

PAULA FERNANDA KINOSHITA

**Participação do TNFR1 nos efeitos da
ouabaína na sinalização inflamatória no
hipocampo de camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Tit. Cristoforo Scavone

Coorientador: Profa Dra. Elisa Mitiko Kawamoto

Versão original.

São Paulo
2018

RESUMO

Kinoshita PF. Participação do TNFR1 nos efeitos da ouabaína na sinalização inflamatória no hipocampo de camundongos.[tese (Doutorado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

O efeito anti-inflamatório da ouabaína tem sido demonstrado no sistema nervoso central. Baixas doses de ouabaína se ligam à Na^+, K^+ -ATPase e ativam vias de sinalização relacionadas a crescimento, apoptose e inflamação. Nosso grupo mostrou que a ouabaína modula a expressão de BDNF, TNF e IL-1 β . TNF tem um papel importante na inflamação e possui uma resposta complexa; e pode ser encontrado em duas formas: TNF_{tm} (transmembrana) e TNF_{sol} (solúvel). TNF_{sol} é resultante da clivagem de TNF_{tm} pela enzima TACE/ADAM 17. As duas formas de TNF interagem de forma diferente com os receptores de TNF: TNFR1 e TNFR2. TNFR1 possui um domínio de morte e é relacionado à via clássica de TNF com um perfil pró-inflamatório e pró-apoptótico. O objetivo do presente trabalho foi elucidar o papel do TNFR1 frente a estímulos com ouabaína e LPS. Foram utilizados camundongos TNFR1 KO para estudar o receptor. Os animais foram tratados com ouabaína ou salina seguido de uma segunda injeção de LPS ou salina. Depois de 2 horas da segunda injeção, hipocampo e córtex foram dissecados para os ensaios bioquímicos. Para os testes de comportamento, os animais foram avaliados no teste de campo aberto 1 dia após o tratamento; e no ensaio de esquiva inibitória 3 dias após o desafio. Os resultados mostraram que o LPS aumenta os níveis de TNF no soro dos animais WT e TNFR1 KO, mas a quantidade de TNF liberado no animal TNFR1 KO era superior ao no animal WT. A liberação de TNF é aumentada e a expressão de TNFR2 é diminuída no hipocampo somente nos animais TNFR1 KO tratados com LPS. IL-1 β é aumentado apenas no grupo WT tratado com LPS, mostrando que o TNFR1 modula a expressão de IL-1 β no hipocampo. O BDNF é aumentado no grupo TNFR1 KO tratado com LPS, mas ao mesmo tempo, a expressão de TrkB não é modulada pelo LPS como no grupo WT. Isto causa mudanças importantes no comportamento como os animais TNFR1 KO tratados com LPS apresentam diminuição na velocidade média e no tempo no centro. Estes dados demonstram que a resposta ao tratamento com LPS é mais severa nestes animais, refletindo maior comportamento ansioso. A ouabaína também aumenta a distância percorrida durante todos os experimentos nos animais WT, o que não foi encontrado nos animais TNFR1 KO, mostrando que o aumento de locomoção e exploração são dependentes de TNFR1. No ensaio de esquiva inibitória, o tratamento com ouabaína no grupo WT levou a um aumento no tempo de latência no dia 2, enquanto que no grupo TNFR1 KO este efeito foi perdido. Entretanto, nos animais TNFR1 KO, houve um aumento no tempo de latência no dia 2 no grupo controle e ouabaína+LPS, mostrando que a ouabaína de alguma forma depende de vias inflamatórias para ser protetora. Logo, nosso estudo mostrou a relevância da

sinalização do TNFR1 no hipocampo e como isso pode ser um alvo importante para a neuroinflamação.

Palavras-chave: TNFR1, ouabaína, LPS, comportamento, neuroinflamação

ABSTRACT

Kinoshita PF. TNFR1 role in ouabain effects in inflammatory pathway in mice hippocampus. Ph.D thesis [(Pharmacology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

The anti-inflammatory role of ouabain in central nervous system has been demonstrated. Low doses of ouabain binds to Na⁺,K⁺-ATPase and activate signaling pathways related to growth, apoptosis and also inflammation. Our group has shown that ouabain modulates BDNF, TNF and IL-1 β expression. TNF has a major role in inflammation and also has a very complex response. TNF can be found in two forms: tmTNF (transmembrane) and solTNF (soluble). SolTNF is a result of tmTNF cleavage by TACE/ADAM 17. Those two forms interact differently between the two TNF receptors: TNFR1 and TNFR2. TNFR1 has a death domain and is related to a canonical TNF pathway with a pro-inflammatory and pro-apoptotic profile. Thus, the objective of our work is to understand the role of TNFR1 in ouabain and as well as in LPS stimulus. To study the receptor, we used TNFR1 KO mice. The animals were treated with ouabain or saline followed by a second injection of LPS or saline. After 2 hours of the second injection, the hippocampus and cortex were dissected for the biochemical assays. For the behavior tests, the animals were evaluated in open field 24 hours after the treatment and after 3 days in passive avoidance. The results showed that LPS increased TNF levels in serum in WT and TNFR1 KO mice, but the amount of TNF released in TNFR1 KO mice was higher than in WT. TNF release was also increased and TNFR2 expression was decreased in hippocampus only in TNFR1 KO mice treated with LPS. IL-1 β is increased only in WT group with LPS treatment showing that TNFR1 modulates IL-1 β expression in hippocampus. BDNF is increased in TNFR1 KO group treated with LPS but at the same time, TrkB expression is not modulated by LPS as in WT group. This causes important modifications in behavior as TNFR1 KO mice presented in open field test a decrease in mean speed and in time in the center in LPS treated groups. These data demonstrate that LPS treatment is more severe in those animals and that also reflect in more anxious animals. Ouabain also increased distance travelled in the whole experiment in WT mice, which was not found in TNFR1 KO mice, demonstrating the increase in locomotion and exploration are TNFR1 dependent. In

passive avoidance, ouabain in WT mice had a higher latency time in day 2 while in TNFR1 KO mice this effect was lost. However, in TNFR1 KO mice there was an increase in latency time in day 2 for control and ouabain+LPS groups showing that ouabain somehow needs inflammatory pathways to be protective. Thus, our study showed the relevance of TNFR1 signaling in the hippocampus and how this could be an important target for neuroprotection.

Keywords: TNF, TNFR1, ouabain, LPS, behavior, neuroinflammation

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ouabaína e Na^+, K^+ -ATPase

A ouabaína é um glicosídeo cardiotônico que é encontrado nas plantas *Strophantus gratus* e *Acokanthera ouabaio* sendo descrito como um novo hormônio, embora haja muitas discussões na literatura a esse respeito (1–4). A ouabaína apresenta um grupo funcional de açúcar chamado de ramnose ligado a um núcleo esteroide que também está ligado a um anel de lactona (5).

Evidências demonstram imunorreatividade para ouabaína em quase todos os tecidos, incluindo o plasma, mas os níveis mais elevados foram encontrados na glândula adrenal, pituitária e hipotálamo (6,7). Porém, ainda pouco se sabe a respeito de sua função fisiológica no organismo. Na terapêutica, os glicosídeos cardiotônicos são utilizados em casos de insuficiência cardíaca congestiva, pois são capazes de inibir a Na^+, K^+ -ATPase (NKA), o que gera um aumento nos níveis de Na^+ e Ca^{2+} intracelulares e consequentemente há um aumento da contractilidade cardíaca (8).

A NKA foi descoberta pelo pesquisador dinamarquês Jens Skou em 1957 (9). É uma proteína presente na membrana plasmática e importante para a manutenção do equilíbrio osmótico celular. Isto a torna essencial para a sobrevivência e por essa razão a NKA é expressa em todas as células e altamente conservada entre as espécies (10,11). Além disso, esta enzima é responsável por quase 50% de toda a energia utilizada pelo cérebro (12).

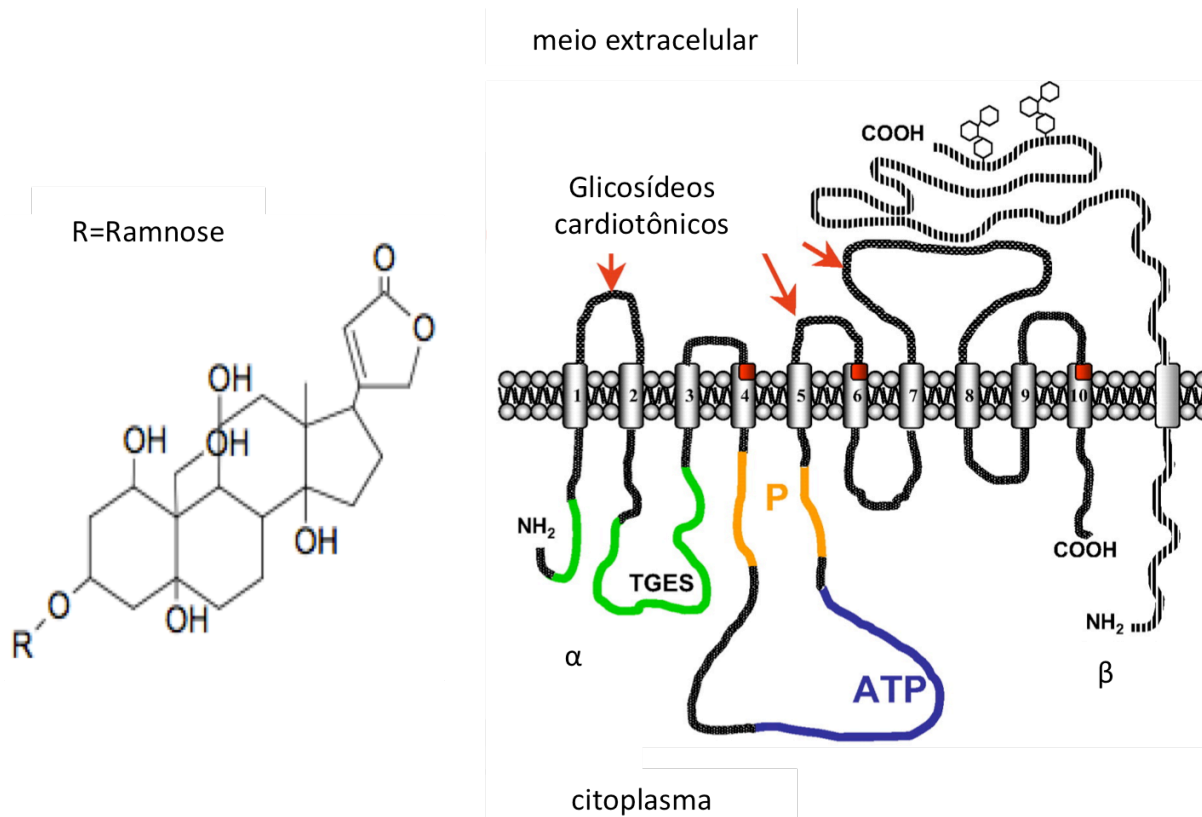
Suas funções principais são: manter o equilíbrio osmótico e volume celular, o pH e o potencial de membrana. Isso ocorre por meio da hidrólise de uma molécula de ATP, que mantém as concentrações do meio intracelular de K^+ elevadas e as de Na^+ baixas, função essencial para excitabilidade neuronal e a manutenção da celular (13,14).

A NKA é formada por duas subunidades: α e β (15,16). A presença de diversas isoformas possibilita versatilidade funcional para as células, o que gera condições para que estas enzimas realizem as suas várias funções no organismo (17–20).

A subunidade α , ou subunidade catalítica, é responsável pela troca de íons Na^+ e K^+ e é onde se encontra o sítio de ligação dos glicosídeos cardiotônicos como a ouabaína (21,22). Esse sítio de ligação é altamente conservado em diversos organismos, incluindo humanos (23), revelando um importante papel fisiológico desse

sítio. A NKA apresenta 10 domínios transmembrana sendo que a ouabaína se liga nas alças extracelulares desses domínios (1-2, 5-6 e 7-8), sendo a alça entre os domínios transmembrana 1 e 2 a parte mais importante do sítio de ligação (Figura 1) (14).

Figura 1: Estrutura da ouabaína e seu sítio de ligação.



A ouabaína apresenta um núcleo esteroide ligado a um anel de lactona e a um grupo de açúcar denominado ramnose. A subunidade α é o sítio catalítico da NKA e também o local onde ocorre a interação com a ouabaína. A ouabaína se liga em 3 alças extracelulares sendo que a alça entre os domínios transmembrana 1 e 2 é a mais importante no sítio de ligação. Adaptado de Bagrov et al., 2009 (14).

A subunidade α possui quatro isoformas: α_1 , α_2 , α_3 e α_4 . A isoforma α_1 -NKA está presente em todos os tipos celulares enquanto a α_4 -NKA está presente apenas em espermatozoides e coexiste com a isoforma α_1 -NKA (24,25). No sistema nervoso central (SNC), a isoforma α_2 -NKA está presente em astrócitos e α_3 -NKA em neurônios (26,27).

A partir dos anos 2000, diversas doenças relacionadas às mutações nas isoformas da NKA foram descritas como a distonia-parkinsoniana de início rápido

(RDP), CAPOS e hemiplegia alternada da infância (AHC) relacionadas a mutação na isoforma $\alpha 3$ -NKA e a enxaqueca familiar do tipo II (FHMII) relacionada a mutação na isoforma $\alpha 2$ -NKA (28–31). Camundongos heterozigotos das isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ -NKA apresentam déficit de memória e aprendizado em ensaios comportamentais, mostrando a importância destas isoformas no funcionamento das vias associadas à memória espacial (32).

Além disso, a α -sinucleína, proteína importante na doença de Parkinson, interage com a isoforma $\alpha 3$ -NKA, onde ocorre a formação de aglomerados que impedem a mobilidade da proteína no neurônio, comprometendo sua distribuição (33). A atividade da NKA é diminuída na doença de Alzheimer, pois há uma interação entre a mesma isoforma e a proteína β -amilóide que é uma proteína presente em excesso na doença (34).

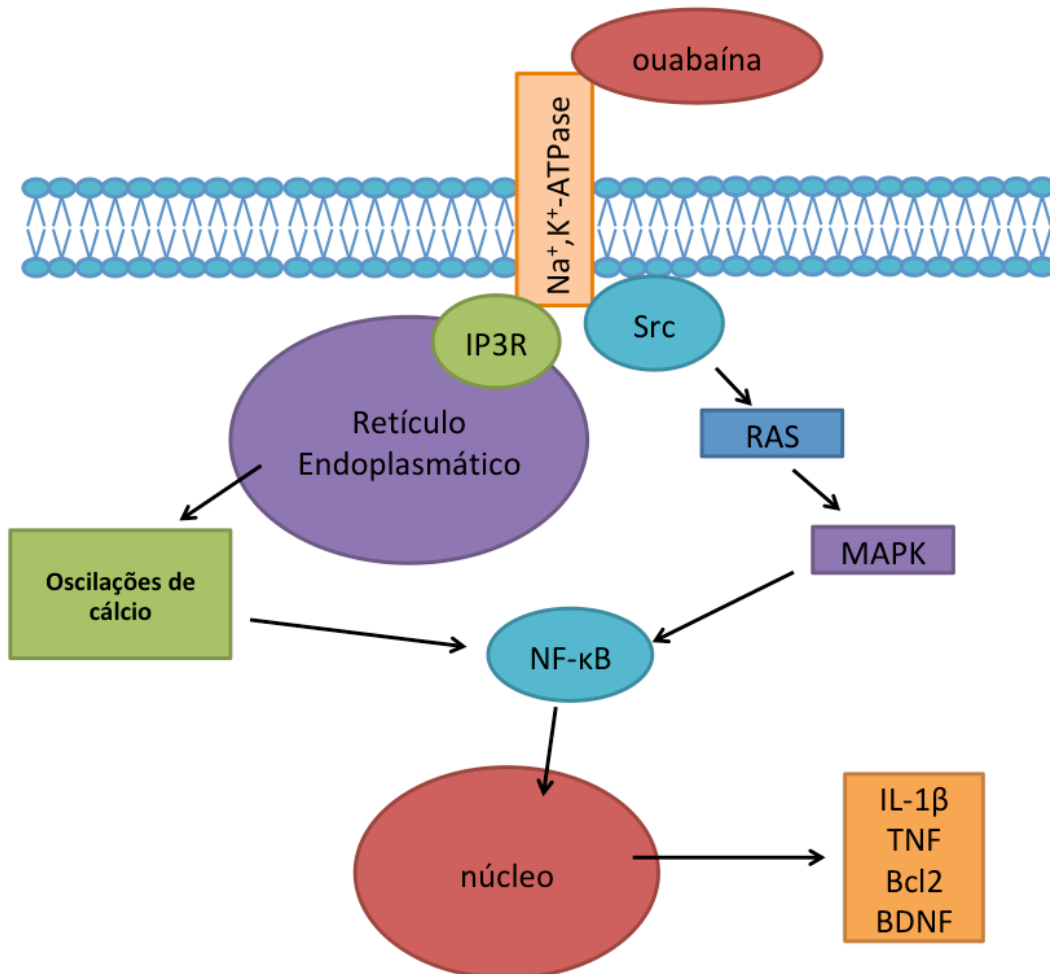
Acredita-se que a NKA apresenta dois *pools* distintos. Um destes *pools* está associado ao transporte de íons Na^+ e K^+ (*pumping*), enquanto que o outro altera a interação proteína-proteína, levando à ativação de vias independentes dos íons Na^+ e K^+ (*non-pumping*) (35). Há duas vias de sinalização que foram descritas para a função de receptor da NKA e de certa forma existem pontos em comum para as duas vias (36,37).

Xie e Askari (38) descobriram que a NKA ativa a cascata de sinalização Src-Ras-Raf-MAPK (Src: proto-oncogene tirosina quinase, Ras: tipo de proteína G de baixo peso molecular e MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno) através do receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, como consequência, à ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) e do fator nuclear associado a cadeia leve kappa do linfócito B (NF- κ B), que estão envolvidos em diversos processos celulares como crescimento, apoptose, motilidade e adesão (39). A outra via da NKA é mediada pela ativação do receptor de trifosfato de inositol (IP3R), que gera oscilações de cálcio que podem ativar fatores de transcrição como o NF- κ B que é indispensável para o desenvolvimento celular (40).

1.2 O papel dual da ouabaína e seus efeitos na inflamação

Estudos do nosso laboratório mostraram que a administração intrahipocampal de ouabaína aumentou dos níveis de RNAm de *Bdnf* (fator neurotrófico derivado do cérebro), *NOSi* (óxido nítrico sintase induzida), *Tnf* (fator de necrose tumoral) e *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*), sugerindo que este hormônio possa modular genes envolvidos na sinalização inflamatória e das neurotrofinas no SNC (41). Outro estudo confirma estas evidências *in vitro* e demonstrou em cultura primária de neurônios cerebelares de ratos que a ouabaína ativa o NF- κ B e aumenta os níveis de RNAm de *Tnf*, *IL-1 β* (interleucina 1 β) e *Bdnf* devido à cascata NMDA (N-Metil-D-Aspartato)-Src-Ras-MAPK (Figura 2), postulando que este agente endógeno pode induzir resposta adaptativa do SNC (42). O mesmo resultado foi observado em células ganglionares da retina onde a ouabaína é capaz de aumentar a sobrevivência celular via TNF e IL-1 β (43,44).

Figura 2: As duas principais vias de sinalização da ouabaína em baixas concentrações.



A ouabaína se liga à enzima Na^+, K^+ -ATPase ativando duas principais vias: a via da Src-Ras-MAPK e a ativação do receptor de IP3 levando à oscilações de cálcio. As duas vias levam à ativação do NF- κ B. Como consequência há o aumento dos níveis de mRNA de *IL-1 β* , *TNF*, *Bcl-2* e *BDNF* (38,39,41,42,45).

A ouabaína tem um papel dual e apresenta uma resposta dose-dependente. Uma dose alta de ouabaína é capaz de levar à morte celular, devido à inibição da NKA que leva a uma depleção de íons K^+ culminando em desenvolvimento de apoptose celular e também a um aumento de íons Na^+ e Ca^{+2} intracelular que origina necrose em neurônios (46). No SNC, a injeção intracerebroventricular de ouabaína em altas concentrações é utilizada como modelo de mania por inibir a NKA, diminuir os níveis de BDNF no córtex e aumentar os níveis de estresse oxidativo (47–49). Enquanto que outro estudo demonstra que a ouabaína tem um efeito anti-oxidante em animais tratados com LPS (50).

O papel protetor da ouabaína em baixas concentrações foi estudado em lesões de ácido caínico no estriado de ratos onde houve redução da apoptose pelo aumento de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (51). Semelhante aumento de Bcl-2 foi observado em cultura primária de rim de ratos, onde ouabaína exerceu um efeito protetor frente à toxina shiga, responsável pela síndrome hemolítico-urêmica (52).

Foi demonstrado que a ativação da via do BDNF e NF- κ B pela ouabaína contribui para mudanças no microambiente hipocampal, o que resulta no aumento de arborização dendrítica (53). Estas mudanças ocasionam melhoras na memória espacial e inibem a extinção da memória de longo prazo, mostrando a importância da NKA e da ouabaína na modulação de vias de sinalização que acarretam em alterações funcionais (45). Além disso, foi descrito que a ouabaína e a NKA têm um papel essencial na inflamação através da inibição de prostaglandina E2, bradicinina e degranulação de mastócitos (54).

A ouabaína também tem um efeito anti-inflamatório no SNC (55). Baixas doses de ouabaína inibem as mudanças induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) em astrócitos, reduzindo a citocina IL-1 β liberada e previne a diminuição da expressão ou atividade funcional da NKA (56). O LPS é um lipopolissacarídeo presente na membrana de bactérias gram negativas que leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B que estimula a transcrição diversos genes pró-inflamatórios. A injeção de LPS é um modelo

de inflamação e sepse muito utilizado na literatura (57,58).

Outros mecanismos envolvidos nesse potencial anti-inflamatório dos glicosídeos cardiotônicos foram observados, como a diminuição da expressão de IL-6 (59) ou o bloqueio da ativação da via TNF/NF- κ B através da inibição da interação entre o receptor de TNF do tipo 1 (TNFR1) e o TNFR1 *associated death domain protein* (TRADD) em cultura de células HeLa (60), além da inibição da expressão de genes ativados por TNF (61).

Dados publicados pelo nosso laboratório mostraram uma diminuição nos níveis de RNAm de *IL1- β* e *NOSi* e da relação de *Bax/Bcl2* no hipocampo pela ouabaína em ratos Wistar desafiados com LPS. O tratamento de ouabaína e LPS não alterou a atividade da NKA e diminuiu a ativação do NF- κ B e de astrócitos (62).

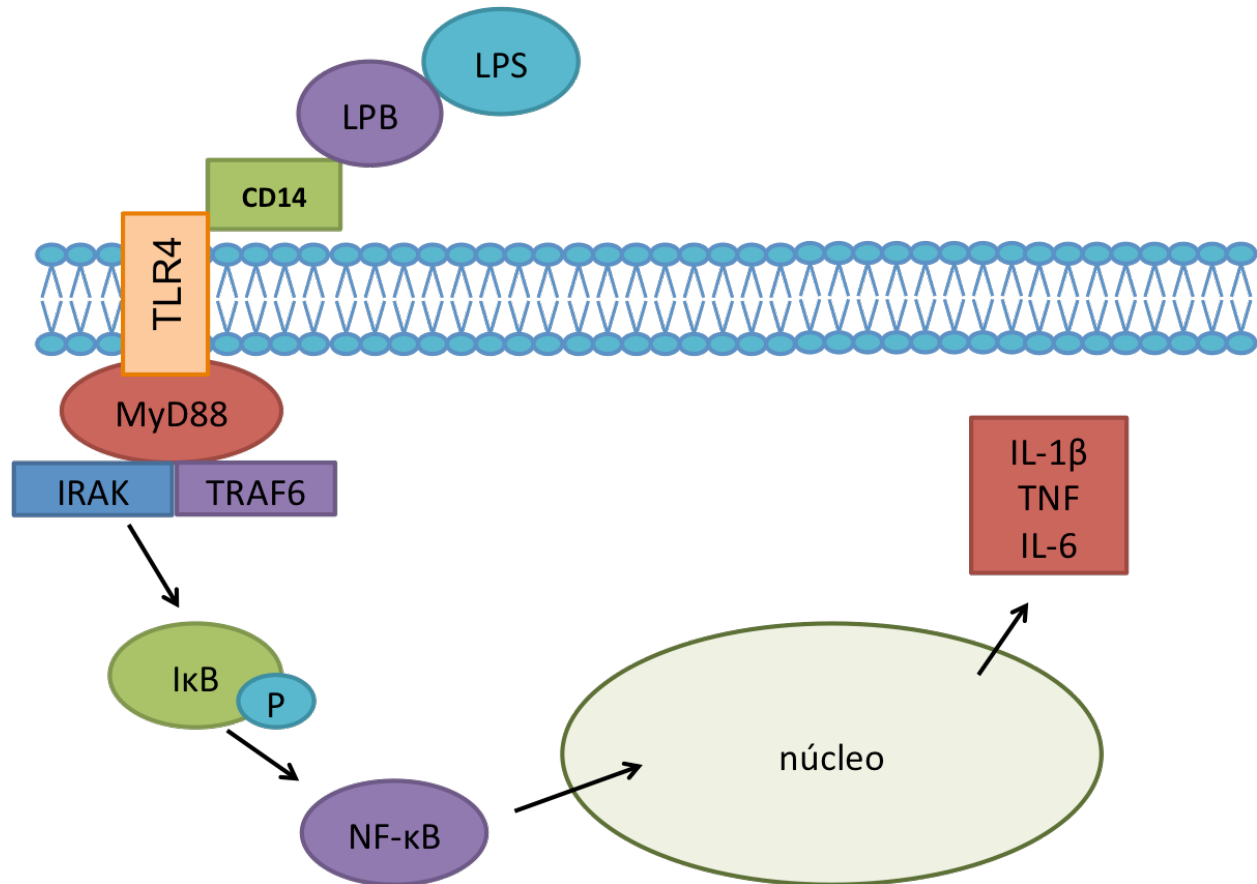
Outro estudo mostrou, mais uma vez, que a ouabaína possui um efeito anti-inflamatório em cultura primária de células da glia e que a isoforma α 2-NKA é essencial para a resposta inflamatória desencadeada pelo LPS (63). Além disso, os níveis de glicosídeos cardiotônicos estão elevados em condições inflamatórias crônicas. A ouabaína ativa o NF- κ B levando à liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em macrófagos de humanos e de camundongos e esta ativação é dependente de NKA, CD36 e o *Toll-like receptor 4* (TLR4) que é o receptor do LPS (64). Isso demonstra a importância da NKA na inflamação.

1.3 LPS e sua interferência na função cognitiva

Como já dito anteriormente, o LPS é um lipopolissacarídeo de membrana de bactéria gram negativa liberado de forma livre ou em agregados (65,66). O TLR4 é o receptor responsável pelo efeito do LPS e é considerado a molécula de reconhecimento do sistema imune inato. A sinalização pelo TLR4 ocorre pelo recrutamento sequencial de uma molécula adaptativa MyD88 e a quinase do receptor associado a IL-1 (IRAK), que após algumas etapas ativa o NF- κ B que neste caso ativa diversos genes pró-inflamatórios (67). O NF- κ B tem uma particularidade muito importante no SNC, pois o NF- κ B nos astrócitos e neurônios respondem de forma diferenciada. Enquanto que no neurônio, a translocação do NF- κ B para o núcleo é

constitutiva, nos astrócitos, a translocação é geralmente induzida por estímulos relacionados com inflamação (68).

Figura 3: Via de ativação do LPS.



O LPS se liga à proteína LPB que interage com o CD14. O CD14 interage com o TLR4 o que recruta o MyD88 e ativa IRAK e TRAF6 que leva à ativação e translocação nuclear do NF-κB. Como consequência, há o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF e IL6 (69).

As principais citocinas consideradas pró-inflamatórias são IL-1, TNF e IL-6, que são responsáveis pela resposta chamada de comportamento doentio (*sickness behavior*) que consiste num conjunto de sintomas como fraqueza, letargia, depressão e febre. Embora os sintomas sejam considerados ruins, eles são uma estratégia do organismo de lutar contra a infecção (70). O comportamento doentio é desencadeada pelas citocinas pró-inflamatórias produzidas por células do sistema imune inato ativadas em contato com padrões moleculares associados a patógenos específicos (PAMPs). Essas citocinas, principalmente IL-1α, IL1-β, IL-6 e TNF, alteram a atividade

locomotora e a cognição, pois as citocinas pró-inflamatórias modulam o aprendizado e a memória (71). Tem sido demonstrado que a ativação do TLR4 em pacientes, geralmente idosos, também causa delírio (72,73).

O receptor TLR4 tem um papel muito importante na neurogênese, pois na ausência deste receptor há um aumento da proliferação celular e da diferenciação neuronal de células progenitoras neuronais. Isso mostra que a ativação deste receptor, leva à diminuição de neurogênese, o que é um mau prognóstico para a plasticidade neuronal e conseqüentemente para a memória (74).

A neurogênese é essencial para a consolidação e recuperação de novas memórias. O hipocampo é uma estrutura cerebral relacionada com a memória declarativa e espacial e também é responsável pelo aprendizado, emoções e plasticidade neuronal. As regiões do hipocampo onde ocorre neurogênese é a zona subventricular e o giro denteado em adultos. O mais interessante é que o hipocampo é uma região extremamente vulnerável a insultos inflamatórios devido a sua grande quantidade de receptores de mediadores inflamatórios (75).

A produção de mediadores inflamatórios interrompe o delicado equilíbrio que é necessário para ações neurofisiológicas de processos imunes e isso produz alterações importantes como danos à memória (diminuição da potenciação de longa duração, LTP) e à plasticidade neuronal e diminuição da neurogênese. Isso ocorre principalmente pelo aumento da produção de IL-1 β , ativação de micróglia (76) e NF- κ B juntamente com a diminuição de BDNF no hipocampo. Esses mecanismos são homeostáticos, pois este aumento de mediadores inflamatórios pode levar a uma hiperexcitabilidade neuronal e isso impede suas conseqüências devastadoras como danos ao aprendizado e memória (77).

O BDNF é importante para a plasticidade sináptica por atuar na LTP, principalmente no hipocampo, em nível pós- e pré-sináptico. Isso ocorre devido ao controle do transporte de RNAm e de sua tradução nas sinapses sendo controlada pelo BDNF através de miRNAs (78). Como conseqüência, o BDNF é importante na aquisição e consolidação da memória e esse efeito é associado com o aumento nos níveis de RNAm do *Bdnf* e na ativação do receptor quinase B de tropomiosina (TrkB) (79).

1.4 Receptores de TNF

O TNF foi descoberto nos anos 80 como um fator capaz de atuar em alguns tumores levando à necrose, o que foi explorado pela indústria farmacêutica em um primeiro momento, mas foi visto que o TNF apresentava toxicidade como hipertensão e febre (80–82). O TNF é considerado uma citocina pleiotrópica (83) e praticamente todas as células respondem ao TNF. O TNF é benéfico principalmente na resposta imune inata contra patógenos e pode também ser deletério, promovendo lesão tecidual.

Os ligantes e receptores da família do TNF são formados por proteínas que regulam uma enorme variedade de processos imunológicos, e que também estão envolvidas na regulação do desenvolvimento e na manutenção da homeostase de diversos sistemas, incluindo o SNC.

A superfamília de TNF (TNFSF) é composta por 19 ligantes diferentes que se ligam aos receptores desta família (TNFSF, 29 receptores estruturalmente similares). Os receptores podem ser classificados em 3 subgrupos: a) os que possuem o chamado domínio de morte, b) os que interagem com o fator associado ao receptor de TNF (TRAF), e c) receptores sem capacidade de sinalização própria que controlam a atividade de outros receptores TNFRSF (84,85). Os receptores de TNFSF possuem um padrão de expressão diferenciado como na distribuição celular, mostrando sua importância no desenvolvimento de doenças, como artrite, psoríase, câncer, doença de Crohn e osteoporose (86–89).

O TNF é uma das principais ferramentas de controle da inflamação, pois no SNC, ele induz a ativação de microglia e astrócitos. Além disso, atua em neurônios, inibindo o transporte de glutamato em astrócitos e aumentando a expressão de receptores de glutamato como AMPA e NMDA, o que resulta em um aumento da sinapses excitatórias que é agravada pela diminuição da expressão do receptor GABA_A (90). A inflamação é um fator predominante na maioria das doenças neurodegenerativas. Na doença de Parkinson, há níveis elevados de TNF no estriado, que é uma das regiões mais afetadas na doença, além disso, os mesmos níveis elevados também foram encontrados em pacientes com doença de Alzheimer (91).

Porém, no tratamento de doenças relacionadas ao aumento de TNF, 30% dos pacientes não respondem ao uso de anti-TNF. Ainda, o uso deste mesmo anticorpo é contraindicado em pacientes com esclerose múltipla, porque há diversos casos de desmielinização associados ao uso de anti-TNF (92), mostrando como os mecanismos do TNF devem ser melhor elucidados para entender porque o tratamento com anticorpo não é efetivo (86).

A função do TNF no SNC ainda não é bem compreendida. O TNF é sintetizado como uma proteína transmembrana (TNFm) com 26kDa que é inserida na membrana como um homotrímero que é convertida em TNF solúvel (solTNF) com 17kDa pela ação de uma metaloproteinase chamada enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa (TACE) ou ADAM17. As duas formas de TNF são biologicamente ativas e são produzidas por microglia, astrócitos e alguns tipos de neurônios. A produção de ambas as formas depende do tipo celular, da ativação da célula, da atividade da TACE/ADAM17 e da expressão de inibidores endógenos da TACE/ADAM17 (93,94).

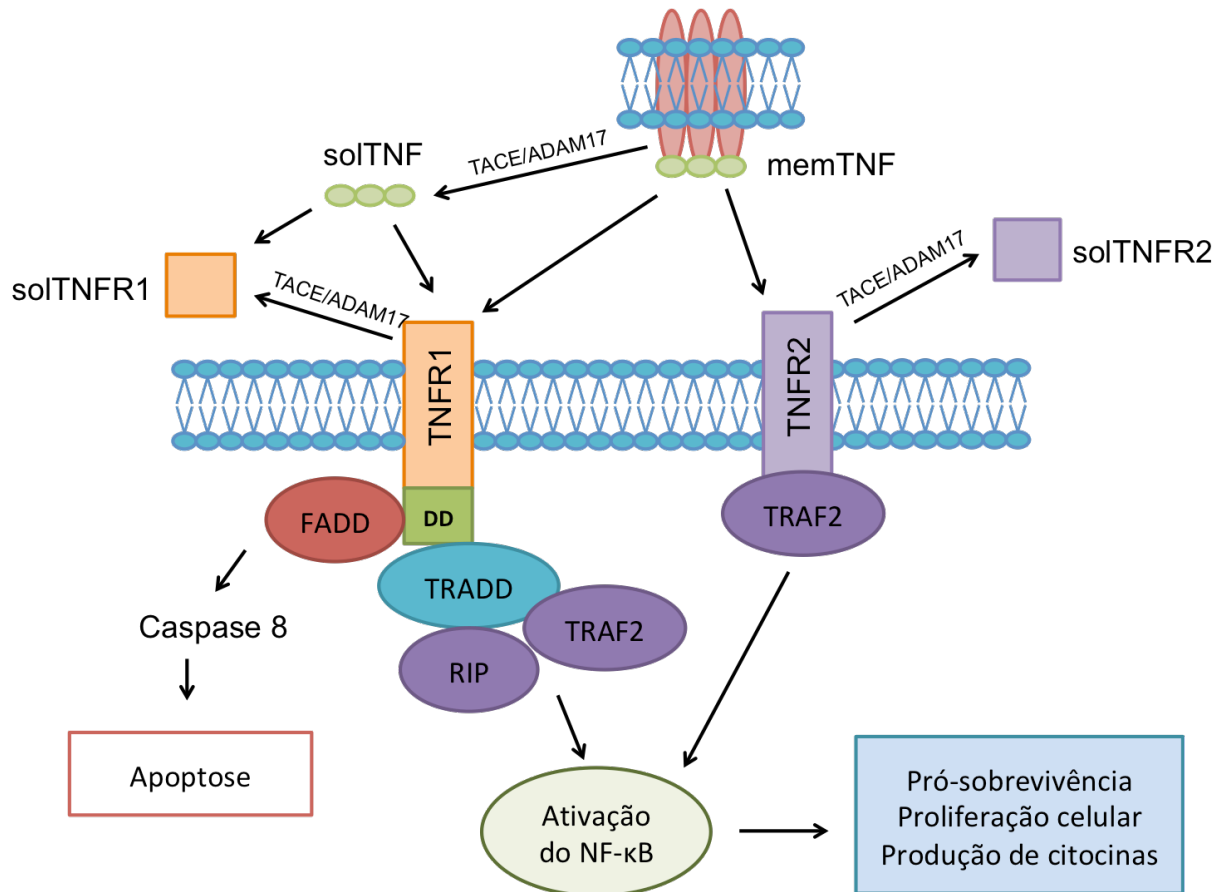
A TACE/ADAM17 também tem um papel regulador na resposta do TNF, pois esta enzima cliva os próprios receptores de TNF o que libera os chamados receptores solúveis (sTNFR) que conseguem sequestrar o TNF circulante e também diminuir a disponibilidade de receptores na membrana celular (95–97). A importância do sTNFR aparece na síndrome periódica febril, onde os pacientes possuem mutações no receptor TNFR1 o que acarreta na diminuição pela metade dos níveis de sTNFR1 no plasma e aumento na expressão de TNFR1 na membrana (98).

O TNF se liga a dois tipos de receptores: TNFR1 e TNFR2 (receptor de TNF do tipo 1 e 2). O TNFR1 é expresso na maior parte das células e pode ser ativado pelas duas formas de TNF, com preferência por solTNF. O TNFR2 é presente principalmente em células do sistema imune (microglia), células endoteliais e algumas populações neuronais e é ativado somente por TNFm (99). Têm sido demonstrados efeitos antagônicos e sinérgicos dos dois receptores (85).

O TNFR1 contém um domínio chamado domínio de morte que se liga ao TRADD, o que permite o recrutamento de RIP (proteína que interage com o receptor) e TRAF2 (receptor de TNF associado ao fator 2). Esta via de sinalização leva à ativação do NF- κ B que inicia uma sinalização pró-sobrevivência, proliferação, produção de

citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias de apoptose (pró-caspase 8). O TNFR2, diferentemente do TNFR1, não possui domínio de morte e com isso, gera uma resposta diferenciada. O TNFR2 ativa vias de sinalização relacionadas com inflamação e pró-sobrevivência. Há o recrutamento de proteínas adaptadoras de recrutamento em TRAF1 e TRAF2, o que leva à ativação do NF-κB que é demonstrado na figura 1 (99).

Figura 4: Vias de sinalização ativadas pelo TNFR1 e TNFR2.



O TNFR1 pode ser ativado pelo TNF solúvel ou de membrana (com pouca afinidade) e o TNFR2 tem muito mais afinidade pelo TNF de membrana. A transformação do TNF de membrana em TNF solúvel depende da enzima TACE/ADAM17. O TNFR1, por ter o domínio de morte (DD), ativa a via de apoptose através da ativação da caspase-8 e FADD e também da ativação de TRADD que recruta as proteínas RIP e TRAF2. Há também a ativação do NF-κB, que ativa tanto a pró- sobrevivência e proliferação celular quanto a produção de citocinas. A mesma ativação do NF-κB ocorre na ativação do TNFR2, porém, não há apoptose (99).

O TNF em concentrações fisiológicas tem um papel importante na plasticidade sináptica através da sinapse *scaling*, que é um fenômeno que permite a manutenção da homeostase da atividade neuronal independente de alterações na atividade, o que

garante a propagação normal da rede neuronal (100). Este fenômeno ocorre em resposta à altos níveis crônicos de atividade neuronal através de um feedback negativo, o que permite uma diminuição geral na taxa de disparo dos potenciais de ação (101). Este controle parece ser feito pelos astrócitos e não dependente da ação de TNF em neurônios através da alteração da expressão de receptor AMPA e alterações na amplitude de correntes pós-sinápticas excitatórias em miniatura (mEPSCs) (102).

O TNF também está relacionado com o aumento de espinhas dendríticas em neurônios que tiveram perdas recentes de espinhas dendríticas. Além disso, o TNF pode estar envolvido na LTP e sua ação é dependente de TNFR1 e TNFR2. Porém, os efeitos do TNF podem ter resultados específicos em diferentes áreas cerebrais (103,104). Como exemplo, o TNFR1 é essencial para a resolução da infecção viral no estriado enquanto que o TNFR2 é responsável pelo efeito protetor no hipocampo (105).

O TNFR1 é presente em *lipid rafts* e sinaliza para a ativação do NF-κB. Depois da formação do complexo de sinalização, TNFR1 é degradado via proteassoma. Se há uma desorganização nos *lipid rafts*, o TNFR1 não é degradado e sinaliza mais para as vias de apoptose (106). O TNFR1 é importante para a encefalopatia associada à sepse onde a permeabilidade da barreira hemato-encefálica é menos comprometida nos animais TNFR1 KO no modelo de sepse (107,108).

É interessante observar que o pré-condicionamento com LPS pode melhorar a lesão isquêmica cerebral e que esse fenômeno é dependente de aumento nos níveis de TNF pelo LPS. Entretanto, após a lesão isquêmica, os níveis de TNF diminuem e há um aumento no sTNFR1. Isso demonstra que o condicionamento é dependente de TNF, porém, para que a proteção contra o dano isquêmico aconteça, os níveis de TNF devem ser mais baixos (109). Isso demonstra a complexidade e especificidade da sinalização de TNF e seus receptores.

1.5 Justificativa

A ouabaína é considerada um hormônio endógeno que é capaz de inibir a NKA e ativar cascatas de sinalização como a Src-Ras-MAPK que podem gerar um efeito protetor. Diversos relatos na literatura mostram que a ouabaína possui um efeito

protetor e anti-inflamatório em diferentes tecidos e modelos de lesão. Estudos recentes no nosso grupo mostraram a importância da isoforma $\alpha 2$ -NKA na resposta inflamatória causada por LPS e ainda o aumento da expressão de TNF após o tratamento com ouabaína, mostrando um papel relevante desta proteína na resposta inflamatória. Como existem diversas lacunas na literatura com relação ao papel fisiológico da ouabaína e qual a relevância do TNF neste papel, é necessário e relevante observar como as alterações na modulação do TNFR1 podem influenciar os efeitos da ouabaína na vigência do estímulo inflamatório (LPS).

7. CONCLUSÃO

Apesar do TNFR1 ter o domínio de morte, a ativação de sua via é importante para que ocorra o *feedback* negativo desse processo, então, os animais com deleção do TNFR1 apresentam uma perda do controle da resposta inflamatória causada pelo LPS principalmente ligada ao TNF e isso acarreta em modificações comportamentais. Os animais TNFR1 KO têm mais dificuldade em degradar o TNF no soro em comparação com os animais WT provavelmente devido à falta dos receptores sTNFR1 e isso altera as respostas na esQUIVA inibitória e no campo aberto. Embora o efeito protetor da ouabaína não tenha sido evidenciado, alguns efeitos da ouabaína são de alguma forma dependente de TNFR1. Isso demonstra que o TNFR1 também participa de mecanismos finos que são importantes para a recuperação após a resposta inflamatória no SNC e que o efeito protetor da ouabaína parece estar relacionado com a via do TNFR1.

REFERÊNCIAS

1. Neshher M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci.* 2007 May;80(23):2093–107.
2. Hamlyn JM, Blaustein MP. Endogenous Ouabain: Recent Advances and Controversies. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2016 Sep;68(3):526–32.
3. Hamlyn JM, Linde CI, Gao J, Huang BS, Golovina VA, Blaustein MP, et al. Neuroendocrine humoral and vascular components in the pressor pathway for brain angiotensin II: a new axis in long term blood pressure control. *PLoS One.* 2014;9(9):e108916.
4. Murrell JR, Randall JD, Rosoff J, Zhao J, Jensen R V, Gullans SR, et al.

- Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. *Circulation*. 2005 Aug;112(9):1301–8.
5. Pavlovic D. The role of cardiotonic steroids in the pathogenesis of cardiomyopathy in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract*. 2014;128(1–2):11–21.
 6. Schoner W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(7):449–54.
 7. Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert GTJ, et al. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun;96(12):6654–9.
 8. Furstenwerth H. Ouabain - the insulin of the heart. *Int J Clin Pract*. 2010 Nov;64(12):1591–4.
 9. Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*. 1957 Feb;23(2):394–401.
 10. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. 1992 Jun;24(3):249–61.
 11. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*. 1998 Nov;275(5 Pt 2):F633–50.
 12. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001 Oct;21(10):1133–45.
 13. Gillis RA, Quest JA. The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis. *Pharmacol Rev*. 1979 Mar;31(1):19–97.
 14. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova O V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2009 Mar;61(1):9–38.
 15. Lingrel JB. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J Bioenerg Biomembr*. 1992 Jun;24(3):263–70.
 16. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:511–35.
 17. Fambrough DM. The sodium pump becomes a family. *Trends Neurosci*. 1988 Jul;11(7):325–8.
 18. Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 1994 Aug;269(31):19659–62.
 19. Levenson R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1994;123:1–45.
 20. Sweadner KJ. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 1989 May;988(2):185–220.
 21. Blanco G, DeTomaso AW, Koster J, Xie ZJ, Mercer RW. The alpha-subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the beta-subunit. *J Biol Chem*. 1994 Sep;269(38):23420–5.
 22. Pressley TA. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metab*. 1996;22(5–6):264–71.
 23. Dostanic-Larson I, Van Huysse JW, Lorenz JN, Lingrel JB. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov;102(44):15845–50.
 24. Clausen M V, Hilbers F, Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front Physiol*. 2017;8:371.

25. Sanchez G, Nguyen A-NT, Timmerberg B, Tash JS, Blanco G. The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Mol Hum Reprod*. 2006 Sep;12(9):565–76.
26. Viola MS, Rodriguez de Lores Arnaiz G. Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. *Life Sci*. 2007 Jun;81(3):228–33.
27. Dobretsov M, Stimers JR. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci*. 2005 Sep;10:2373–96.
28. De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):192–6.
29. Kinoshita PF, Leite JA, Orellana AMM, Vasconcelos AR, Quintas LEM, Kawamoto EM, et al. The Influence of Na(+), K(+)-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. *Front Physiol*. 2016;7:195.
30. de Carvalho Aguiar P, Sweadner KJ, Penniston JT, Zaremba J, Liu L, Caton M, et al. Mutations in the Na⁺/K⁺ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron*. 2004 Jul;43(2):169–75.
31. Heinzen EL, Swoboda KJ, Hitomi Y, Gurrieri F, Nicole S, de Vries B, et al. De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet*. 2012 Sep;44(9):1030–4.
32. Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci*. 2007 Jan;27(3):616–26.
33. Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, et al. alpha-synuclein assemblies sequester neuronal alpha3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J*. 2015 Oct;34(19):2408–23.
34. Dickey CA, Gordon MN, Wilcock DM, Herber DL, Freeman MJ, Morgan D. Dysregulation of Na⁺/K⁺ ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. *BMC Neurosci*. 2005 Feb;6:7.
35. Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, Shapiro J, et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J Biol Chem*. 2007 Apr;282(14):10585–93.
36. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 2002 May;277(21):18694–702.
37. Aizman O, Aperia A. Na,K-ATPase as a signal transducer. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Apr;986:489–96.
38. Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem*. 2002 May;269(10):2434–9.
39. Aperia A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. 2007 Jan;261(1):44–52.
40. Liu XL, Miyakawa A, Aperia A, Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *Neuroreport*. 2007 Apr;18(6):597–600.
41. Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amara FG, et al. Influence of N-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear

- factor-kappaB in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*. 2012 Jan;90(1):213–28.
42. de Sa Lima L, Kawamoto EM, Munhoz CD, Kinoshita PF, Orellana AMM, Curi R, et al. Ouabain activates NFkappaB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology*. 2013 Oct;73:327–36.
 43. Salles von-Held-Ventura J, Mazala-de-Oliveira T, Candida da Rocha Oliveira A, Granja MG, Goncalves-de-Albuquerque CF, Castro-Faria-Neto HC, et al. The trophic effect of ouabain on retinal ganglion cells is mediated by IL-1beta and TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep;478(1):378–84.
 44. de Rezende Correa G, Araujo dos Santos A, Frederico Leite Fontes C, Giestal de Araujo E. Ouabain induces an increase of retinal ganglion cell survival in vitro: the involvement of protein kinase C. *Brain Res*. 2005 Jul;1049(1):89–94.
 45. Orellana AM, Leite JA, Kinoshita PF, Vasconcelos AR, Andreotti DZ, de Sa Lima L, et al. Ouabain increases neuronal branching in hippocampus and improves spatial memory. *Neuropharmacology*. 2018 Sep;140:260–74.
 46. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci*. 2002 Feb;22(4):1350–62.
 47. Amodeo DA, Grospe G, Zang H, Dwivedi Y, Ragozzino ME. Cognitive flexibility impairment and reduced frontal cortex BDNF expression in the ouabain model of mania. *Neuroscience*. 2017 Mar;345:229–42.
 48. Hodes A, Rosen H, Deutsch J, Lifschytz T, Einat H, Lichtstein D. Endogenous cardiac steroids in animal models of mania. *Bipolar Disord*. 2016 Aug;18(5):451–9.
 49. Valvassori SS, Arent CO, Steckert A V, Varela RB, Jornada LK, Tonin PT, et al. Intracerebral Administration of BDNF Protects Rat Brain Against Oxidative Stress Induced by Ouabain in an Animal Model of Mania. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):353–62.
 50. Garcia IJP, Kinoshita PF, de Oliveira Braga I, Parreira GM, Mignaco JA, Scavone C, et al. Ouabain attenuates the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in the cerebellum of rats. *J Cell Biochem*. 2018;119(2).
 51. Golden WC, Martin LJ. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo. *Neuroscience*. 2006;137(1):133–44.
 52. Burlaka I, Liu XL, Rebetz J, Arvidsson I, Yang L, Brismar H, et al. Ouabain protects against Shiga toxin-triggered apoptosis by reversing the imbalance between Bax and Bcl-xL. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Sep;24(9):1413–23.
 53. Desfrere L, Karlsson M, Hiyoshi H, Malmersjo S, Nanou E, Estrada M, et al. Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb;106(7):2212–7.
 54. de Vasconcelos DIB, Leite JA, Carneiro LT, Piuvezam MR, de Lima MRV, de Morais LCL, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:912925.
 55. Orellana AM, Kinoshita PF, Leite JA, Kawamoto EM, Scavone C. Cardiotonic Steroids as Modulators of Neuroinflammation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:10.
 56. Forshammar J, Block L, Lundborg C, Biber B, Hansson E. Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in

- lipopolysaccharide-treated astrocytes. *J Biol Chem*. 2011 Sep;286(36):31586–97.
57. Glaros TG, Chang S, Gilliam EA, Maitra U, Deng H, Li L. Causes and consequences of low grade endotoxemia and inflammatory diseases. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013 Jan;5:754–65.
 58. Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. 2013 Jan;61(1):71–90.
 59. Tonin PT, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Varela RB, Teixeira AL, et al. Effects of ouabain on cytokine/chemokine levels in an animal model of mania. *J Neuroimmunol*. 2014 Nov;276(1–2):236–9.
 60. Yang Q, Huang W, Jozwik C, Lin Y, Glasman M, Caohuy H, et al. Cardiac glycosides inhibit TNF-alpha/NF-kappaB signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul;102(27):9631–6.
 61. Ye J, Chen S, Maniatis T. Cardiac glycosides are potent inhibitors of interferon-beta gene expression. *Nat Chem Biol*. 2011 Jan;7(1):25–33.
 62. Kinoshita PF, Yshii LM, Vasconcelos AR, Orellana AMM, Lima L de S, Davel APC, et al. Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. *J Neuroinflammation*. 2014 Dec;11:218.
 63. Kinoshita PF, Yshii LM, Orellana AMM, Paixao AG, Vasconcelos AR, Lima L de S, et al. Alpha 2 Na(+),K(+)-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. *Sci Rep*. 2017 Jul;7(1):4894.
 64. Chen Y, Huang W, Yang M, Xin G, Cui W, Xie Z, et al. Cardiotonic Steroids Stimulate Macrophage Inflammatory Responses Through a Pathway Involving CD36, TLR4, and Na/K-ATPase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Aug;37(8):1462–9.
 65. Watson RW, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. *J Leukoc Biol*. 1994 Jul;56(1):95–103.
 66. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1994 Feb;8(2):217–25.
 67. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar;140(6):805–20.
 68. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a001271.
 69. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*. 2002 Sep;323(1–2):59–72.
 70. Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*. 1988;12(2):123–37.
 71. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct;500(1–3):399–411.
 72. Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, et al. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry*. 2009 Feb;65(4):304–12.
 73. Jalleh R, Koh K, Choi B, Liu E, Maddison J, Hutchinson MR. Role of microglia and

- toll-like receptor 4 in the pathophysiology of delirium. *Med Hypotheses*. 2012 Dec;79(6):735–9.
74. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, et al. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol*. 2007 Sep;9(9):1081–8.
 75. Green HF, Nolan YM. Inflammation and the developing brain: consequences for hippocampal neurogenesis and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014 Mar;40:20–34.
 76. Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res*. 2006 Mar;83(4):557–66.
 77. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2011 Feb;25(2):181–213.
 78. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 2014 Jan;76 Pt C:639–56.
 79. Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*. 2003 Apr;91(4):267–70.
 80. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012 Jan;119(3):651–65.
 81. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666–70.
 82. Creaven PJ, Plager JE, Dupere S, Huben RP, Takita H, Mittelman A, et al. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;20(2):137–44.
 83. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*. 1994;45:491–503.
 84. Wajant H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ*. 2015 Nov;22(11):1727–41.
 85. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):45–65.
 86. Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Feb;12(2):147–68.
 87. Croft M, Duan W, Choi H, Eun S-Y, Madireddi S, Mehta A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol*. 2012 Mar;33(3):144–52.
 88. Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Sedy JR, Ware CF. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity*. 2016 May;44(5):1005–19.
 89. Xu Y, Chang L, Huang A, Liu X, Liu X, Zhou H, et al. Functional Detection of TNF Receptor Family Members by Affinity-Labeled Ligands. *Sci Rep*. 2017 Jul;7(1):6944.
 90. Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:861231.
 91. Frankola KA, Greig NH, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-alpha to elucidate and

- ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 May;10(3):391–403.
92. Kemanetzoglou E, Andreadou E. CNS Demyelination with TNF-alpha Blockers. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017 Apr;17(4):36.
 93. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994 Aug;370(6490):555–7.
 94. Smookler DS, Mohammed FF, Kassiri Z, Duncan GS, Mak TW, Khokha R. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *J Immunol*. 2006 Jan;176(2):721–5.
 95. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, et al. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J*. 1990 Oct;9(10):3269–78.
 96. Wallach D, Englemann H, Nophar Y, Aderka D, Kemper O, Hornik V, et al. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl*. 1991;35:51–7.
 97. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. *Int J Mol Sci*. 2018 May;19(5).
 98. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*. 1999 Apr;97(1):133–44.
 99. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2008 Oct;5:45.
 100. Chowdhury D, Hell JW. Homeostatic synaptic scaling: molecular regulators of synaptic AMPA-type glutamate receptors. Vol. 7, F1000Research. London, UK; 2018.
 101. Siddoway B, Hou H, Xia H. Molecular mechanisms of homeostatic synaptic downscaling. *Neuropharmacology*. 2014 Mar;78:38–44.
 102. Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature*. 2006 Apr;440(7087):1054–9.
 103. Rizzo FR, Musella A, De Vito F, Fresegna D, Bullitta S, Vanni V, et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1beta Modulate Synaptic Plasticity during Neuroinflammation. *Neural Plast*. 2018;2018:8430123.
 104. Becker D, Deller T, Vlachos A. Tumor necrosis factor (TNF)-receptor 1 and 2 mediate homeostatic synaptic plasticity of denervated mouse dentate granule cells. Vol. 5, *Scientific Reports*. 2015.
 105. Rodriguez M, Zoecklein L, Papke L, Gamez J, Denic A, Macura S, et al. Tumor necrosis factor alpha is reparative via TNFR2 [corrected] in the hippocampus and via TNFR1 [corrected] in the striatum after virus-induced encephalitis. *Brain Pathol*. 2009 Jan;19(1):12–26.
 106. Legler DF, Micheau O, Doucey M-A, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation.

- Immunity. 2003 May;18(5):655–64.
107. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int.* 2008 Feb;52(3):447–56.
 108. Vandenbroucke RE, Dejonckheere E, Van Lint P, Demeestere D, Van Wonterghem E, Vanlaere I, et al. Matrix metalloprotease 8-dependent extracellular matrix cleavage at the blood-CSF barrier contributes to lethality during systemic inflammatory diseases. *J Neurosci.* 2012 Jul;32(29):9805–16.
 109. Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, et al. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Oct;27(10):1663–74.
 110. Kawamoto EM, Scavone C, Mattson MP, Camandola S. Curcumin requires tumor necrosis factor alpha signaling to alleviate cognitive impairment elicited by lipopolysaccharide. *Neurosignals.* 2013;21(1–2):75–88.
 111. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72:248–54.
 112. Feschenko MS, Sweadner KJ. Phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase C at Ser18 occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis. *J Biol Chem.* 1997 Jul;272(28):17726–33.
 113. Kawamoto EM, Munhoz CD, Lepsch LB, de Sa Lima L, Glezer I, Markus RP, et al. Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity. *Neurobiol Aging.* 2008 Nov;29(11):1712–20.
 114. Fiske CH, Subbarow Y. THE NATURE OF THE “INORGANIC PHOSPHATE” IN VOLUNTARY MUSCLE. *Science.* 1927 Apr;65(1686):401–3.
 115. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug;227(5259):680–5.
 116. Ferguson D, Sapolsky R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci.* 2007 Jul;27(30):8046–52.
 117. Dostanic I, Paul RJ, Lorenz JN, Theriault S, Van Huysse JW, Lingrel JB. The alpha2-isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Feb;288(2):H477-85.
 118. Balkowiec-Iskra E, Vermehren-Schmaedick A, Balkowiec A. Tumor necrosis factor-alpha increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neuroscience.* 2011 Apr;180:322–33.
 119. Saha RN, Liu X, Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006 Sep;1(3):212–22.
 120. Calsavara AC, Soriani FM, Vieira LQ, Costa PA, Rachid MA, Teixeira AL. TNFR1 absence protects against memory deficit induced by sepsis possibly through over-expression of hippocampal BDNF. *Metab Brain Dis.* 2015 Jun;30(3):669–78.
 121. Pierre S V, Sottejeau Y, Gourbeau J-M, Sanchez G, Shidyak A, Blanco G.

- Isoform specificity of Na-K-ATPase-mediated ouabain signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Apr;294(4):F859-66.
122. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:271359.
 123. Naude PJW, Dobos N, van der Meer D, Mulder C, Pawironadi KGD, den Boer JA, et al. Analysis of cognition, motor performance and anxiety in young and aged tumor necrosis factor alpha receptor 1 and 2 deficient mice. *Behav Brain Res*. 2014 Jan;258:43–51.
 124. Gooch CL, Pracht E, Borenstein AR. The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action. *Ann Neurol*. 2017 Apr;81(4):479–84.
 125. Burla C, Camarano AA, Kanso S, Fernandes D, Nunes R. [A perspective overview of dementia in Brazil: a demographic approach]. *Cien Saude Colet*. 2013 Oct;18(10):2949–56.
 126. Berk C, Paul G, Sabbagh M. Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014 Jun;23(6):837–46.
 127. Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):702–16.
 128. Dai M-H, Zheng H, Zeng L-D, Zhang Y. The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. *Oncotarget*. 2018 Mar;9(19):15132–43.
 129. Cruchaga C, Del-Aguila JL, Saef B, Black K, Fernandez MV, Budde J, et al. Polygenic risk score of sporadic late-onset Alzheimer's disease reveals a shared architecture with the familial and early-onset forms. *Alzheimers Dement*. 2018 Feb;14(2):205–14.
 130. Gonzalez H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*. 2014 Sep;274(1–2):1–13.
 131. Vardy ERLC, Teodorczuk A, Yarnall AJ. Review of delirium in patients with Parkinson's disease. *J Neurol*. 2015 Nov;262(11):2401–10.
 132. Fong TG, Jones RN, Marcantonio ER, Tommet D, Gross AL, Habtemariam D, et al. Adverse outcomes after hospitalization and delirium in persons with Alzheimer disease. *Ann Intern Med*. 2012 Jun;156(12):848–56, W296.
 133. Skelly DT, Griffin EW, Murray CL, Harney S, O'Boyle C, Hennessy E, et al. Acute transient cognitive dysfunction and acute brain injury induced by systemic inflammation occur by dissociable IL-1-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry*. 2018 Jun;
 134. Maggio N, Vlachos A. Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through intracellular calcium stores. *J Mol Med (Berl)*. 2018 Aug;
 135. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015 Aug;302:2–22.
 136. Albenis BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*. 2000 Feb;35(2):151–9.
 137. Vasconcelos AR, Kinoshita PF, Yshii LM, Marques Orellana AM, Bohmer AE, de

- Sa Lima L, et al. Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na,K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 2015 May;36(5):1914–23.
138. Zhang T, Lu X, Li J, Chidiac P, Sims SM, Feng Q. Inhibition of Na/K-ATPase promotes myocardial tumor necrosis factor-alpha protein expression and cardiac dysfunction via calcium/mTOR signaling in endotoxemia. *Basic Res Cardiol*. 2012 Mar;107(2):254.
 139. Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, et al. Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience*. 2007 Feb;144(3):934–49.
 140. Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, et al. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain*. 2011 Sep;134(Pt 9):2736–54.
 141. Gao H, Danzi MC, Choi CS, Taherian M, Dalby-Hansen C, Ellman DG, et al. Opposing Functions of Microglial and Macrophagic TNFR2 in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Rep*. 2017 Jan;18(1):198–212.
 142. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci*. 2001 Nov;4(11):1116–22.
 143. Simen BB, Duman CH, Simen AA, Duman RS. TNFalpha signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biol Psychiatry*. 2006 May;59(9):775–85.
 144. Novrup HG, Bracchi-Ricard V, Ellman DG, Ricard J, Jain A, Runko E, et al. Central but not systemic administration of XPro1595 is therapeutic following moderate spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2014 Sep;11:159.
 145. Lee HH, Cho YI, Kim SY, Yoon YE, Kim KS, Hong SJ, et al. TNF-alpha-induced Inflammation Stimulates Apolipoprotein-A4 via Activation of TNFR2 and NF-kappaB Signaling in Kidney Tubular Cells. *Sci Rep*. 2017 Aug;7(1):8856.
 146. Aderka D, Wysenbeek A, Engelmann H, Cope AP, Brennan F, Molad Y, et al. Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1993 Aug;36(8):1111–20.
 147. Siegmund D, Kums J, Ehrenschwender M, Wajant H. Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Death Dis*. 2016 Sep;7(9):e2375.
 148. Simon A, Park H, Maddipati R, Lobito AA, Bulua AC, Jackson AJ, et al. Concerted action of wild-type and mutant TNF receptors enhances inflammation in TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May;107(21):9801–6.
 149. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 1993 Aug;364(6440):798–802.
 150. Blaque R, Meakin C, Millet S, Gardner CR. Selective enhancement of LPS-

- induced serum TNF-alpha production by carrageenan pretreatment in mice. *Gen Pharmacol.* 1998 Aug;31(2):301–6.
151. Cannon JG, Tompkins RG, Gelfand JA, Michie HR, Stanford GG, van der Meer JW, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis.* 1990 Jan;161(1):79–84.
 152. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):677–87.
 153. McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Pociask DA, Broderick L, Hoffman HM, et al. Cutting edge: IL-6 is a marker of inflammation with no direct role in inflammasome-mediated mouse models. *J Immunol.* 2012 Sep;189(6):2707–11.
 154. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Aug;22(4):189–95.
 155. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1503–10.
 156. Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 May;29(5):273–84.
 157. Lee K-M, Jeon S-M, Cho H-J. Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF-kappaB in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pain.* 2009 Sep;13(8):794–806.
 158. Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MCW, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. *Neuropharmacology.* 2003 Dec;45(8):1120–9.
 159. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 Dec;2(12):679–89.
 160. Chugh D, Nilsson P, Afjei S-A, Bakochi A, Ekdahl CT. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 2013 Dec;250:176–88.
 161. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci.* 2006 May;26(18):4930–9.
 162. Ren C, Kobeissy F, Alawieh A, Li N, Li N, Zibara K, et al. Assessment of Serum UCH-L1 and GFAP in Acute Stroke Patients. *Sci Rep.* 2016 Apr;6:24588.
 163. Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma.* 2010 Jul;69(1):104–9.
 164. van den Boogaard M, Ramakers BP, van Alfen N, van der Werf SP, Fick WF, Hoedemaekers CW, et al. Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Crit Care.* 2010;14(3):R81.
 165. Petzold A, Psotta L, Brigadski T, Endres T, Lessmann V. Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2015 Apr;120:52–60.
 166. Lima Jacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol.* 2018 Aug;

167. Sandhya VK, Raju R, Verma R, Advani J, Sharma R, Radhakrishnan A, et al. A network map of BDNF/TRKB and BDNF/p75NTR signaling system. *J Cell Commun Signal*. 2013 Dec;7(4):301–7.
168. Dluzen DE, Story GM, Xu K, Kucera J, Walro JM. Alterations in nigrostriatal dopaminergic function within BDNF mutant mice. *Exp Neurol*. 1999 Dec;160(2):500–7.
169. Baquet ZC, Bickford PC, Jones KR. Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. *J Neurosci*. 2005 Jun;25(26):6251–9.
170. Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron*. 1997 Aug;19(2):269–81.
171. Lin Y-T, Ro L-S, Wang H-L, Chen J-C. Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study. *J Neuroinflammation*. 2011 Sep;8:126.
172. Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F. Systemic interleukin-1 beta decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*. 1993 Mar;53(2):297–301.
173. Guan Z, Fang J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun*. 2006 Jan;20(1):64–71.
174. Zhu B, Wang Z-G, Ding J, Liu N, Wang D-M, Ding L-C, et al. Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus. *Exp Ther Med*. 2014 Mar;7(3):750–4.
175. Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem*. 2004;11(2):172–8.
176. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Sep;13(9):679–92.
177. Wu J, Akkuratov EE, Bai Y, Gaskill CM, Askari A, Liu L. Cell signaling associated with Na(+)/K(+)-ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src. *Biochemistry*. 2013 Dec;52(50):9059–67.
178. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem*. 1999 Jan;274(4):2225–33.
179. Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RHJ, Nanche N, et al. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2010 Aug;19(15):2974–86.
180. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011 Sep;13(9):1016–23.
181. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*. 2013 Sep;23(17):R764–73.
182. Jeremias IC, Scaini G, Constantino L, Vuolo F, Ferreira AK, Scherer EBS, et al. The decrease on Na(+), K(+)-ATPase activity in the cortex, but not in hippocampus, is reverted by antioxidants in an animal model of sepsis. *Mol Neurobiol*. 2012 Oct;46(2):467–74.

183. Rosi S, Ramirez-Amaya V, Hauss-Wegrzyniak B, Wenk GL. Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *J Neuroinflammation*. 2004 Jul;1(1):12.
184. Gomes C, Ferreira R, George J, Sanches R, Rodrigues DI, Goncalves N, et al. Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J Neuroinflammation*. 2013 Jan;10:16.
185. Hasegawa-Ishii S, Inaba M, Umegaki H, Unno K, Wakabayashi K, Shimada A. Endotoxemia-induced cytokine-mediated responses of hippocampal astrocytes transmitted by cells of the brain-immune interface. *Sci Rep*. 2016 May;6:25457.
186. Matsumori A, Ono K, Nishio R, Nose Y, Sasayama S. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. *Cytokine*. 2000 Mar;12(3):294–7.
187. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254–66.
188. D’Arcangelo G, Tancredi V, Onofri F, D’Antuono M, Giovedi S, Benfenati F. Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci*. 2000 Apr;12(4):1241–52.
189. Murphy PG, Borthwick LA, Altares M, Gauldie J, Kaplan D, Richardson PM. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *Eur J Neurosci*. 2000 Jun;12(6):1891–9.
190. Swartz KR, Liu F, Sewell D, Schochet T, Campbell I, Sandor M, et al. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res*. 2001 Mar;896(1–2):86–95.
191. Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, et al. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*. 1999 Feb;25(4):343–57.
192. Ruktanonchai DJ, El-Mallakh RS, Li R, Levy RS. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. *Physiol Behav*. 1998 Feb;63(3):403–6.
193. Wang Y-C, Wang E-N, Wang C-C, Huang C-L, Huang ACW. Dissociating effects of spatial learning from locomotor activity for ouabain-induced bipolar disorder-like rats. *Psychiatry Res*. 2014 May;216(3):432–7.
194. Decker S, Grider G, Cobb M, Li XP, Huff MO, El-Mallakh RS, et al. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion in the development of an animal model for bipolar illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2000 Apr;24(3):455–62.
195. Song C, Horrobin DF, Leonard BE. The comparison of changes in behavior, neurochemistry, endocrine, and immune functions after different routes, doses and durations of administrations of IL-1beta in rats. *Pharmacopsychiatry*. 2006 May;39(3):88–99.
196. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993 May;73(3):457–67.
197. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*.

- 1976 May;83(3):482–504.
198. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J.* 2014 Jan;33(1):7–22.
 199. Shanks N, Griffiths J, Zalcman S, Zacharko RM, Anisman H. Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990 Jul;36(3):515–9.
 200. Sakurai M, Sekiguchi M, Zushida K, Yamada K, Nagamine S, Kabuta T, et al. Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behaviour and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur J Neurosci.* 2008 Feb;27(3):691–701.
 201. Zeng W, Dohi S, Shimonaka H, Asano T. Spinal antinociceptive action of Na⁺-K⁺ pump inhibitor ouabain and its interaction with morphine and lidocaine in rats. *Anesthesiology.* 1999 Feb;90(2):500–8.
 202. Lopatina E V, Yachnev IL, Penniyaynen VA, Plakhova VB, Podzorova SA, Shelykh TN, et al. Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na⁺,K⁺-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. *Med Chem.* 2012 Jan;8(1):33–9.

