*Indicates a significant difference compared with control group.

Figure 8

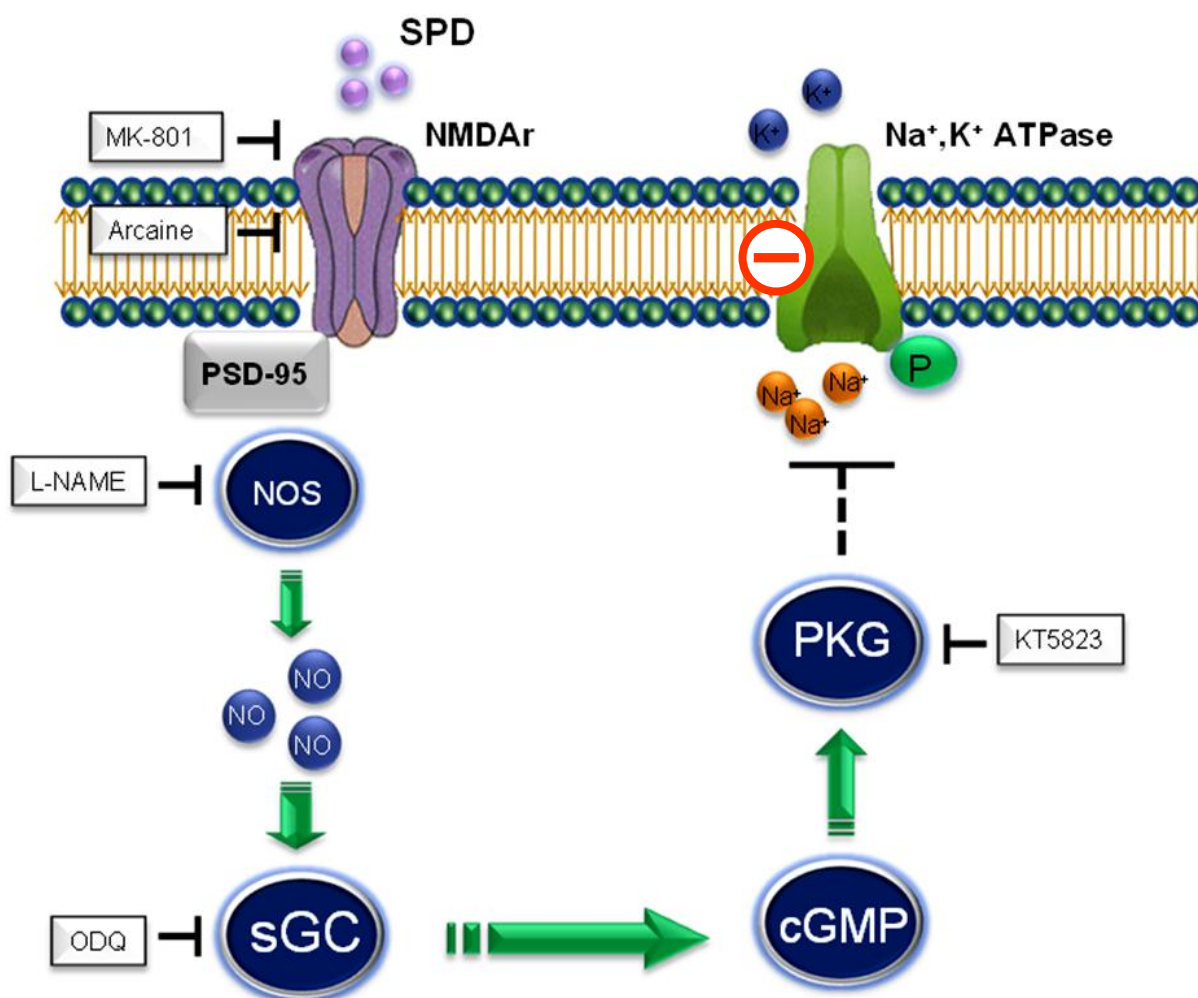


Fig. 8.

NMDA receptor/NOS/cGMP/PKG pathway decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. Spermidine, by activating NMDA receptor increases NOS activity and NO synthesis. MK-801 (100  $\mu\text{M}$ ), arcaine (0.5  $\mu\text{M}$ ), L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), KT5823 (2  $\mu\text{M}$ ) prevented the inhibitory effect of SPD on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity. The exact mechanisms by which PKG decreases  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity are not determined.

## **5. CONCLUSÕES**

---

## 5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1) A SPD diminuiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase somente em fatias de hipocampo, evidenciando a necessidade de um sistema celular intacto para seu efeito.
- 2) O receptor NMDA está envolvido na inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzida por SPD uma vez que MK-801 e arcaína previniram este efeito.
- 3) A síntese de NO e a NOS estão envolvidas no efeito inibitório da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzida pela SPD uma vez que SPD aumentou o NOx nas fatias de hipocampo e MK801 e arcaína previniram este efeito. Além disso, L-NAME previniu o efeito inibitório induzido pela SPD sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.
- 4) A via de sinalização GMPc/PKG está envolvida na inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase induzida por SPD uma vez que ODQ e KT5823 previniram a diminuição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.
- 5) A espermidina, através do receptor NMDA e da via de sinalização NOS/GMPc/PKG, possui um papel modulatório sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo de ratos.



## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- Akamatsu, N., K. Inenaga, *et al.* Inhibitory effects of natriuretic peptides on vasopressin neurons mediated through cGMP and cGMP-dependent protein kinase in vitro. J Neuroendocrinol, v.5, n.5, Oct, p.517-22. 1993.
- Al-Khalili, L., O. Kotova, *et al.* ERK1/2 mediates insulin stimulation of Na(+),K(+)-ATPase by phosphorylation of the alpha-subunit in human skeletal muscle cells. J Biol Chem, v.279, n.24, Jun 11, p.25211-8. 2004.
- Aliev, G., H. H. Palacios, *et al.* Nitric oxide as an initiator of brain lesions during the development of Alzheimer disease. Neurotox Res, v.16, n.3, Oct, p.293-305. 2009.
- Anderson, D. J., J. Crossland, *et al.* The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. Neuropharmacology, v.14, n.8, Aug, p.571-7. 1975.
- Arancio, O., E. R. Kandel, *et al.* Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. Nature, v.376, n.6535, Jul 6, p.74-80. 1995.
- Arystarkhova, E., R. K. Wetzel, *et al.* The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. J Biol Chem, v.274, n.47, Nov 19, p.33183-5. 1999.
- Assreuy, J., F. Q. Cunha, *et al.* Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. Br J Pharmacol, v.108, n.3, Mar, p.833-7. 1993.
- Avrova, N. F., K. I. Shestak, *et al.* The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. Neurochem Res, v.24, n.9, Sep, p.1101-6. 1999.
- Beggah, A. T., P. Beguin, *et al.* beta-subunit assembly is essential for the correct packing and the stable membrane insertion of the H,K-ATPase alpha-subunit. J Biol Chem, v.274, n.12, Mar 19, p.8217-23. 1999.
- Beguin, P., A. Beggah, *et al.* Adrenergic, dopaminergic, and muscarinic receptor stimulation leads to PKA phosphorylation of Na-K-ATPase. Am J Physiol, v.270, n.1 Pt 1, Jan, p.C131-7. 1996.
- Beguin, P., A. T. Beggah, *et al.* Phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. J Biol Chem, v.269, n.39, Sep 30, p.24437-45. 1994.
- Beguin, P., X. Wang, *et al.* The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. Embo J, v.16, n.14, Jul 16, p.4250-60. 1997.
- Bellamy, T. C. e J. Garthwaite. Pharmacology of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in cerebellar cells. Br J Pharmacol, v.136, n.1, May, p.95-103. 2002.

- Bellamy, T. C., J. Wood, *et al.* Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.6, Mar 14, p.2928-33. 2000.
- Berlese, D. B., P. D. Sauzem, *et al.* Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. Neurobiol Learn Mem, v.83, n.1, Jan, p.48-53. 2005.
- Bernabeu, R., P. Schmitz, *et al.* Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. Neuroreport, v.7, n.2, Jan 31, p.585-8. 1996.
- Bersier, M. G., C. Pena, *et al.* The expression of NMDA receptor subunits in cerebral cortex and hippocampus is differentially increased by administration of endobain E, a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor. Neurochem Res, v.33, n.1, Jan, p.66-72. 2008.
- Bersier, M. G. e G. Rodriguez De Lores Arnaiz. Intracerebroventricular administration of ouabain to rats changes the expression of NMDA receptor subunits in cerebral cortex and hippocampus. Neurochem Res, v.34, n.9, Sep, p.1650-7. 2009.
- Blanco, G., G. Sanchez, *et al.* Differential regulation of Na,K-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. Arch Biochem Biophys, v.359, n.2, Nov 15, p.139-50. 1998.
- Boldyrev, A., E. Bulygina, *et al.* Glutamate receptors communicate with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rat cerebellum granule cells: demonstration of differences in the action of several metabotropic and ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the sodium pump. J Mol Neurosci, v.21, n.3, p.213-22. 2003.
- Boldyrev, A., E. Bulygina, *et al.* Functional relationship between Na/K-ATPase and NMDA-receptors in rat cerebellum granule cells. Biochemistry (Mosc), v.69, n.4, Apr, p.429-34. 2004.
- 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, May 7, p.248-54. 1976.
- Branisteanu, D. D., L. M. Popescu, *et al.* Cyclic GMP and protein kinase G inhibit the quantal transmitter release induced by protein kinase C. Brain Res, v.464, n.3, Nov, p.263-6. 1988.
- Bulygina, E. R., L. Y. Lyapina, *et al.* Activation of glutamate receptors inhibits Na/K-ATPase of cerebellum granule cells. Biochemistry (Mosc), v.67, n.9, Sep, p.1001-5. 2002.
- Burnay, M., G. Crambert, *et al.* Electrogenicity of Na,K- and H,K-ATPase activity and presence of a positively charged amino acid in the fifth transmembrane segment. J Biol Chem, v.278, n.21, May 23, p.19237-44. 2003.
- Carter, C. The Neuropharmacology of Polyamines. American Press. 1994.
- Celano, P., S. B. Baylin, *et al.* Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. J Biol Chem, v.264, n.15, May 25, p.8922-7. 1989.

- Charlton, J. A. e P. H. Baylis. Stimulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity by polyamines in the rat renal medullary cells of the thick ascending limb of Henle's loop. J Endocrinol, v.127, n.3, Dec, p.377-82. 1990.
- Cheng, X. J., G. Fisone, *et al.* PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. Am J Physiol, v.273, n.3 Pt 1, Sep, p.C893-901. 1997.
- Cheng, X. J., J. O. Hoog, *et al.* Regulation of rat Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. Am J Physiol, v.273, n.6 Pt 1, Dec, p.C1981-6. 1997.
- Chevaleyre, V. e S. A. Siegelbaum. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. Neuron, v.66, n.4, May 27, p.560-72. 2010.
- Coffino, P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. Nat Rev Mol Cell Biol, v.2, n.3, Mar, p.188-94. 2001.
- Cotman, C. W., D. T. Monaghan, *et al.* Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. Annu Rev Neurosci, v.11, p.61-80. 1988.
- Crambert, G., D. Schaer, *et al.* New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase alpha isoforms. Mol Pharmacol, v.65, n.2, Feb, p.335-41. 2004.
- Delwing, D., D. Delwing, *et al.* Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration. Brain Res, v.1193, Feb 8, p.120-7. 2008.
- Dos Reis, E. A., L. S. De Oliveira, *et al.* Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. Brain Res, v.951, n.2, Oct 4, p.151-7. 2002.
- Doyle, C. A. e P. Slater. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. Neuroscience, v.76, n.2, Jan, p.387-95. 1997.
- East, S. J. e J. Garthwaite. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. Neurosci Lett, v.123, n.1, Feb 11, p.17-9. 1991.
- Ellis, D. Z., J. A. Nathanson, *et al.* Carbachol and nitric oxide inhibition of Na,K-ATPase activity in bovine ciliary processes. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.42, n.11, Oct, p.2625-31. 2001.
- Ellis, D. Z., J. A. Nathanson, *et al.* Carbachol inhibits Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in choroid plexus via stimulation of the NO/cGMP pathway. Am J Physiol Cell Physiol, v.279, n.6, Dec, p.C1685-93. 2000.

- Feraille, E., P. Beguin, *et al.* Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C? Mol Biol Cell, v.11, n.1, Jan, p.39-50. 2000.
- Fernandez-Vizarra, P., A. P. Fernandez, *et al.* Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis, v.15, n.2, Mar, p.287-305. 2004.
- Fiske, C. H. e Y. Subbarow. The colorimetric determination of phosphorous. Journal of Biological Chemistry, v.66, p.375-400. 1925.
- Fisone, G., S. X. Cheng, *et al.* Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. J Biol Chem, v.269, n.12, Mar 25, p.9368-73. 1994.
- Forstermann, U. e W. C. Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J, Sep 1. 2011.
- Fotis, H., L. V. Tatjanenko, *et al.* Phosphorylation of the alpha-subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMP-dependent protein kinase results in stimulation of ATPase activity. Eur J Biochem, v.260, n.3, Mar, p.904-10. 1999.
- Fujisawa, H., K. Kajikawa, *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, Dec, p.327-34. 1965.
- Furukawa, K., S. W. Barger, *et al.* Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. Nature, v.379, n.6560, Jan 4, p.74-8. 1996.
- Gallo, E. F. e C. Iadecola. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. J Neurosci, v.31, n.19, May 11, p.6947-55. 2011.
- Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. Trends Neurosci, v.14, n.2, Feb, p.60-7. 1991.
- \_\_\_\_\_. Neural nitric oxide signalling. Trends Neurosci, v.18, n.2, Feb, p.51-2. 1995.
- Garthwaite, J. e R. Balazs. Supersensitivity to the cyclic GMP response to glutamate during cerebellar maturation. Nature, v.275, n.5678, Sep 28, p.328-9. 1978.
- Garthwaite, J., S. L. Charles, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature, v.336, n.6197, Nov 24, p.385-8. 1988.
- Girouard, H., G. Wang, *et al.* NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. J Neurosci, v.29, n.8, Feb 25, p.2545-52. 2009.

- Guerra, G. P., C. F. Mello, *et al.* Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. Neurobiol Learn Mem, v.96, n.2, Sep, p.324-32. 2011.
- Guerra, G. P., C. F. Mello, *et al.* Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. Psychopharmacology (Berl), v.186, n.2, Jun, p.150-8. 2006.
- Haley, J. E., G. L. Wilcox, *et al.* The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. Neuron, v.8, n.2, Feb, p.211-6. 1992.
- Han, F., J. Bossuyt, *et al.* Role of phospholemman phosphorylation sites in mediating kinase-dependent regulation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Am J Physiol Cell Physiol, v.299, n.6, Dec, p.C1363-9. 2010.
- Heinrich-Hirsch, B., J. Ahlers, *et al.* Inhibition of Na,K-ATPase from chick brain by polyamines. Enzyme, v.22, n.4, p.235-41. 1977.
- Horisberger, J. D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. Physiology (Bethesda), v.19, Dec, p.377-87. 2004.
- Igarashi, K. e K. Kashiwagi. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem Biophys Res Commun, v.271, n.3, May 19, p.559-64. 2000.
- Igarashi, K., T. Saisho, *et al.* Molecular mechanism of polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein. J Biol Chem, v.272, n.7, Feb 14, p.4058-64. 1997.
- Izquierdo, I., C. Fin, *et al.* Memory enhancement by intrahippocampal, intraamygdala, or intraentorhinal infusion of platelet-activating factor measured in an inhibitory avoidance task. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.11, May 23, p.5047-51. 1995.
- Janne, J., L. Alhonen, *et al.* Animal disease models generated by genetic engineering of polyamine metabolism. J Cell Mol Med, v.9, n.4, Oct-Dec, p.865-82. 2005.
- Johnson, C. L., T. A. Kuntzweiler, *et al.* Glutamic acid 327 in the sheep alpha 1 isoform of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase is a pivotal residue for cation-induced conformational changes. Biochem J, v.309 ( Pt 1), Jul 1, p.187-94. 1995.
- Johnson, T. D. Modulation of channel function by polyamines. Trends Pharmacol Sci, v.17, n.1, Jan, p.22-7. 1996.
- Jorgensen, P. L. Transmission of E1-E2 structural changes in response to Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> binding in Na,K-ATPase. Ann N Y Acad Sci, v.986, Apr, p.22-30. 2003.
- Jorgensen, P. L., K. O. Hakansson, *et al.* Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. Annu Rev Physiol, v.65, p.817-49. 2003.
- Kaplan, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. Annu Rev Biochem, v.71, p.511-35. 2002.
- Kashiwagi, K., Y. Yamaguchi, *et al.* Identification of the polyamine-induced protein as a periplasmic oligopeptide binding protein. J Biol Chem, v.265, n.15, May 25, p.8387-91. 1990.

- Kawamoto, E. M., C. D. Munhoz, *et al.* Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity. Neurobiol Aging, v.29, n.11, Nov, p.1712-20. 2008.
- Khundmiri, S. J., M. Ameen, *et al.* PTH-mediated regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase requires Src kinase-dependent ERK phosphorylation. Am J Physiol Renal Physiol, v.295, n.2, Aug, p.F426-37. 2008.
- Kimura, K. A., J. N. Reynolds, *et al.* Ethanol neurobehavioral teratogenesis and the role of the hippocampal glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor-nitric oxide synthase system. Neurotoxicol Teratol, v.22, n.5, Sep-Oct, p.607-16. 2000.
- Kopff, A. e E. Kowalczyk. [Nitric oxide synthase and its isoforms]. Pol Arch Med Wewn, v.108, n.5, Nov, p.1097-101. 2002.
- Krasnikova, T. L. [The Na,K-ATPase pump and the lymphocyte adenylate cyclase system]. Tsitologija, v.33, n.11, p.42-8. 1991.
- Kuntzweiler, T. A., E. T. Wallick, *et al.* Glutamic acid 327 in the sheep alpha 1 isoform of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase stabilizes a K<sup>(+)</sup>-induced conformational change. J Biol Chem, v.270, n.7, Feb 17, p.2993-3000. 1995.
- Lau, C. G. e R. S. Zukin. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. Nat Rev Neurosci, v.8, n.6, Jun, p.413-26. 2007.
- Ledo, A., R. M. Barbosa, *et al.* Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.48, Nov 29, p.17483-8. 2005.
- Lees, G. J., A. Lehmann, *et al.* The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. Neurosci Lett, v.120, n.2, Dec 11, p.159-62. 1990.
- Lenzen, S., R. Hickehler, *et al.* Interactions between spermine and Mg<sup>2+</sup> on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. J Biol Chem, v.261, n.35, Dec 15, p.16478-83. 1986.
- Lenzen, S., W. Munster, *et al.* Dual effect of spermine on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. Biochem J, v.286 ( Pt 2), Sep 1, p.597-602. 1992.
- Li, C., G. Crambert, *et al.* Na,K-ATPase alpha-beta subunit interactions in the transmembrane domain. Ann N Y Acad Sci, v.986, Apr, p.226-8. 2003.
- Li, S. e P. K. Stys. Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na<sup>(+)</sup>-dependent transport in spinal cord white matter. Neuroscience, v.107, n.4, p.675-83. 2001.
- Lingrel, J. B. e T. Kuntzweiler. Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase. J Biol Chem, v.269, n.31, Aug 5, p.19659-62. 1994.
- Lingrel, J. B., J. Van Huysse, *et al.* Structure-function studies of the Na,K-ATPase. Kidney Int Suppl, v.44, Jan, p.S32-9. 1994.

- Liu, P., N. Gupta, *et al.* Age-related changes in polyamines in memory-associated brain structures in rats. Neuroscience, v.155, n.3, Aug 26, p.789-96. 2008.
- Meriney, S. D., D. B. Gray, *et al.* Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> current modulated by cGMP-dependent protein kinase. Nature, v.369, n.6478, May 26, p.336-9. 1994.
- Miranda, K. M., M. G. Espey, *et al.* A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide, v.5, n.1, Feb, p.62-71. 2001.
- Moncada, S. e J. P. Bolanos. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem, v.97, n.6, Jun, p.1676-89. 2006.
- Moseley, A. E., M. T. Williams, *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, Jan 17, p.616-26. 2007.
- Munhoz, C. D., I. Glezer, *et al.* Changes in sodium, potassium-ATPase induced by repeated fencamfamine: the roles of cyclic AMP-dependent protein kinase and the nitric oxide-cyclic GMP pathway. Neuropharmacology, v.45, n.8, Dec, p.1151-9. 2003.
- Munhoz, C. D., E. M. Kawamoto, *et al.* Glutamate modulates sodium-potassium-ATPase through cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in rat striatum. Cell Biochem Funct, v.23, n.2, Mar-Apr, p.115-23. 2005.
- Nathanson, J. A., C. Scavone, *et al.* The cellular Na<sup>+</sup> pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. Neuron, v.14, n.4, Apr, p.781-94. 1995.
- Nelson, D. L. e M. M. Cox. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Artmed, v.5 ed, p.445-446. 2011.
- Nishi, A., G. Fisone, *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, Oct, p.1492-501. 1999.
- Nishi, A., G. L. Snyder, *et al.* Requirement for DARPP-32 in mediating effect of dopamine D2 receptor activation. Eur J Neurosci, v.11, n.7, Jul, p.2589-92. 1999.
- Oliveira, M. S., A. F. Furian, *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, Apr, p.416-26. 2009.
- Paoletti, P. e J. Neyton. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr Opin Pharmacol, v.7, n.1, Feb, p.39-47. 2007.
- Pedemonte, C. H., T. A. Pressley, *et al.* Regulation of Na,K-ATPase transport activity by protein kinase C. J Membr Biol, v.155, n.3, Feb 1, p.219-27. 1997.



- Pellegrini-Giampietro, D. E. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. Trends Neurosci, v.26, n.1, Jan, p.9-11. 2003.
- Pineda, J., J. H. Kogan, *et al.* Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. J Neurosci, v.16, n.4, Feb 15, p.1389-99. 1996.
- Pontiggia, L., K. Winterhalter, *et al.* Inhibition of Na,K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells. FEBS Lett, v.436, n.3, Oct 9, p.466-70. 1998.
- Poulsen, H., P. Morth, *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, Jun 18, p.2589-95. 2010.
- Prast, H. e A. Philippu. Nitric oxide as modulator of neuronal function. Prog Neurobiol, v.64, n.1, May, p.51-68. 2001.
- Quarfoth, G., K. Ahmed, *et al.* Effects of polyamines on partial reactions of membrane (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. Biochim Biophys Acta, v.526, n.2, Oct 12, p.580-90. 1978.
- Rangel, L. B., A. T. Malaquias, *et al.* Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na<sup>(+)</sup>-ATPase activity from proximal tubules. Biochim Biophys Acta, v.1512, n.1, May 2, p.90-7. 2001.
- Ransom, R. W. e N. L. Stec. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. J Neurochem, v.51, n.3, Sep, p.830-6. 1988.
- Reynolds, I. J. e K. D. Rothermund. Characterization of the effects of polyamines on the modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor by glycine. Neuropharmacology, v.34, n.9, Sep, p.1147-57. 1995.
- Rock, D. M. e R. L. Macdonald. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.35, p.463-82. 1995.
- Rubin, E. H. e J. A. Ferrendelli. Distribution and regulation of cyclic nucleotide levels in cerebellum, in vivo. J Neurochem, v.29, n.1, Jul, p.43-51. 1977.
- Rubin, M. A., R. L. Boemo, *et al.* Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. Behav Pharmacol, v.11, n.1, Feb, p.57-61. 2000.
- Sacaan, A. I. e K. M. Johnson. Spermidine reverses arcaine's inhibition of N-methyl-D-aspartate-induced hippocampal [3H]norepinephrine release. J Pharmacol Exp Ther, v.255, n.3, Dec, p.1060-3. 1990.
- Sattler, R., Z. Xiong, *et al.* Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. Science, v.284, n.5421, Jun 11, p.1845-8. 1999.
- Scatton, B. The NMDA receptor complex. Fundam Clin Pharmacol, v.7, n.8, p.389-400. 1993.

- Scavone, C., I. Glezer, *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, Jan 24, p.1-7. 2000.
- Scavone, C., C. D. Munhoz, *et al.* Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na,K-ATPase activity. Neurobiol Aging, v.26, n.6, Jun, p.907-16. 2005.
- Scavone, C., C. Scanlon, *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, Mar, p.1036-43. 1995.
- Schroter, A., S. A. Andrabi, *et al.* Nitric oxide applications prior and simultaneous to potentially excitotoxic NMDA-evoked calcium transients: cell death or survival. Brain Res, v.1060, n.1-2, Oct 26, p.1-15. 2005.
- Scott, G. S., S. R. Bowman, *et al.* Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. Biochem Pharmacol, v.73, n.2, Jan 15, p.228-36. 2007.
- Scuri, R., P. Lombardo, *et al.* Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech. Eur J Neurosci, v.25, n.1, Jan, p.159-67. 2007.
- Seiler, N. Catabolism of polyamines. Amino Acids, v.26, n.3, Jun, p.217-33. 2004.
- Seiler, N. e T. Schmidt-Glenewinkel. Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. J Neurochem, v.24, n.4, Apr, p.791-5. 1975.
- Silva, E. C., D. C. Masui, *et al.* Regulation by the exogenous polyamine spermidine of Na,K-ATPase activity from the gills of the euryhaline swimming crab *Callinectes danae* (Brachyura, Portunidae). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.149, n.4, Apr, p.622-9. 2008.
- Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta, v.23, n.2, Feb, p.394-401. 1957.
- Skou, J. C. e M. Esmann. The Na,K-ATPase. J Bioenerg Biomembr, v.24, n.3, Jun, p.249-61. 1992.
- Sprosen, T. S. e G. N. Woodruff. Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. Eur J Pharmacol, v.179, n.3, Apr 25, p.477-8. 1990.
- Sweadner, K. J. e M. S. Feschenko. Predicted location and limited accessibility of protein kinase A phosphorylation site on Na-K-ATPase. Am J Physiol Cell Physiol, v.280, n.4, Apr, p.C1017-26. 2001.
- Tabor, C. W. e H. Tabor. Polyamines. Annu Rev Biochem, v.53, p.749-90. 1984.
- Tabor, H., S. M. Rosenthal, *et al.* The biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine and methionine. J Biol Chem, v.233, n.4, Oct, p.907-14. 1958.

- Tashima, Y. e M. Hasegawa. Specific inhibition of ouabain sensitive and K<sup>+</sup>-dependent p-nitrophenylphosphatase by polyamines. Biochem Biophys Res Commun, v.66, n.4, Oct 27, p.1344-8. 1975.
- Tashima, Y., M. Hasegawa, *et al.* Specific effects of spermine on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase. J Biochem, v.89, n.1, Jan, p.249-55. 1981.
- Tashima, Y., M. Hasegawa, *et al.* Specific effects of spermine on ouabain-sensitive and potassium-dependent phosphatase activity of kidney plasma membranes. Specificity of the potassium sites. Biochim Biophys Acta, v.482, n.1, May 12, p.1-10. 1977.
- Tashima, Y. H., M. Lane, L.K.Schwartz, Arnold. Specific Effects of Spermine On Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase. J. Biochem., v.89, 1981, p.249-255. 1981.
- Teti, D., M. Visalli, *et al.* Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.781, n.1-2, Dec 5, p.107-49. 2002.
- Teyler, T. J. e P. Discenna. The hippocampal memory indexing theory. Behav Neurosci, v.100, n.2, Apr, p.147-54. 1986.
- Therien, A. G. e R. Blostein. Mechanisms of sodium pump regulation. Am J Physiol Cell Physiol, v.279, n.3, Sep, p.C541-66. 2000.
- Therien, A. G., S. J. Karlish, *et al.* Expression and functional role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase in mammalian cells. J Biol Chem, v.274, n.18, Apr 30, p.12252-6. 1999.
- Thomas, T. e T. J. Thomas. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. Cell Mol Life Sci, v.58, n.2, Feb, p.244-58. 2001.
- Tiurina, I., T. V. Sokolova, *et al.* [Inhibition of Na, K-adenosine triphosphatase by glutamate in cerebral cortex synaptosomes. Protective effect of alpha-tocopherol and superoxide dismutase]. Zh Evol Biokhim Fiziol, v.34, n.3, May-Jun, p.325-32. 1998.
- Urdiales, J. L., M. A. Medina, *et al.* Polyamine metabolism revisited. Eur J Gastroenterol Hepatol, v.13, n.9, Sep, p.1015-9. 2001.
- Usherwood, P. N. Natural and synthetic polyamines: modulators of signalling proteins. Farmacol, v.55, n.3, Mar, p.202-5. 2000.
- Vincent, S. R. Nitric oxide neurons and neurotransmission. Prog Neurobiol, v.90, n.2, Feb 9, p.246-55. 2010.
- Wang, X. e P. J. Robinson. Cyclic GMP-dependent protein kinase substrates in rat brain. J Neurochem, v.65, n.2, Aug, p.595-604. 1995.
- \_\_\_\_\_. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. J Neurochem, v.68, n.2, Feb, p.443-56. 1997.

Watts, J. e A. M. Thomson. Excitatory and inhibitory connections show selectivity in the neocortex. J Physiol, v.562, n.Pt 1, Jan 1, p.89-97. 2005.

Williams, K. Interactions of polyamines with ion channels. Biochem J, v.325 ( Pt 2), Jul 15, p.289-97. 1997a.

\_\_\_\_\_. Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. Cell Signal, v.9, n.1, Jan, p.1-13. 1997b.

\_\_\_\_\_. Extracellular Modulation of NMDA Receptors. Frontiers in Neuroscience, v.11. 2009a.

\_\_\_\_\_. Extracellular Modulation of NMDA Receptors. 2009b.

Williams, K., C. Romano, *et al.* Modulation of the NMDA receptor by polyamines. Life Sci, v.48, n.6, p.469-98. 1991.

Williams, K., C. Romano, *et al.* Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. Mol Pharmacol, v.36, n.4, Oct, p.575-81. 1989.

Williams, K., A. M. Zappia, *et al.* Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. Mol Pharmacol, v.45, n.5, May, p.803-9. 1994.

Woody, C. D., T. Bartfai, *et al.* Intracellular injection of cGMP-dependent protein kinase results in increased input resistance in neurons of the mammalian motor cortex. Brain Res, v.386, n.1-2, Oct 29, p.379-85. 1986.

Wyse, A. T., C. S. Bavaresco, *et al.* Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. Neurochem Res, v.26, n.5, May, p.515-20. 2001.

Wyse, A. T., E. L. Streck, *et al.* Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. Neuroreport, v.11, n.10, Jul 14, p.2331-4. 2000.

Yingst, D. R. Modulation of the Na,K-ATPase by Ca and intracellular proteins. Annu Rev Physiol, v.50, p.291-303. 1988.

Yoshida, M., D. Meksuriyen, *et al.* Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon aug in oppa mRNA. J Biol Chem, v.274, n.32, Aug 6, p.22723-8. 1999.

Yun, H. Y., V. L. Dawson, *et al.* Neurobiology of nitric oxide. Crit Rev Neurobiol, v.10, n.3-4, p.291-316. 1996.

Zhang, L., F. Guo, *et al.* Na<sup>(+)</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibition upregulates NMDA-evoked currents in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. Fundam Clin Pharmacol, Apr 26. 2011.

Zhong, Z., O. Kotova, *et al.* C-peptide stimulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase via activation of ERK1/2 MAP kinases in human renal tubular cells. Cell Mol Life Sci, v.61, n.21, Nov, p.2782-90. 2004.

Zhuo, M., Y. Hu, *et al.* Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. Nature, v.368, n.6472, Apr 14, p.635-9. 1994.