



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**LUCIANA SILVA DO AMARAL**

**Caracterização dos mecanismos envolvidos na  
seletividade funcional de bufadienólidos**

RIO DE JANEIRO

2015

# **Caracterização dos mecanismos envolvidos na seletividade funcional de bufadienolidos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia)

Orientadores: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas  
Prof. Dr. François Germain Noël

Rio de Janeiro  
Dezembro/2015

Amaral, Luciana Silva

Caracterização dos mecanismos envolvidos na seletividade funcional de bufadienolidos / Luciana Silva do Amaral. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2015.

xvi, 108f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadores: Luis Eduardo Menezes Quintas e François Germain Noël

1. Bufadienolidos. 2. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. 3. ERK. 4. seletividade funcional. 5. morte celular. I. Quintas, Luis Eduardo Menezes (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

# **Caracterização dos mecanismos envolvidos na seletividade funcional de bufadienolidos**

Luciana Silva do Amaral

Orientadores: Prof. Dr. Luís Eduardo Menezes Quintas  
Prof. Dr. François Germain Noël

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas – UFRJ

---

Prof. Dr. François Germain Noël – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Giestal de Araujo – UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Castelo Branco - UFRJ

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lucienne da Silva Lara Morcillo - UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Zaluar P. Guimarães - UFRJ

Rio de Janeiro

Dezembro/2015

À minha família, em especial,  
aos meus pais, Gilda e Lúcio, pelo amor,  
educação e incentivo. Pelo apoio em cada  
meta conquistada.

Ao meu marido Rafael, pelo amor,  
paciência e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luis Eduardo Menezes Quintas, meu orientador, pela orientação científica prestada, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo profissional. Agradeço pelo apoio, pelas contribuições na minha formação, por sua amizade e aprendizado ao longo destes anos.

Ao Professor François Noël, pelo apoio, orientação e incentivo. Obrigada pela convivência e aprendizado ao longo da minha formação. Pelo seu exemplo de profissionalismo.

À Professora Cláudia Lúcia Martins Silva, pelos ensinamentos e exemplos profissionais, colaboração durante a realização deste trabalho e pelas contribuições na minha formação.

Ao Dr. Geraldino Cunha Filho pela colaboração essencial para a realização deste trabalho e adorável convivência.

À doutora Jaine Fernandes por toda a colaboração prestada na execução experimental e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório, em especial, Aline Reis, Fernanda Chagas, Jéssica Barbosa, Natasha Paixão, Suellen D'arc, Tássia Cavalcanti e Thais Pompeu, pelo apoio, companheirismo, momentos alegres e pela amizade. Por tornarem os dias no laboratório muito mais divertidos.

Aos meus amigos queridos, pelo apoio e incentivo durante esta caminhada. Pelos conselhos e pela amizade sincera.

Ao Raphael Valente, pela ajuda com os experimentos de Ciclo Celular por citometria de fluxo.

Ao Jhonatha da Mota T. Cruz, pela ajuda com os experimentos de Liberação de LDH.

À Professora Marília Zaluar P. Guimarães, pelas contribuições durante a revisão deste trabalho.

Aos professores Elizabeth Giestal, Morgana Castelo Branco e Lucienne da Silva Lara Morcillo por aceitarem fazer parte da banca, avaliar este trabalho e pelas contribuições que não de fazer.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

”O sucesso nasce do querer, da  
determinação e persistência em se chegar a  
um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,  
quem busca e vence obstáculos, no mínimo  
fará coisas admiráveis.”

José de Alencar



## RESUMO

AMARAL, Luciana Silva. **Caracterização dos mecanismos envolvidos na seletividade funcional de bufadienolidos.** Rio de Janeiro, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia e Química medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Bufadienolidos são uma classe de esteroides cardiotônicos amplamente encontrados na natureza. Alguns deles foram encontrados em mamíferos como hormônios esteróides. Eles são considerados inibidores específicos da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, mas também promovem a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal mediadas por essa enzima. Nós postulamos que tais bufadienolidos endógenos poderiam produzir efeitos celulares únicos. Nós mostramos que os bufadienolidos endógenos estruturalmente semelhantes telocinobufagina (TCB) e marinobufagina (MBG) apresentam efeitos opostos em células renais LLC-PK1; enquanto MBG induziu a proliferação celular, TCB não teve nenhum efeito ou teve um efeito antiproliferativo, a 100 nM. O efeito de MBG, mas não o de TCB, foi prevenido pela inibição de Src e MEK, indicando que o efeito de MBG está associado com a via da ERK. O tratamento com TCB 100 nM aumentou o número de células nas fases sub-G0 e S do ciclo celular, com uma concomitante diminuição na proporção das células na fase G2/M. TCB alterou a morfologia das células LLC-PK1, promovendo condensação da cromatina, e também diminuiu a proporção Bcl-2/Bax, indicando processo apoptótico. O tratamento com TCB não afetou a liberação de LDH. Quando utilizamos o quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, BAPTA-AM, não se observou alteração do perfil de atividade de telocinobufagina sobre as células LLC-PK1, indicando que o efeito deve ser por modulação de vias de sinalização e não alteração do fluxo iônico. Outras vias de sinalização, incluindo a AKT, p38, JNK, PKG2 e GSK3, também não foram associadas ao efeito de TCB. No geral, estes resultados indicam que os bufadienolidos apresentam seletividade funcional, promovendo efeitos divergentes através de diferentes mecanismos, apesar de atuarem sobre o mesmo receptor e contribuem para a compreensão da existência de diferentes esteróides cardiotônicos endógenos em mamíferos.

Palavras-chave: Bufadienolidos,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, inibição enzimática, ERK1/2, proliferação celular, viabilidade celular.

## ABSTRACT

AMARAL, Luciana Silva. **Characterization of the mechanisms involved in bufadienolides functional selectivity.** Rio de Janeiro, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia e Química medicinal) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Bufadienolides are a class of cardiotonic steroids widely found in nature. Some of them have been identified in mammals as steroid hormones. They are considered specific  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibitors but also promote the activation of multiple signal transduction pathways via this enzyme. We postulate that such diverse endogenous bufadienolides may evoke unique cellular effects. We have shown that the structurally similar endogenous bufadienolides telocinobufagin (TCB) and marinobufagin (MBG) have opposite effects in LLC-PK1 renal cells; while MBG induced cell proliferation, TCB had no effect or even had an antiproliferative effect at 100 nM. MBG, but not TCB, effect was prevented by Src or MEK inhibition, indicating that MBG effect is associated with ERK pathway. TCB 100 nM treatment increased cells in the sub-G0 and S phases of the cell cycle, with a concomitant decrease in the proportion of those in the G2/M phase. TCB changed LLC-PK1 morphology, promoting chromatin condensation and also decreased Bcl-2/Bax ratio, indicating apoptosis. TCB treatment did not affect LDH release. When using the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA-AM, we observed no change in telocinobufagin activity profile on LLC-PK1 cells, indicating that the effect should be modulation of signaling pathways and not changing in ionic flow. Other signaling pathways, including AKT, p38, JNK, PKG2 and GSK3, were not associated to TCB effect as well. Overall, these results indicate that bufadienolides present functional selectivity promoting divergent effects by different mechanisms despite acting on the same receptor and contribute to the understanding of the existence of different endogenous cardiotonic steroids in mammals.

Keywords: Bufadienolides,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ERK1/2, functional selectivity, cell death.

## SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
Abreviaturas	xv
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	2
1.1.1 Aspectos gerais	2
1.1.2 Estrutura	3
1.1.3 Ciclo Enzimático	6
1.2 Esteróides Cardiotônicos	8
1.2.1 Ligantes Específicos da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	8
1.2.2 Clases, Estrutura e Origem	10
1.2.3 Esteróides Cardiotônicos Endógenos	13
1.3 A Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase como transdutora de sinal	15
1.4 Duas populações de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	18
1.5 Esteróides Cardiotônicos e seletividade Funcional	19
1.6 Sinalização Intracelular e Proteínas Cinases	21
1.6.1 Família MAPK	21
1.6.2 Família Src	25
1.6.3 Família Src	27
1.7 Justificativa e Relevância	29
<b>2. Objetivos</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31

<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>32</b>
3.1 Obtenção de Bufadienolidos	33
3.2 Isolamento dos Compostos e caracterização química	33
3.3 Linhagem Celular	34
3.4 Efeito do tratamento com bufadienolidos sobre a via MEK1/2-ERK1/2 e GSK3- $\beta$	34
3.5 Dosagem de Proteínas	35
3.6 Ensaio de Western blot	35
3.7 Ensaio de Inibição da via Src-ERK1/2, PI3K-mTOR, p38, JNK1/2, GSK3- $\beta$ e avaliação sobre a proliferação e viabilidade celular	36
3.8 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT	37
3.9 Avaliação da Viabilidade Celular através da expressão das proteínas Bax e Bcl2	38
3.10 Ensaio de LDH	38
3.11 Ensaio para avaliação dos estágios do ciclo celular por Citometria de fluxo	39
3.12 Contagem de células	40
3.13 Análise morfológica por microscopia de contraste de fase	40
3.14 Análise morfológica por microscopia de fluorescência	41
3.15 Avaliação do efeito do tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD)	41
3.16 Avaliação do efeito do BAPTA-AM sobre o tratamento com Telocinobufagina	42
3.17 Análise dos dados	42

<b>4. Resultados</b>	43
4.1 Efeito dos bufadienolidos sobre a via de sinalização MEK1/2-ERK1/2	44
4.2 Efeito dos bufadienolidos sobre a viabilidade celular	45
4.3 Avaliação da via Src-MEK1/2-ERK1/2 na estimulação da proliferação e viabilidade celular por marinobafagina	46
4.4 Efeito de telocinobafagina sobre o estagiamento do ciclo celular e apoptose	47
4.5 Efeito da telocinobafagina sobre a necrose celular	49
4.6 Avaliação da associação entre telocinobafagina e marinobafagina sobre a proliferação celular	50
4.7 Avaliação da mediação do Ca <sup>2+</sup> intracelular sobre a morte celular induzida por TCB	51
4.8 Avaliação do efeito do tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina	52
4.9 Avaliação da via Src-MEK1/2-ERK1/2 na morte celular induzida por telocinobafagina	53
4.10 Avaliação das vias p38, JNK1/2, PKG2 e PI3K-Akt na morte celular induzida por telocinobafagina	55
4.11 Efeito do tratamento com telocinobafagina sobre a via GSK3- $\beta$	56
<b>5. Discussão</b>	59
5.1 Efeitos dos bufadienolidos sobre o número de células	60
5.2 Ativação da via da ERK1/2	61
5.3 Efeitos dos bufadienolidos sobre a morte celular	62
5.4 Envolvimento do cálcio intracelular	63
5.5 Localização na membrana e cascata de sinalização	64

5.5	Bufadienolidos e seletividade funcional	67
<b>6.</b>	<b>Referências</b>	68
<b>7.</b>	<b>Anexos</b>	91
7.1	Anexo I (Artigo: Arnaud-Batista FJ, Costa GT, Oliveira IM, Costa PP, Santos CF, Fonteles MC, Uchôa DE, Silveira ER, Cardi BA, Carvalho KM, <b>AMARAL LS</b> , Pôças ES, Quintas LEM, Noël F, Nascimento NR. Natriuretic effect of bufalin in isolated rat kidneys involves activation of the Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase-Src kinase pathway. <b>Am J Physiol Renal Physiol.</b> 302(8):F959-66, 2012.	92
7.2	Anexo II (Artigo: Lucas TF, <b>AMARAL LS</b> , Porto CS, Quintas LEM. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase α1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells. <b>Reproduction.</b> 144(6):737-45, 2012.	100

## ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	hormônio adrenocorticotrópico
<b>AKT</b>	proteína cinase serina/treonina codificada pelo gene AKT
<b>APT</b>	Teste de Próton Anexado
<b>ASK1</b>	cinase 1 regulada por sinal de apoptose
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>BAPTA</b>	ácido 1,2-bis(2-aminofenóxi)-etano-N,N,N',N'-tetraacético
<b>BFL</b>	bufalina
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>ECL</b>	amplificador de sinal quimioluminescente
<b>ECT</b>	esteróide cardiotônico
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGFR</b>	receptor do fator de crescimento epidérmico
<b>EGTA</b>	ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo)tetra-acético
<b>epm</b>	erro padrão da média
<b>ERK</b>	cinase regulada por sinal extracelular
<b>FAK</b>	cinase de adesão focal
<b>FRET</b>	Análise de Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência
<b>GDP</b>	difosfato de guanosina
<b>GPCR</b>	receptor acoplado a proteína G
<b>Grb2</b>	proteína 2 ligada ao fator de crescimento
<b>GSK-3</b>	glicogênio sintase cinase 3
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>HBSS</b>	solução salina balanceada de Hank
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<b>HMQC</b>	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
<b>IC</b>	insuficiência cardíaca
<b>IP</b>	iodeto de propídeo
<b>IP3</b>	inositol 1,4,5-trifosfato
<b>JNK</b>	cinase c-Jun-N-terminal
<b>LDH</b>	lactato desidrogenase
<b>MAP</b>	proteína ativada por mitógeno
<b>MAPK</b>	proteína cinase ativada por mitógeno
<b>MBG</b>	marinobufagina
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	metil- $\beta$ -ciclodextrina
<b>MEK</b>	proteína cinase cinase ativada por mitógeno
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio
<b>NCX</b>	trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>NF-kb</b>	Fator nuclear- kb
<b>NKA</b>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase
<b>NP-40</b>	nonil fenoxi polietoxietanol
<b>PBS</b>	tampão fosfato salino
<b>PFA</b>	paraformaldeído
<b>Pi</b>	fosfato inorgânico
<b>PI3K</b>	fosfoinositol 3-cinase
<b>PKA</b>	proteína cinase A

<b>PKB</b>	proteína cinase B
<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>PMSF</b>	fenilmetilssulfonil fluoreto
<b>Raf</b>	uma Serina/Treonina cinase de 74kDa
<b>Ras</b>	proteína G monomérica Ras
<b>RIPA</b>	tampão de radioimunoensaio modificado
<b>RMN</b>	ressonância nuclear magnética
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RTKs</b>	receptores de tirosina cinase
<b>RyR</b>	receptor de rianodina
<b>SAP cinases</b>	proteínas cinases ativadas por stress
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase de retículo sarcoendoplasmático
<b>Ser/Thr</b>	Serina/Treonina
<b>Src</b>	tirosina cinase Src
<b>TBS-T</b>	tampão salino composto de Tris + Tween®
<b>TCB</b>	telocinobufagina
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano
<b>Tween®</b>	marca registrada de surfactantes não-iônicos do tipo <i>monolaurato de polioxietileno sorbitano</i>



# Introdução

---

---

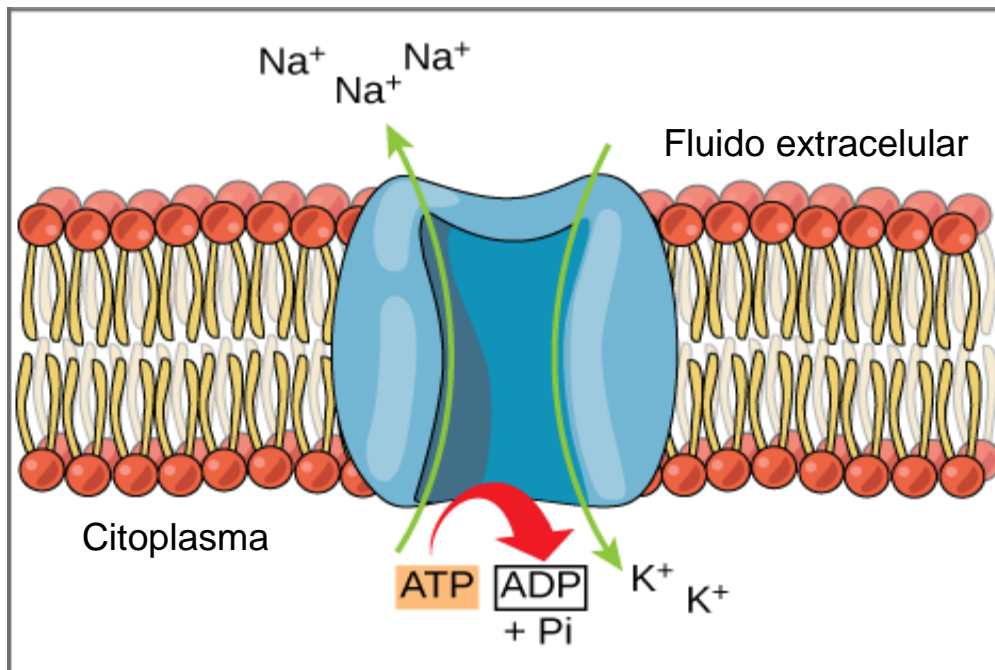
## 1.1. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

### 1.1.1. Aspectos gerais

A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, também chamada de bomba de Na<sup>+</sup>, é uma proteína transmembranar heteromérica localizada na membrana plasmática de células eucarióticas, tendo participação fundamental em inúmeros processos fisiológicos.

O primeiro a descrever a extrusão celular de íons Na<sup>+</sup> acompanhada do influxo de íons K<sup>+</sup>, foi Dean, em 1941 (DEAN et AL, 1941). Na época, ele atribuiu este fenômeno à existência de uma “Bomba de Na<sup>+</sup>” localizada na membrana celular. Alguns anos depois, em 1957, J. C. Skou, descreveu a existência de uma proteína de membrana celular com propriedades catalíticas, capaz de promover o transporte de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> contra seus gradientes de concentração, utilizando a energia derivada da hidrólise de ATP, e a denominou Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Desde então, ela tem sido amplamente estudada. Goldin, em 1977, purificou esta enzima a partir da medula renal de mamíferos e a reincorporou numa membrana lipídica artificial, reproduzindo assim o transporte de Na<sup>+</sup> e de K<sup>+</sup> na presença de ATP. Em seguida, diferentes grupos demonstraram a distribuição ubiqüitária da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, como uma proteína constituinte de todas as células eucarióticas, nas diferentes espécies animais (SHULL et al, 1986; SWEADNER, 1989; SHAMRAJ e LINGREL, 1994). Atualmente sabe-se que a bomba de Na<sup>+</sup> (Figura 1) é uma proteína integral de membrana, que é essencial para o funcionamento normal de todas as células dos mamíferos. Esta enzima promove ativamente o efluxo de 3 íons Na<sup>+</sup> e o influxo de 2 íons K<sup>+</sup> às custas da hidrólise de uma molécula de ATP (GLYNN, 1993; KAPLAN, 2002).

A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pertence à família das ATPases do tipo P, que são enzimas cujo transporte de íons através de membranas celulares envolve alterações conformacionais associadas a um ciclo catalítico reversível de fosforilação e desfosforilação de um resíduo aspartato. Membros dessa família são fundamentais para a manutenção da homeostasia celular, uma vez que são responsáveis pelo balanço osmótico e composição iônica intracelular (DONNET et al, 2001; APELL, 2003).



**Figura 1.** Representação esquemática da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inserida na membrana plasmática (Adaptado de WILLIAMS, 2014).

Esse transporte é de grande importância já que consome cerca de 40-60% do ATP cerebral para manter o gradiente eletroquímico necessário à excitabilidade neuronal. Como transdutora de energia, ela controla outras funções celulares essenciais como o equilíbrio osmótico regulando o volume celular, é indiretamente responsável por processos de transporte acoplados ao gradiente de  $\text{Na}^+$  (contra-transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$ , co-transporte de ânions como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , substratos energéticos como a glicose, e diversos neurotransmissores), além de desenvolver papel fundamental no transporte transepitelial, como, por exemplo, na reabsorção tubular renal de  $\text{Na}^+$  e água (ROBINSON e FLASHNER, 1979; GLYNN, 1985; BLAUSTEIN, 1993; BLANCO e MERCER, 1998).

### 1.1.2. Estrutura

Em relação à estrutura, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é um enzima formada por pelo menos duas subunidades polipeptídicas principais ( $\alpha$  e  $\beta$ ), associadas de modo não-covalente, presentes nas células em proporções equimolares e formando complexos  $\alpha$ - $\beta$  funcionais em diferentes tecidos e incorporadas no interior da

bicamada lipídica (SKOU e ESMANN, 1992). Desde a década de 1980 é conhecida a existência de uma terceira subunidade regulatória (da família FXYD, denominada  $\gamma$ ), a qual está presente, predominantemente, no tecido renal (REEVES et al, 1980; THERIEN et al, 1997; LOPINA, 2001; PU et al, 2002). A representação esquemática da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é mostrada na Figura 2.

A subunidade catalítica  $\alpha$  possui massa molecular de aproximadamente 112 kDa, com cerca de 1012 aminoácidos e 10 segmentos transmembranares. Ela apresenta os principais sítios de ligação da enzima: para os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ , fatores modulatórios (cinases, proteínas estruturais, etc.) e, de especial importância para esta tese, os esteroides cardiotônicos (ECTs) (Figura 2; VASILETS e SCHWARZ, 1993; KAPLAN, 2002; NESHER et al, 2007). Esta subunidade é composta por três domínios citoplasmáticos: Domínio N (sítio de ligação para os nucleotídeos), domínio P (sítio de fosforilação) e domínio A (sítio catalítico associado ao transporte de íons) (CORNELIUS e MAHMMOUD, 2003). Foram descritas quatro isoformas da subunidade  $\alpha$ , denominadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ , distribuídas em diferentes proporções nos tecidos, cada qual adota uma disposição peculiar para responder a estímulos (BLANCO e MERCER, 1998; THERIEN e BLOSTEIN, 2000).

A isoforma  $\alpha_1$  é conhecida como isoforma *housekeeping*, apresentando distribuição ubíqua, estando presente em todos os tipos de células de mamíferos. Ela tem sua atividade e/ou expressão pouco influenciadas por alterações ambientais, sendo a única isoforma encontrada nos rins (BLANCO e MERCER, 1998). Essa isoforma, associada preferencialmente à isoforma  $\beta_1$ , forma o complexo  $\alpha_1\beta_1$  (TOKHTAEVA et al, 2012), encontrado em quase todos os tecidos, e que parece ser a forma mais abundante da enzima (SWEADNER, 1989).

A isoforma  $\alpha_2$  apresenta uma distribuição mais restrita, encontrando-se expressa na musculatura lisa e estriada (ZHANG et al, 2005), sistema nervoso central (preferencialmente nas células da glia) (MCGRAIL et al, 1991), adipócitos, cartilagem e osso (MOBASHERI et al, 2000). Tem sua expressão influenciada por várias condições fisiopatológicas.

A isoforma  $\alpha 3$  é localizada no tecido nervoso (neurônios, sendo usada como marcador neuronal) e tecido cardíaco (HABIBA et al, 2000). A isoforma  $\alpha 4$  é expressa especificamente na porção média da cauda de espermatozoides, e sua atividade está envolvida com a motilidade espermática (BLANCO et al, 2000; KOÇAK-TOKER et al, 2002; HLIVKO et al, 2006).

Uma característica especial dessas isoformas é que  $\alpha 1$  apresenta baixa afinidade para os ECTs em espécies como o rato e o camundongo, enquanto que as demais ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ ) exibem alta afinidade (BLANCO e MERCER, 1998). Isso não ocorre em outros mamíferos, incluindo o homem, já que todas as isoformas apresentam alta afinidade.

A subunidade  $\beta$ , conhecida como subunidade regulatória, é um polipeptídeo transmembranar do tipo II que possui três sítios de glicosilação; apresenta massa molecular entre 40 e 60 kDa, dependendo do grau de glicosilação nos diferentes tecidos, e contém em torno de 300 aminoácidos. Ela é essencial para a atividade normal da enzima, sendo co-responsável pela modulação da sensibilidade da enzima ao  $\text{Na}^+$  e ao  $\text{K}^+$  (BLANCO e MERCER 1998). A subunidade  $\beta$  apresenta estrutura básica composta de uma região citoplasmática N-terminal, um segmento transmembranar e um grande domínio extracelular, com três pontes dissulfeto (BLANCO e MERCER, 2000). Essa subunidade parece atuar favorecendo a correta inserção do complexo  $\alpha\beta$  na membrana plasmática, além de aumentar a resistência contra proteólise e degradação celular das subunidades  $\alpha$  recém-sintetizadas (HASLER et al, 2001). Além disso, no sistema nervoso, a subunidade  $\beta$  parece estar relacionada com a adesão celular (GLOOR et al, 1990).

Para a subunidade  $\beta$ , foram descritas até o momento quatro isoformas ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta_m$ ), permitindo um grande número de combinações de complexo  $\alpha\beta$ , apresentando distribuição tecidual específica (GEERING, 2005; KAPLAN, 2002). A expressão de  $\beta 1$ , assim como  $\alpha 1$ , também é ubíqua. A isoforma  $\beta 2$  é expressa em músculo esquelético, glândula pineal, tecido nervoso e tecido cardíaco. A isoforma  $\beta 3$  é expressa no cérebro, cartilagem, eritrócitos e no tecido pulmonar (MÜLLER-EHMSEN et al, 2001). A quarta isoforma é expressa principalmente em músculo esquelético e em menor extensão em músculo

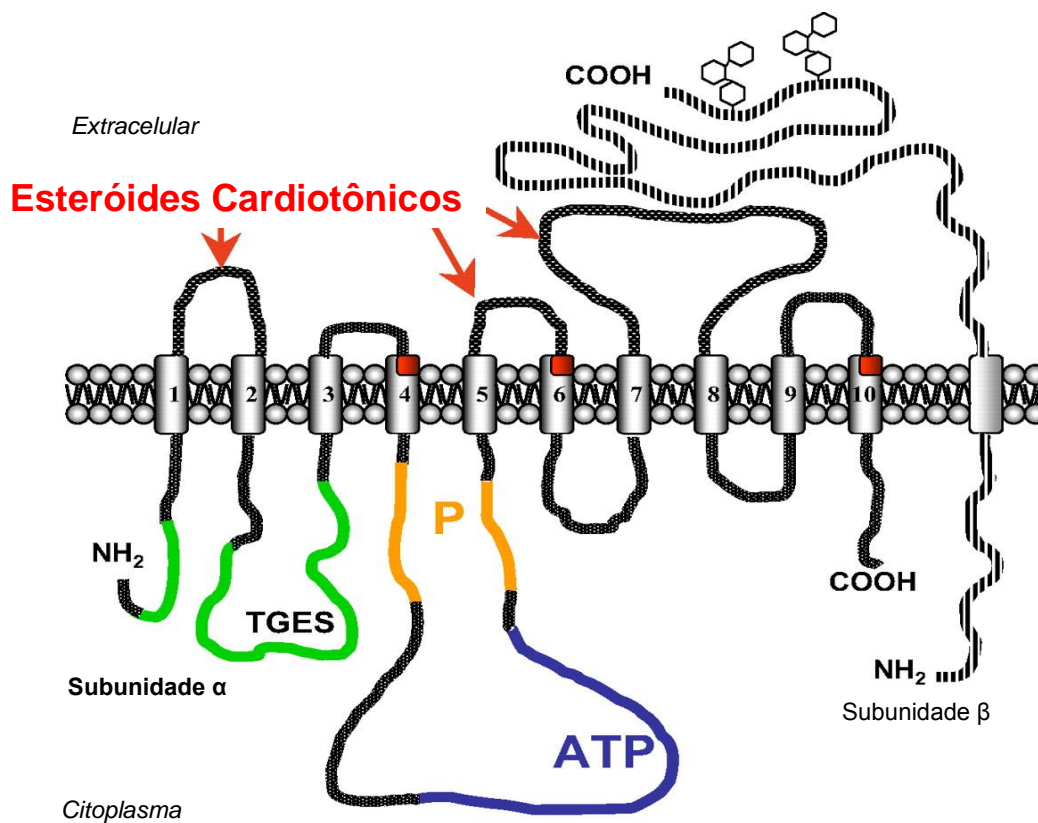
cardíaco, e devido à sua localização, ela foi denominada isoforma  $\beta_m$  (PESTOVA et al, 1999).

Embora as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  sejam essenciais para o funcionamento da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, a transcrição de seus respectivos genes ocorre de forma independente. Uma vez sintetizadas, estas subunidades sofrem glicosilação no aparelho de Golgi e o complexo maduro se insere na membrana plasmática sob a influência de fatores ainda desconhecidos. A inserção da enzima na membrana é orientada de modo que o sítio de fixação de ATP fique localizado do lado citoplasmático e o sítio de fixação dos ECTs no lado extracelular (HASLER et al, 2001).

A terceira subunidade descrita é a  $\gamma$ , um pequeno peptídeo com cerca de 7 kDa de massa molecular. Inicialmente encontrado apenas em associação com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase renal, apresenta-se ligado ao complexo proteico (REEVES et al, 1980; MERCER et al, 1993). Sabe-se que o peptídeo  $\gamma$  faz parte de uma família de proteínas denominadas FXD. Esta subunidade parece ter uma função regulatória sobre a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, adaptando as propriedades cinéticas do transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  de acordo com as necessidades celulares (GEERING, 2005). A adição da subunidade  $\gamma$  na enzima altera sua afinidade por cátions monovalentes, indicando que essa subunidade tem uma função moduladora sobre a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (ARYSTARKHOVA et al, 1999). Entretanto, sua presença não é essencial para a função enzimática (THERIEN et al, 1997; LOPINA, 2001).

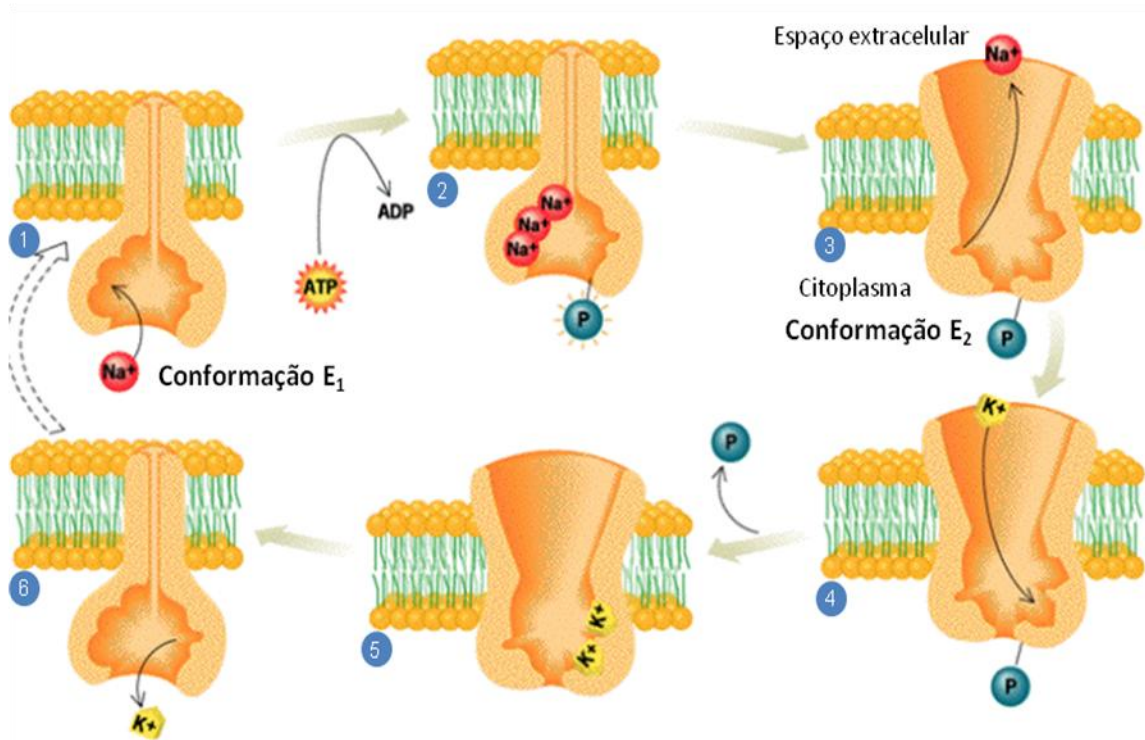
### **1.1.3. Ciclo enzimático**

No modelo proposto por Albers e Post, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase existiria sob dois estados conformacionais distintos, dependentes de fosforilação, que aparecem sucessiva e alternadamente no curso de seu ciclo reacional: o estado conformacional E2, com alta afinidade por  $\text{K}^+$  e baixa afinidade por  $\text{Na}^+$ , e o estado conformacional E1, com alta afinidade por  $\text{Na}^+$  e baixa afinidade por  $\text{K}^+$  (GLYNN, 1993).



**Figura 2.** Ilustração esquemática das subunidades da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. As setas e quadrados em vermelho indicam os sítios de ligação dos esteroides cardiotônicos, a região azul mostra o sítio de ligação para o ATP, a região amarela mostra o domínio de fosforilação e a região verde mostra o domínio atuador que é responsável pela etapa de desfosforilação (adaptada de BAGROV et al, 2009).

Inicialmente, o  $\text{K}^+$  é liberado na porção intracelular, acompanhado de mudança conformacional de E2 para E1 (Figura 3). Ocorre a ligação de três íons  $\text{Na}^+$  na porção intracelular da enzima, em um sítio de alta afinidade para o  $\text{Na}^+$ . Nesse momento, ocorre a ligação do ATP em seu sítio de ligação e consequente fosforilação, aliada a mudança conformacional enzimática. Os sítios de ligação de  $\text{Na}^+$  ficam expostos ao meio extracelular e são liberados. Após o bombeamento dos íons  $\text{Na}^+$ , há mudança do estado conformacional E1 para E2. Dois íons  $\text{K}^+$  se ligam em um sítio específico na porção extracelular e esta ligação transfere o grupo fosfato liberado para a água (formando o fosfato inorgânico). A enzima é desfosforilada, liberando o íon  $\text{K}^+$  na porção intracelular, dando reinício ao ciclo (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al, 2003; DEVLIN, 2007). O mecanismo de ação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase está esquematizado na figura 3.



**Figura 3.** Ciclo catalítico proposto para a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A conformação E2-P (3-4) teria maior afinidade para os esteroides cardiotônicos. Notar que o ATP liga-se a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase para ser transformado em ADP (1-2) (Adaptado de DEVLIN, 2007).

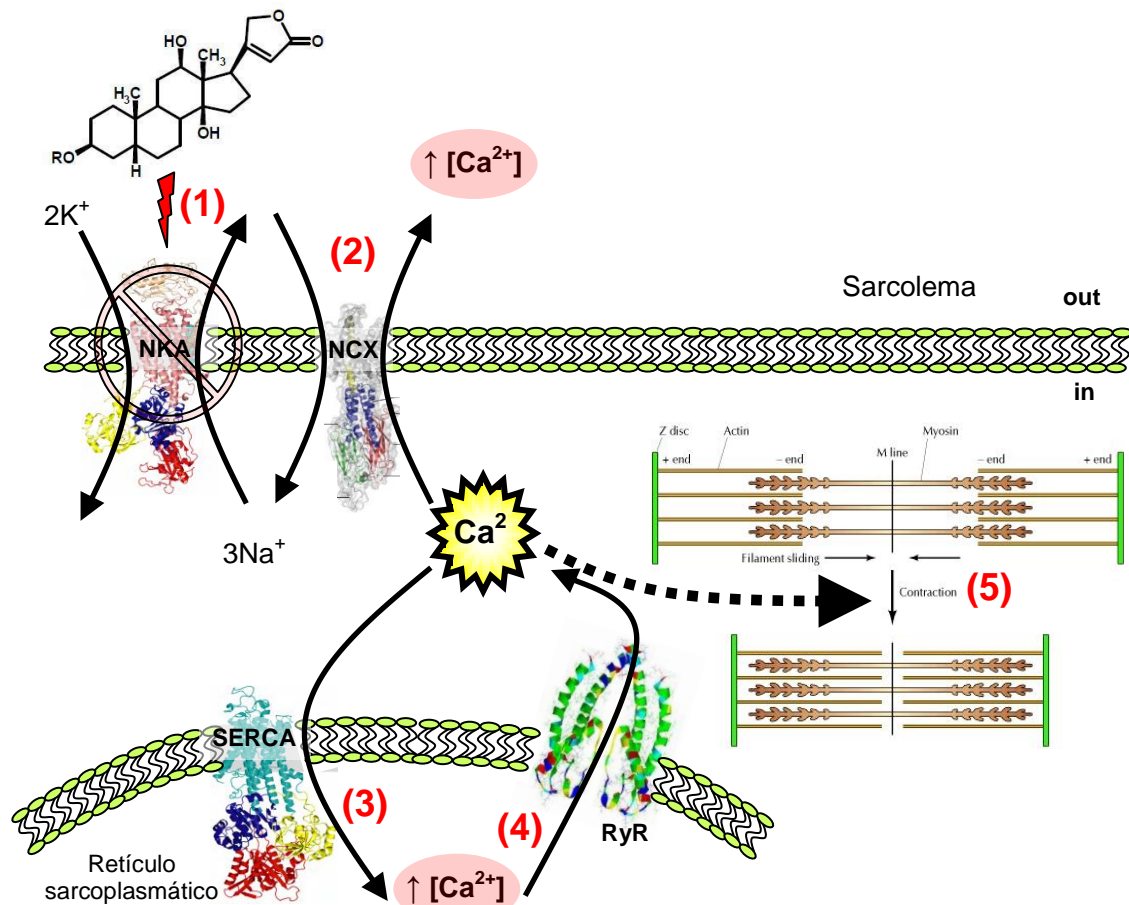
## 1.2. Esteroides Cardiotônicos

### 1.2.1. Ligantes Específicos da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Os ECTs são classicamente descritos como inibidores específicos da função bombadora da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Extratos de plantas do gênero *Digitalis* (por exemplo, *D. purpurea* e *D. lanata*), conhecida como dedaleira, já eram utilizados por muitas décadas, contra problemas decorrentes da insuficiência cardíaca, devido ao seu efeito diurético e inotrópico positivo e seus efeitos benéficos na hemodinâmica (BLAUSTEIN, 1993). Apesar disso, o mecanismo de ação desses ligantes foi sugerido pela primeira vez em 1963, por REPKE e PORTIUS, que, pela primeira vez, descreveram a enzima como receptor dos ECTs.



Após a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, há um aumento regional da concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular, reduzindo o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e estimulando a função reversa do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que está co-localizado com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na membrana plasmática. Esta etapa aumenta a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando o conteúdo deste íon disponível para a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ , via receptores de rianodina. Como resultado final, há uma maior disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol para interagir com as proteínas contráteis, aumentando a velocidade e extensão de encurtamento do sarcômero na sístole (Figura 4). Esse efeito seria responsável pela ação inotrópica positiva dos ECTs (AKERA e BRODY, 1976; SHATTOCK et al, 2015).



**Figura 4.** Inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) pelo esteróide cardiotônico digoxina. A digoxina inibe a atividade da enzima (1), levando ao aumento nas concentrações intracelulares de  $\text{Na}^+$ , resultando em redução da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (2) levando ao aumento nas concentrações reticulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (via  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA) (3) e maior mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo receptor de rianodina (RyR) (4), culminando no efeito inotrópico positivo em cardiomiócitos (5) (QUINTAS, 2012).

Os ECTs se ligam à forma fosforilada da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, de alta afinidade para o K<sup>+</sup> (conformação E2-P), reprimindo a transição da conformação E2 para E1. Assim, a enzima fica bloqueada para a extrusão de Na<sup>+</sup> e o influxo de K<sup>+</sup> (FORBUSH, 1983).

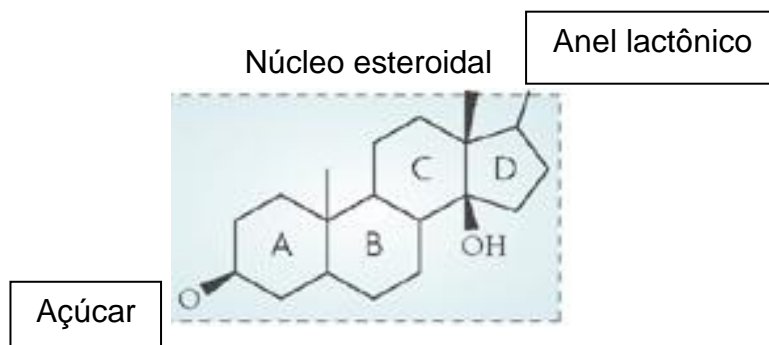
### 1.2.2. Classes, Estrutura e Origem

Os ECTs compreendem uma grande família de compostos de origem natural que apresentam a capacidade de interagir especificamente com a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Estes compostos são caracterizados estruturalmente pela presença de um núcleo esteroidal, ao qual se apresenta ligado um anel lactônico insaturado na posição C17 $\beta$  (acima do plano da molécula), podendo ou não apresentar um ou mais açúcares ligados no carbono C3 $\beta$  do núcleo ciclopentano-peridrofenantreno. Nas junções do núcleo peridrofenantreno, a estereoquímica obedece às orientações A/B do tipo *cis*, B/C do tipo *trans* e C/D do tipo *cis*, sendo este último caráter conformacional específico dos ECTs, e importante para sua interação com a enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (SCHÖNFELD e cols., 1985). De acordo com o número de átomos do anel lactônico, os ECTs são classificados como cardenolidos (ciclo monoinsaturado butirolactona, 5 membros) ou bufadienolidos (ciclo duplamente insaturado  $\alpha$ -pirona, 6 membros).


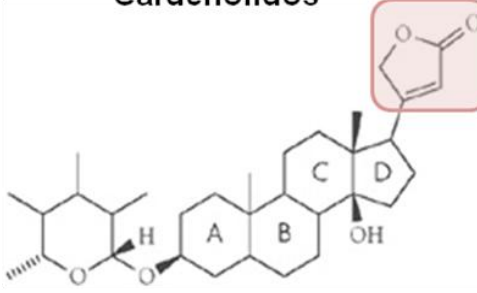

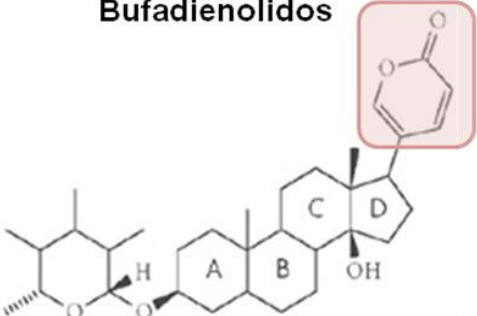
Os cardenolidos são encontrados, sobretudo, em vegetais da classe Magnoliopsida (também conhecida como Angiospermae), tendo o gênero *Digitalis* como principal representante. Os compostos obtidos a partir desse gênero são também chamados de digitálicos e como exemplos podemos citar a digitoxina, obtida a partir da planta *D. purpurea* L. e da *D. lanata* Ehrh, e a digoxina, obtida a partir da *D. lanata* Ehrh. Em doses terapêuticas, os ECTs provocam um aumento da força de contração do coração (inotropismo positivo) e redução da frequência (cronotropismo negativo) e, por isso, são utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca (JUILLIÈRE e SELTON-SUTY, 2010).

A ouabaína é também conhecida como estrofantidina G, visto que é extraída das sementes do *Strophantus gratus* Baill. Ela é um ECT conhecido há mais de dois séculos por seus efeitos cardiotônicos, porém atualmente é apenas utilizada na pesquisa básica devido à baixa biodisponibilidade por via

oral resultante da sua maior hidrofiliçidade que, por outro lado, facilita seu uso em experimentos *in vitro* (RATES e BRIDI, 2004). A ouabaína também pode ser obtida da casca do tronco da *Acokanthera ouabaio* Lewin. Sua estrutura é representada na Figura 5.



### Esteroides Cardiotônicos

 <p><i>Digitalis purpurea</i></p>	<p><b>Cardenolidos</b></p> 
 <p><i>Rhinella schneideri</i></p>	<p><b>Bufadienolidos</b></p> 

**Figura 5.** Representação química da estrutura dos esteroides cardiotônicos. Cada molécula desta família, em geral, é composta por três grupos estruturais distintos: um núcleo esteroidal, um anel lactônico e uma molécula de açúcar, que pode ou não estar presente. A lactona define a classe funcional de cada composto. Os cardenolidos contêm um anel de cinco membros e são encontrados principalmente em plantas,

como por exemplo, a *Digitalis purpurea*, enquanto os bufadienolidos contêm um anel de seis membros e são normalmente encontrados em anfíbios, como o sapo *Rhinella schneideri* (adaptado de PRASSAS e DIAMANDIS, 2008).

Os bufadienolidos são encontrados principalmente em glândulas paratóides de anfíbios da família Bufonidae, que compreende os gêneros *Bufo*, *Rhinela*, *Atelopus*, *Ansonia*, *Lephtophryne* e *Pedostipes* (HAMLIN et al, 1991; DALY et al, 2004). Além dos anfíbios, serpentes da espécie *Rhabdophis tigrinus* podem apresentar bufadienolidos acumulados em suas glândulas nuchais, devido a sua dieta baseada em sapos (HUTCHINSON et al, 2007). Esses compostos também são encontrados em plantas, sendo importantes produtos da medicina tradicional de países africanos e asiáticos, apresentando efeitos terapêuticos apesar de estarem, algumas vezes, relacionados com efeitos tóxicos dos seus usuários. Dentre as famílias de vegetais onde são encontrados bufadienolidos, podemos destacar: Crassulaceae, Hyacinthaceae, Ranunculaceae, Iridaceae, Melianthaceae e Santalaceae. A raiz da planta medicinal *Bersama abyssinica* (Melianthaceae) contém bufadienolidos com ação bactericida contra *Bacillus subtilis* (STEYN e HEERDEN, 1998; WU et al, 2006). Além disso, a planta tóxica *Urignea lydenburgensis* (Hyacinthaceae), que também contém bufadienolidos, é utilizada para o tratamento de asma e coceiras na pele (STEYN e HEERDEN, 1998; CROUCH et al, 2006).

Como alguns exemplos de bufadienolidos, temos a bufalina, marinobufagina e telocinobufagina (Figura 6). Enquanto a digoxina tem sido utilizada por mais de 200 anos para a insuficiência cardíaca congestiva, a bufalina e a marinobufagina representam os principais componentes de um preparado da medicina tradicional chinesa, chamado Chan'su, obtido a partir do veneno seco de sapos da família Bufonidae e utilizado ainda hoje no combate a afecções cardíacas, tumores, como agente diurético, e no alívio de febres e dores (STEYN e HEERDEN, 1998; NESHER et al, 2007). É importante mencionar que, do ponto de vista farmacológico, a classe dos bufadienolidos permanece pouco explorada a despeito de sua multiplicidade estrutural e abundância na natureza.

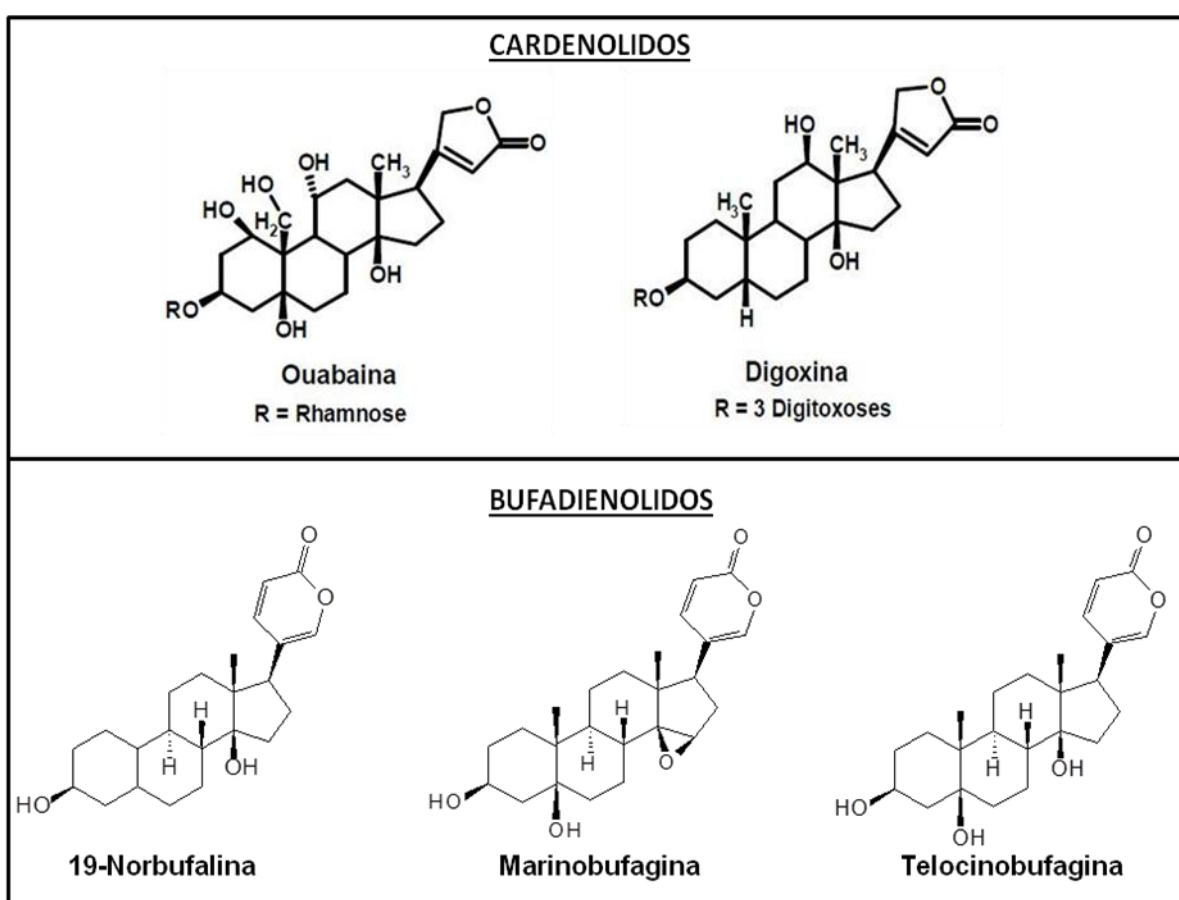
### 1.2.3. Esteroides Cardiotônicos Endógenos

Apesar dos ECTs, particularmente a digoxina, serem empregados há várias décadas na terapia da insuficiência cardíaca e fibrilação atrial e terem sido desde então considerados somente como fármacos, estudos recentes revelaram a presença de ETCs endógenos em mamíferos, tanto cardenolidos (como a ouabaína e a própria digoxina) como bufadienolidos (como a marinobufagina e a telocinobufagina) (SCHONER e SCHEINER-BOBIS, 2007; NESHER et al, 2007; BAGROV et al, 2009). A produção e secreção desses ECTs endógenos são reguladas por vários estímulos fisiológicos incluindo o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e a angiotensina II (LAREDO et al, 1995, 1997). O córtex adrenal parece o principal local de biossíntese desses ECTs. Existe uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas desses hormônios (particularmente a ouabaína) e a pressão arterial e atividade física.

Fisiologicamente, esses esteroides circulam no plasma em níveis baixos (sub-nanomolares), podendo alcançar concentrações um pouco mais elevadas (nanomolares) em condições patológicas como hipertensão e insuficiência cardíaca (FERRANDI et al, 2005).

Inicialmente, Hamlyn e colaboradores (1982) demonstraram que amostras de plasma humano promoviam inibição *in vitro* da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de rim, sugerindo a existência de um fator chamado de “endogenous digitalis-like substance”. Mais tarde, foi visto que este fator tinha grande semelhança à ouabaína e seria sintetizado pelo córtex adrenal, sendo capaz de inibir a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, mimetizando os efeitos dos ECTs (HAMLYN et al, 1991). É relevante ressaltar que essa substância é encontrada em concentrações elevadas no plasma de pacientes hipertensos. Além do plasma humano, a ouabaína ou um isômero também já foi encontrado em glândulas adrenais bovinas (SCHNEIDER et al, 1998) e hipotálamo bovino (KAWAMURA et al, 1999). A glândula adrenal seria o lugar de síntese e/ou estocagem de ouabaína (HAMLYN et al, 1991). O ACTH, agonistas do adrenoceptor  $\alpha_1$  e angiotensina II estimulam a liberação de ouabaína das células adrenocorticais (LAREDO et al, 1995, 1997, 2000).

Em estudos posteriores, outras substâncias que inibem a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e que interagem com anticorpos contra digitálicos foram encontradas no plasma de mamíferos. Surgiram evidências que células de mamíferos também sintetizam outro cardenolido, a digoxina. Uma substância indistinguível da digoxina foi isolada de urina humana por Goto e colaboradores, em 1990. Ela foi encontrada no plasma, urina, e glândulas adrenais (GOTO e YAMADA, 1998; QAZZAZ et al, 1996). Evidências sugerem, entretanto, que a digoxina seria principalmente secretada no sistema nervoso central pela hipófise (BAGROV et al, 2009).



**Figura 6.** Estruturas dos principais cardenolidos e bufadienolidos descobertos em humanos.

A marinobufagina, que está presente na secreção de anfíbios, foi identificada na urina de pacientes com infarto do miocárdio (BAGROV et al, 1998). Também neste caso, o córtex adrenal seria o órgão produtor (DMITRIEVA et al, 2000). Aparentemente, a rota sintética estaria relacionada a

via ácida, alternativa, de produção de ácidos biliares, através da CYP27A1 (FEDOROVA et al, 2015). A telocinobufagina, a forma reduzida da marinobufagina, foi também purificada do plasma humano. KOMIYAMA e colaboradores (2005) mostraram que a concentração de telocinobufagina no plasma humano era maior do que a de marinobufagina, e consideraram que o potencial fisiológico ou patológico daquele seria mais proeminente.

Do ponto de vista fisiopatológico, também foi demonstrado haver correlação positiva entre as concentrações plasmáticas destes ECTs e hipertrofia/insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hiperaldoosteronismo (BAGROV et al, 2009). Postula-se que esses esteroides estejam no cerne da patogênese de parte significativa de casos de hipertensão arterial primária (SCHONER e SCHEINER-BOBIS, 2007). Mais recentemente, tentou-se associar alterações de ECTs endógenos com a prevenção do crescimento tumoral (WEIDEMANN, 2005).

Entretanto, a função endógena desses esteroides ainda é pouco conhecida. A existência de diferentes compostos sugere que eles tenham papéis distintos no organismo (RIGANTI et al, 2011). Possivelmente, a existência de diversos ECTs proporciona algum tipo de cooperação em funções fisiológicas e patológicas. Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam atuar sobre esse sistema torna-se atraente. Ademais, desvendar os mecanismos de ação desses compostos é de franca importância para o entendimento dos seus papéis biológicos.

### **1.3. A $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase como transdutora de sinal**

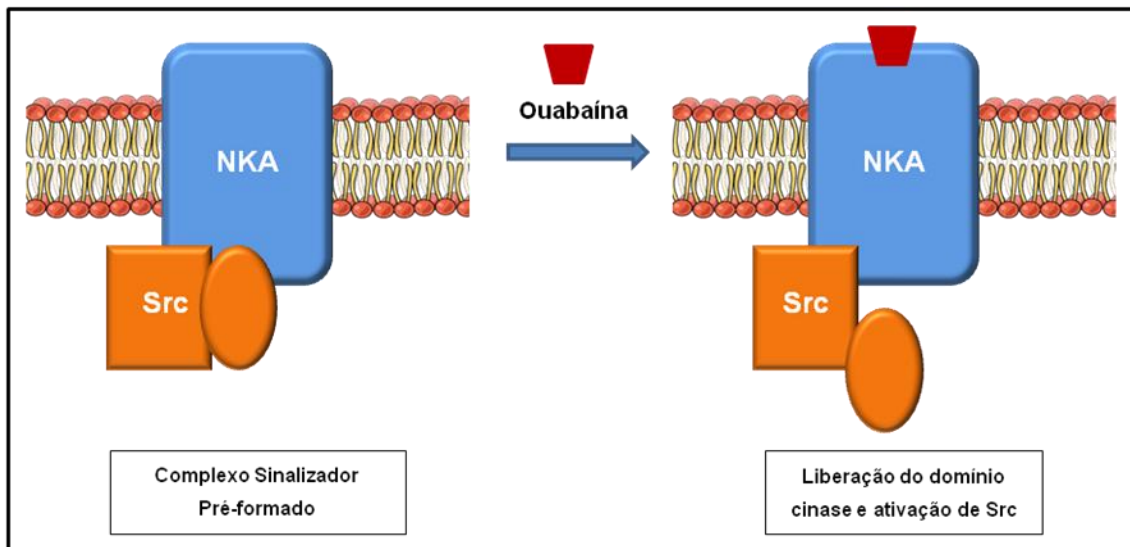
Além de realizar o transporte de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  ativamente através das membranas celulares, há alguns anos descobriu-se que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, considerada alvo exclusivo dos ECTs, também funciona como transdutora de sinal através de interações proteína-proteína, promovendo ativação de cascatas de proteínas cinases diferentes, assim como a produção de segundos mensageiros (AIZMAN et al, 2001; XIE, 2001; BARWE et al, 2005). Estudos mostram que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase funciona como um importante transdutor de sinais, interagindo com proteínas cinases, fosfatases, transportadores de membrana e outras proteínas celulares (LI e XIE, 2009).

Essa sinalização intracelular é ativada pela ligação de ECTs com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase utilizando a tirosina cinase Src como transdutora e parece ser independente de variações das concentrações iônicas. A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase interage com Src, EGFR e outras proteínas para transmitir os sinais dos ECTs para o compartimento intracelular. Portanto, os ECTs funcionariam tanto como inibidores da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica quanto agonistas da via  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase/Src/EGFR (LI e XIE, 2009). Por outro lado, a ativação de vias de sinalização com a da Akt/PI3K é independente de Src (Wu et al, 2013).

O modelo melhor caracterizado é aquele em cuja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sinalizadora interage com a proteína citoplasmática tirosina cinase Src, formando um “receptor binário” ativo, que age como um complexo funcional de sinalização. A interação entre  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e Src mantém esta em um estado inativo. A ligação de um ECT, como a ouabaína, ao complexo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase/Src gera mudanças nessa interação liberando o domínio cinase da Src e assim promove a fosforilação de proteínas (Figura 7) (TIAN et al, 2006; LIANG et al, 2007). Estudos que usam inibidores de Src, bem como experimentos com células *knockout* para Src, mostram que o complexo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase/Src pode funcionar como um clássico receptor fisiológico para a fosforilação de proteínas induzidas pelos ECTs.

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, apesar de conter o sítio de ligação para os ECTs, não apresenta atividade intrínseca tirosina cinase. Logo, ela não funciona como um receptor tirosina cinase clássico, convertendo a ligação da ouabaína em aumentos na fosforilação de resíduos tirosina de proteínas. A enzima precisa interagir com Src, formando o complexo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase/Src, para se tornar capaz de converter e amplificar o sinal do ligante promovendo fosforilação de proteínas. Em células em cultura, o receptor de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase/Src reside principalmente em cavéolas (WANG et al, 2004).

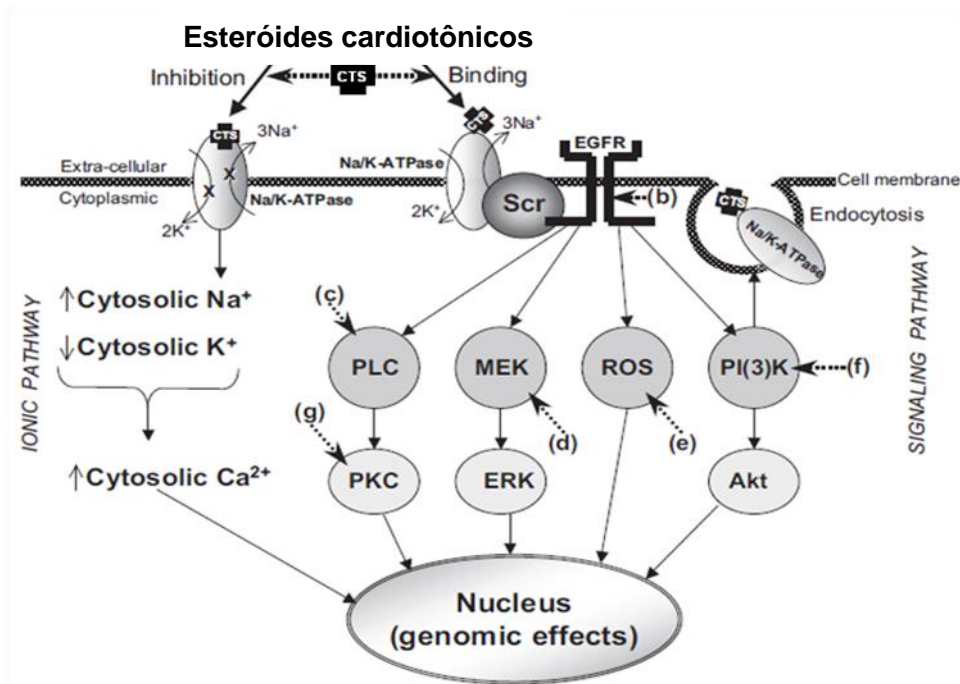




**Figura 7.** Representação esquemática da ativação do complexo sinalizador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase/Src pela ligação da ouabaína. A ligação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase regula a atividade basal de Src. NKA: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

A ouabaína e outros ECTs funcionam como ligantes deste complexo receptor, levando à geração e amplificação de cascatas de sinalização, através do recrutamento e montagem de um signalosoma de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase específico na célula. A ativação da cascata ocorre através da interação da enzima com ECTs, que nesse caso atuam como agonistas, e não inibidores farmacológicos. A interação de um ECT com a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase promove a ativação da proteína tirosina cinase Src, e transativação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), juntamente ao recrutamento de proteínas adaptadoras e Ras. Ras ativada, por sua vez, leva à ativação de diferentes vias de sinalização, como a cascata de cinases Ras/Raf/MEK/ERK (Figura 8) (XIE e ASKARI, 2002; XIE e CAI, 2003), resultando em efeitos diversos, dependendo do tipo celular, como hipertrofia, diferenciação celular, proliferação, apoptose, além de alterações na expressão gênica (WANG et al, 2009; WINNICKA e et al, 2010; RIGANTI et al, 2011).

A maioria dos estudos realizados sobre diferentes vias de sinalização mediadas pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase abrange, sobretudo o cardenolido ouabaína e a isoforma α1 da enzima (SILVA e SOARES-DA-SILVA, 2012). Além disso, já foi visto que linhagens de células expressando a isoforma α2 da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase não seriam capazes de regular Src (Xie et al, 2015).



**Figura 8.** Esquema representativo das vias de sinalização ativadas pelos esteroides cardiotônicos quando interagem com a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. A ligação de um esteroide cardiotônico na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, ativa Src, iniciando uma cascata de sinalização envolvendo transativação do EGFR e recrutamento de proteínas adaptadoras, levando a ativação das vias Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT, PKC e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). (Retirado de BAGROV et al, 2009).

A ativação da via PI3K/AKT desempenha um importante papel na indução de hipertrofia, proliferação e/ou inibição de apoptose (LIU et al, 2007; KHUNDMIRI et al, 2007). Ademais, outros efetores também podem ser estimulados, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (ROS; LIU et al, 2000; TIAN et al, 2001)

É importante ressaltar que os efeitos dos ECTs sobre a transdução de sinais ocorrem em concentrações endógenas (subnanomolares) de ouabaína, que não causariam inibição significativa da atividade bombeadora da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (XIE e ASKARI, 2002; PIERRE et al, 2006).

#### 1.4. Duas populações de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Com essa nova função estabelecida para a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, surgiu a hipótese de que existiriam pelo menos duas populações diferentes de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases coexistindo em equilíbrio dinâmico: uma na qual a enzima funcionaria como a clássica bomba iônica (*pumping pumps*) e outra cuja tarefa de ATPase

estaria relacionada à atividade de transdução de sinal (*nonpumping pumps*), funcionando como receptor para os ECTs e promovendo a regulação de diversas funções, como proliferação, hipertrofia e hiperplasia celular, apoptose, contração cardíaca, etc., que dependeriam da maquinaria (módulos de sinalização) de cada tipo celular, além de um papel estrutural – ou *scaffolding* (Liang et al, 2007).

Estudos mostraram que nem toda  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase presente na superfície da célula estaria envolvida com a sinalização celular. Apenas uma subpopulação da enzima, associada com a cavéola, responderia à estimulação pelos ECTs, enquanto as que apresentam a função bombeadora de íons estariam localizadas na maior parte da membrana plasmática. As cavéolas são invaginações vesiculares da membrana plasmática contendo a proteína caveolina como principal constituinte e marcador bioquímico (LIU et al, 2003; WANG et al, 2004), formando um domínio específico da membrana celular que é rico em múltiplas proteínas sinalizadoras, colesterol, e glicoesfingolipídeos (HUNTER, 2000; COHEN et al, 2004).

A proteína caveolina funciona como arcabouço para agregar moléculas sinalizadoras na caveola, regular o estado de ativação dessas moléculas, além de potencializar interações e a eficiência do processo de sinalização (PARTON e SIMONS, 2007). Já foi visto que caveolina-1 interage com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, corroborando com a hipótese de que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sinalizadora residiria na caveola (LIU et al, 2004; LIU et al, 2005). De fato, o colesterol é necessário para indução da sinalização mediada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, e a ausência de caveolina-1, através de *knockdown* ou *knockout in vivo*, previnem a estimulação de ERK1/2 induzida pela ouabaína, confirmando um papel da caveola no processo de sinalização. (LIU et al, 2003; WANG et al, 2004; QUINTAS et al, 2010).

### **1.5. Esteroides cardiotônicos e seletividade funcional**

Nos últimos anos, alguns estudos mostraram que determinados ligantes produzem efeitos qualitativos bem diferentes, mesmo que mediados por um único receptor. Esse mecanismo recebeu o nome de Seletividade Funcional, um conceito relativamente novo na Farmacologia, sendo verificado principalmente em estudos realizados com receptores acoplados a proteína G

(GPCR), como os receptores de adrenalina, serotonina e dopamina. (GALANDRIN et al, 2007, URBAN et al, 2007; KENAKIN, 2011).

Desta forma, diferentes ligantes ao interagir com o mesmo receptor poderiam induzir ou favorecer uma determinada conformação do receptor em detrimento de outra, podendo ou não resultar na transdução de sinais intracelulares, ativando diferentes vias de sinalização celular. Ou seja, estando o receptor estabilizado pelo ligante em uma determinada conformação termodinamicamente favorável, múltiplas possibilidades de ativação (ou de inativação) de vias de sinalização seriam esperadas. Assim, diferentes ligantes poderiam atuar como agonistas ou antagonistas atuando no mesmo receptor (URBAN et al, 2007; KENAKIN, 2011). Esse mecanismo se torna bastante interessante para a farmacologia de forma geral, mas, principalmente, para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos, pois surge a possibilidade de selecionar ou produzir novos ligantes que ativam apenas um subconjunto de funções de um único receptor, otimizando assim a ação terapêutica.

O conceito de seletividade funcional pode ser considerado para ligantes da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, uma vez que eles podem atuar classicamente como inibidores do transporte de íons e também ativando diferentes vias de sinalização. De fato, estudos revelaram que alguns ECTs, principalmente o cardenolido ouabaína, apresentam efeitos divergentes, apesar de atuarem no mesmo e único receptor, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Como exemplo, já foi visto que a ouabaína é capaz de atenuar a cardiotoxicidade de outros ECTs como a digoxina e a bufalina, um bufadienolido (NESHER et al, 2010). Além disso, Manunta e colaboradores, em 2000, demonstraram que a ouabaína é capaz de induzir hipertensão arterial em ratos, enquanto o mesmo não ocorre com a digoxina. Além disso, a digoxina inibe o efeito hipertensor da ouabaína.

Com a descoberta da existência de ECTs endógenos, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase seria um importante e intrigante alvo terapêutico, sendo ainda pouco explorado, principalmente no que diz respeito à sinalização celular mediada por esta enzima. Neste contexto, o desenvolvimento e avaliação farmacológica de agentes que possam especificamente agir sobre a função sinalizadora da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sem afetar a função bombeadora, ou vice-versa, ofereceria não apenas a oportunidade singular de novas ferramentas para a investigação da

cascatas de sinalização da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mas também propor novas abordagens para o tratamento de doenças cardiovasculares e oncológicas.

## 1.6. Sinalização Intracelular e Proteínas Cinases

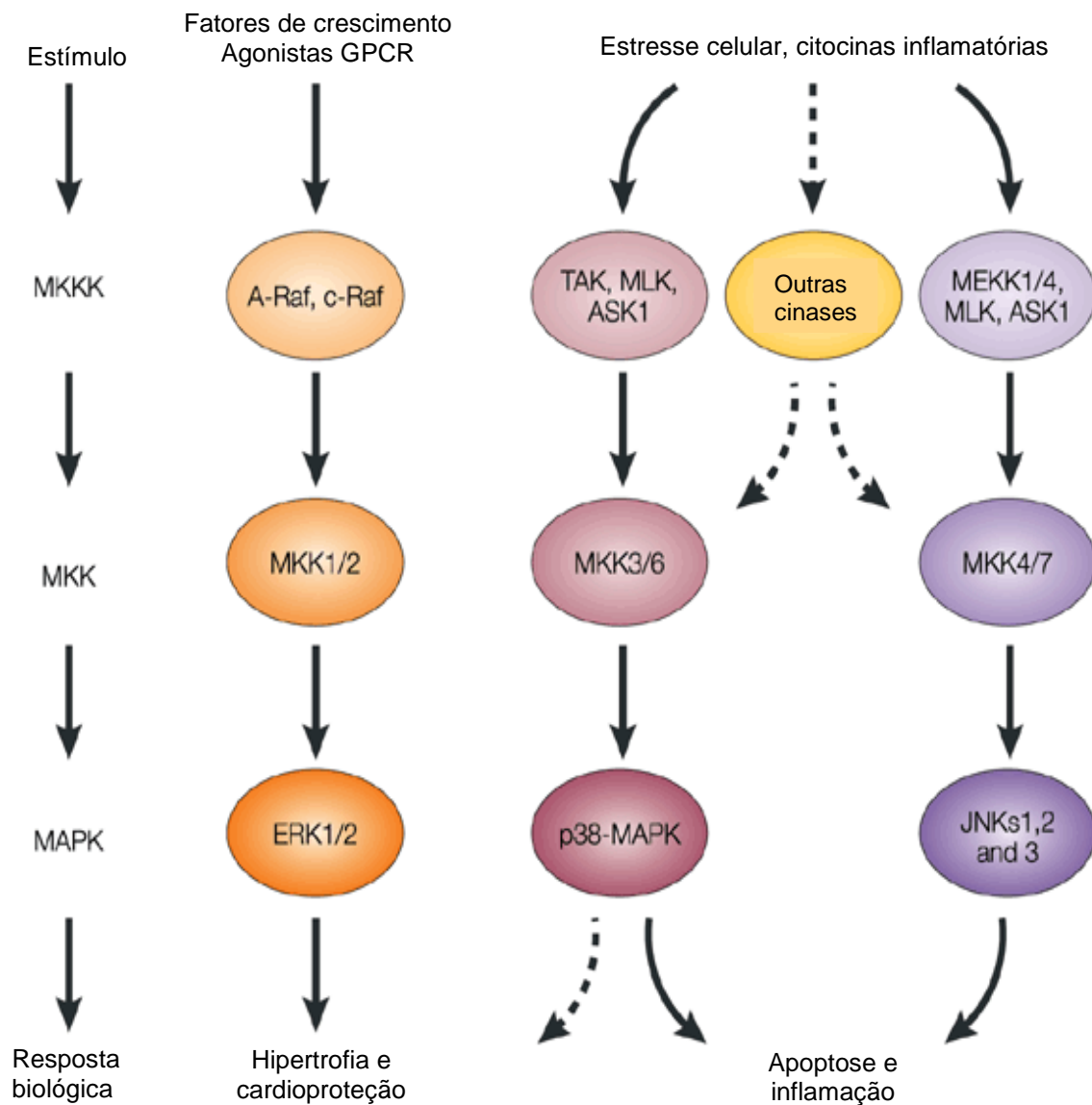
### 1.6.1. Família MAPK

A família das MAPKs (“proteínas cinases ativadas por mitógenos”) consiste de diversas serina/treonina cinases pertencentes a um sistema de fosforilação em cascata, que culmina na ativação de cinases efetoras terminais. Estas cascatas contêm pelo menos três proteínas cinases em série que culminam na ativação de uma MAPK multifuncional (Figura 9). De maneira geral, a ativação da cascata é decorrente da ação de fatores de crescimento (especialmente ERKs, *ver abaixo*), citocinas inflamatórias e de estresse, como, por exemplo, o estresse oxidativo, mecânico, térmico, etc., (mormente p38 e JNKs, *ver abaixo*) levando a respostas como inflamação, apoptose, migração e proliferação celular, crescimento e diferenciação celular (LEWIS et al, 1998; CHANG e KARIN, 2001).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) encontram-se, geralmente, em todos os tipos celulares, regulando respostas específicas que diferem de acordo com o tipo celular. As MAPKs mais estudadas são ERK 1 e 2 (ERK1/2 – cinases reguladas por sinal extracelular), p38 e JNK (c-Jun N-terminal kinase) (ERREDE et al, 1995; LEWIS et al, 1998). As MAPK constituem um módulo de três cinases, formando um sistema regulatório que estabelece uma via sequencial de ativação de proteínas cinase: a MAP cinase cinase (MAPKKK), a MAP cinase cinase (MAPKK) e a MAP cinase. (PEARSON et al, 2001).

Na via da MAP cinase ERK, duas isoformas foram descritas: ERK1 de ~42 kDa e ERK2 de ~44 kDa, ativadas respectivamente por MEK1 e MEK2. As MAP cinases ERK1/2, são cinases de resíduos serina/treonina altamente conservadas que fosforilam diversos substratos, incluindo outras proteínas cinases (Raf-1 e MEK), fatores de transcrição (Myc, Jun, Fos, HIF1) e proteínas da superfície celular (EGFR) (CHANG e KARIN, 2001; POUYSSEGUR e LENORMAND, 2003). Em células de mamíferos, ERKs são ativadas através de

fosforilações sequenciais, em resposta a uma extensa variedade de estímulos extracelulares, estando envolvidas em diversas atividades celulares, como regulação da diferenciação, migração, e sobrevivência celular (BONNI et al, 1999; TUNQUIST e MALLER, 2003; HUANG et al, 2004). A ativação de ERK pode, então, resultar em efeitos opostos: proliferação celular/parada do ciclo celular, sobrevivência/morte celular (LE GALL et al, 2000; ZUGASTI et al, 2001).



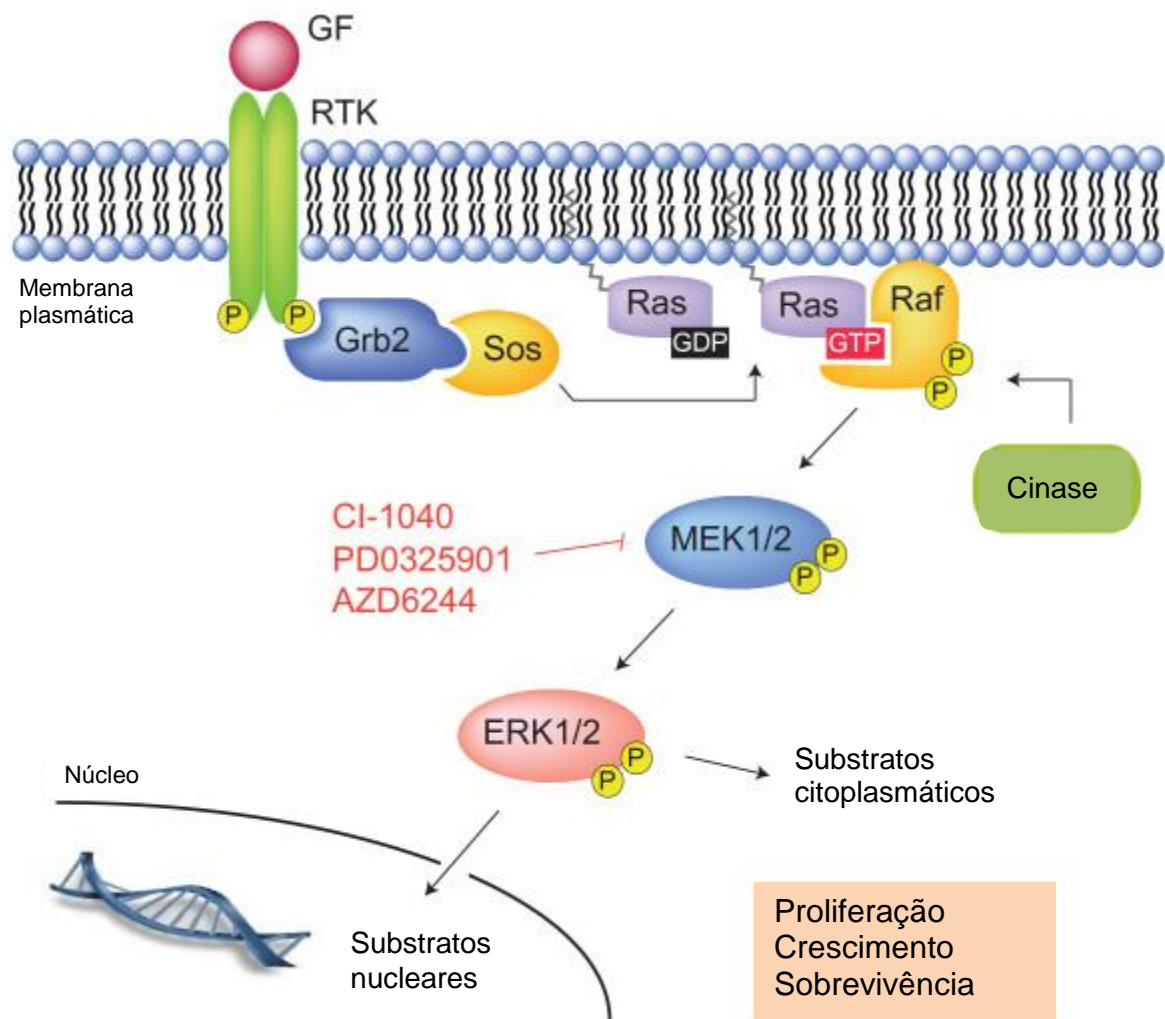
**Figura 9.** Ativação de diferentes cascatas de sinalização de MAPKs por diferentes estímulos extracelulares. As cascatas de ERK, JNK e p38 contêm as mesmas séries de 3 cinases. A MEK cinase (MEKK) fosforila e ativa a MAP cinase cinase (MEK), que por sua vez fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK) (Adaptado de VLAHOS et al, 2003).

O primeiro componente do módulo MAPKKK pode ser ativado tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras ou Rho. As MAPKKK são cinases serina/treonina que, quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima cinase no módulo, a MAP cinase cinase (MAPKK). As MAP cinases (MAPK) constituem a cinase final no módulo de ativação e fosforilam seus substratos em resíduos de serina e treonina (MOLKENTIN e DORN, 2001)

De forma geral, os receptores tirosina-cinases (RTK) transmitem seus sinais através da ativação da cascata Ras/Raf/MEK/ERK. Quando o receptor tirosina-cinase é estimulado, os domínios tirosina-cinase intrínsecos são ativados, resultando na fosforilação em tirosina de substratos específicos, permitindo que ao receptor se liguem proteínas de adaptação, como Grb2 e Sos. A ligação de Sos ao RTK estimula a troca de Ras-GDP por GTP na membrana plasmática. Ras-GTP (forma ativada) interage com Raf-1 (uma MAPKKK), ligando-se ao domínio regulador N-terminal da cinase. Ras-GTP dirige Raf-1 para a membrana plasmática onde a cinase é ativada. Raf-1 ativado pode fosforilar as MAPKKs, MEK 1/2. MEK1/2 ativadas, por sua vez, ativam ERK1/2, através de fosforilação específica nos resíduos de tirosina (Tyr<sup>204</sup>) e treonina (Thr<sup>202</sup>). ERK fosforilada, que é a forma ativada, transloca-se para o núcleo onde fosforila e ativa fatores de transcrição que controlam a expressão de genes que são necessários para o crescimento celular, diferenciação e sobrevivência (WIDMANN et al, 1999; ROUX e BLENIS, 2004; FRÉMIM e MELOCHE, 2010). A amplificação através da cascata de sinalização é de tal ordem que se estima que a ativação de apenas 5% das moléculas de Ras é suficiente para total ativação de ERK1/2 (HALLBERG et al, 1994). Na Figura 10 está representado o esquema de ativação de ERK1/2. Muitos estudos mostram que esteroides cardiotônicos, como a ouabaína, ativam a via da ERK, promovendo alterações sobre o crescimento de diferentes tipos celulares.

As cinases da família JNK são proteínas altamente conservadas, codificadas por três genes capazes de produzir isoformas distintas de JNK através de processamento alternativo. Esta classe de MAPKs é diretamente fosforilada por JNK1 (MEK4) e JNK2 (MEK7), as quais são reguladas por

fosforilação por MEKK1 (FREY e OLSON, 2003; PETRICH e WANG, 2004). Em relação à família das p38-MAPKs, foram descritas quatro diferentes isoformas, incluindo p38 $\alpha$  (*Mitogen-activated protein kinase 14*), p38 $\beta$  (*Mitogen-activated protein kinase 11*), p38 (*Mitogen-activated protein kinase 12*) e p38 $\delta$  (*Mitogen-activated protein kinase 13*) (SUGDEN e CLERK, 1998; YASUDA et al, 2011). As p38-MAPKs são ativadas por MEK3 e MEK6, as quais, por sua vez, são reguladas por fosforilação por MEKKs.



**Figura 10.** Esquema da ativação da cascata Ras/Raf/MEK/ERK. A ativação da cascata ERK / MAPK, em resposta a um fator de crescimento (GF), ligante de RTKs é iniciada pela ativação da pequena GTPase RAS. Esta etapa é realizada pelo recrutamento de um complexo de proteínas adaptadoras como SOS e GRB2. RAS ativada desencadeia a ativação da RAF (MAPKKK), que por sua vez, fosforila resíduos de serina da MEK (MAPKK), levando à sua ativação. Posteriormente, MEK ativada catalisa a fosforilação dupla da proteína ERK (MAPK). ERK fosforilada transloca para



o núcleo onde fosforila e ativa fatores de transcrição (Adaptado de FRÉMIM e MELOCHE, 2010).

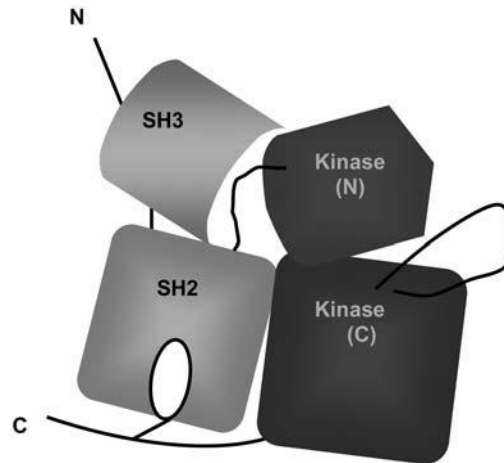
### 1.6.2. Família Src

A família de tirosina cinase Src (SFK) pertence ao grupo de proteínas cinases não-receptoras, apresentando peso molecular em torno de 52-62 kDa. Até agora, pelo menos nove membros da família Src foram identificados e podem ser divididos em dois grupos: tirosina cinases com uma expressão ampla (Src, Fyn, Yes) e aquelas expressas principalmente nas células hematopoiéticas (Fgr, Lyn, Hck, Lck, Blk, Yrc, Yrk). Elas estão presentes numa vasta variedade de tipos de células, incluindo células epiteliais renais e interagem com muitas proteínas de membrana, incluindo bombas iônicas, canais e transportadores. Além disso, desempenham um papel vital na regulação de diferentes vias de transdução de sinais, como a via das MAPKs (THOMAS e BRUGGE, 1997; XIE, 2003). Por exemplo, a ativação de Src tem sido implicada na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), no desenvolvimento de fibrose tecidual e no crescimento e metástase do câncer.

As Src cinases são caracterizadas estruturalmente por apresentarem vários domínios funcionais: um domínio cinase (ou SH1), responsável pela atividade enzimática, um domínio N-terminal 4 de homologia a Src (SH4), que contém vários sítios de fosforilação de proteínas cinases e é responsável por regular a associação da cinase com a membrana plasmática; um domínio SH3 (domínio 3 de homologia a Src), associado a um domínio SH2 (domínio 2 de homologia a Src), que, por sua vez, interage com os resíduos de tirosina fosforilados; possui também uma região de ligação SH2-cinase, que pode formar interação intramolecular com SH3 e regular a atividade cinase; e um domínio C-terminal regulatório (Figura 11) (PIERRE e XIE, 2006; INGLEBY, 2008).

A atividade cinase de Src é regulada pela fosforilação da tirosina e interações intramoleculares. Os dois sítios de fosforilação mais importantes são Y529 e Y418. A fosforilação de Tyr<sup>418</sup> estimula a atividade cinase de Src. Porém, a fosforilação de Tyr<sup>529</sup> mantém Src em uma conformação inativa através de interações intramoleculares entre o domínio SH2 e a porção C-terminal. Já foi visto que a ouabaína estimula a fosforilação de Tyr<sup>418</sup>, que ativa

Src, em células A7r5 e LLC-PK1, mas não afeta a fosforilação de Tyr<sup>529</sup>. Isso mostra que a ouabaína regula a interação entre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e Src (HAAS et al, 2002; LI e XIE, 2009).

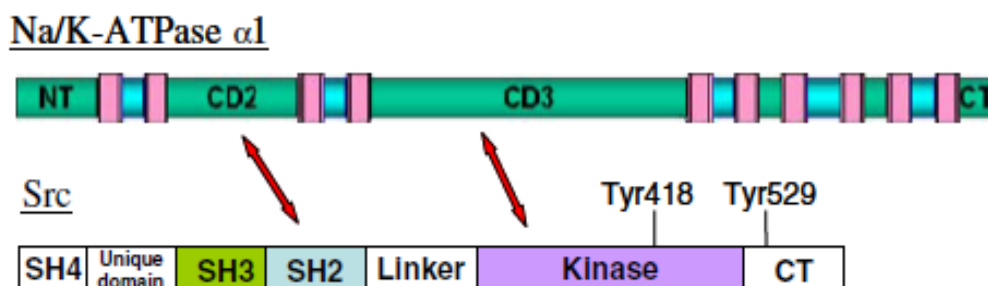


**Figura 11.** Representação esquemática da estrutura da tirosina cinase Src, mostrando os domínios SH3-SH2 (domínios 3 e 2 de homologia a Src) e o domínio cinase (N: N-terminal; C: C-terminal) (PIERRE e XIE, 2006).

Sabe-se que a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sinalizadora interage com Src para formar um complexo receptor funcional. Estudos mostraram que a Na/K-ATPase e Src estão presentes em grande quantidade em frações caveolares em diferentes linhas de células e em tecidos. Análises de imunofluorescência mostram uma co-localização destas duas proteínas na membrana plasmática. Análises de Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (FRET) indicam que ambas as proteínas estão em estreita proximidade, indicando que elas estão interagindo diretamente em células vivas. Essa interação ocorreria entre a isoforma  $\alpha 1$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e a Src.

De fato, como ilustrado na Figura 11, a interação entre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e Src envolve pelo menos dois sítios de contato: sendo um deles o segundo domínio citosólico CD2 da subunidade  $\alpha 1$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com o domínio SH2 da Src, e outro o terceiro domínio citosólico CD3, de  $\alpha 1$  com o domínio cinase da Src (Figura 12). Funcionalmente, esta interação mantém Src em um estado inativo devido à interação do domínio cinase de Src com o domínio CD3 da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Já foi mostrado que a ligação de ouabaína ao complexo

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase/Src libera o domínio cinase da Src, resultando na ativação de Src (TIAN et al, 2006).



**Figura 12.** Representação esquemática da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e da Src. Os domínios de interação estão indicados pelas setas. O domínio CD2 da subunidade α1 da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase interage com o domínio SH2 da Src, e o terceiro domínio citosólico (CD3) de α1 interage com o domínio cinase da Src (LI e XIE, 2009).

### 1.6.3. Glicogênio Sintase Cinase 3 (GSK-3)

A Glicogênio Sintase Cinase 3 (GSK-3) é uma enzima presente em vários sistemas biológicos, atuando em diferentes sistemas de sinalização intracelular. GSK regula funções de diferentes proteínas estruturais e sinalizadoras, através da fosforilação de diversos substratos, mostrando que esta cinase participa de vários processos homeostáticos (JOPE et al, 2007).

A enzima possui duas isoformas principais em mamíferos, com alta homologia: alfa (GSK-3α) e beta (GSK-3β). A GSK-3α, possui cerca de 51 kDa. GSK-3β é a menor das duas proteínas, consiste de 482 aminoácidos, com um peso molecular de 46 kDa, e contém um domínio catalítico de proteína cinase central (WOODGETT, 1991).

As isoformas da GSK-3 são codificadas por genes diferentes, porém são reguladas de forma semelhante (BARRY et al, 2003). A regulação de sua atividade ocorre fundamentalmente pela fosforilação e desfosforilação de resíduos de serina e treonina. Sua atividade também é regulada pela formação de complexos proteicos e por sua distribuição intracelular. Ambas as isoformas são constitutivamente ativas, ou pela fosforilação de resíduos de tirosina 216 (GSK-3β) ou tirosina 279 (GSK-3α). A enzima é inativada através de

fosforilação adicional dos resíduos de serina 9 (GSK-3 $\beta$ ) ou do resíduo de serina 21 (GSK-3 $\alpha$ ) (WANG et al, 1994; DOBLE e WOODGETT, 2003).

A GSK-3 $\beta$  é a isoforma mais abundante no organismo. Embora a GSK-3 $\beta$  tenha sido originalmente isolada a partir de músculo esquelético, a enzima é amplamente expressa em todos os tecidos, com níveis particularmente abundantes no cérebro (EMBI et al, 1980; RYLATT et al, 1980; WOODGETT, 1990). Inicialmente, acreditava-se que a GSK-3 $\beta$  estaria envolvida apenas no metabolismo energético, através da regulação da atividade da enzima glicogênio sintase, passo fundamental no metabolismo do glicogênio intracelular (RYLATT et al, 1980). Entretanto, a descoberta de que outras vias de sinalização intracelular, além da via de sinalização da insulina, convergiam sobre a GSK-3 $\beta$  (como a via da Akt e a via canônica da Wnt) e que outras proteínas, além da glicogênio sintase, eram seus substratos (p.ex.  $\beta$ -catenina), levou à hipótese de que esta enzima poderia estar envolvida em diversas funções celulares além da regulação do metabolismo energético (PEINEAU et al, 2008; GOULD e MANJI, 2005).

As principais vias de sinalização regulatórias da GSK-3 $\beta$  são a via canônica da Wnt-1 e a via PI3K/Akt (INESTEROSA e ARENAS, 2009; PATEL et al, 2004; HANADA et al, 2004). Desta maneira, a atividade da GSK-3 $\beta$  influencia diversas vias de sinalização intracelular que controlam aspectos essenciais do funcionamento da célula: crescimento, metabolismo e morte celular (GRIMES et al, 2001; PEINEAU et al, 2008).

Dada a ampla distribuição tecidual de GSK-3 $\beta$  e o envolvimento desta cinase em diferentes vias de sinalização celular, esta enzima tem sido objeto de estudos em diferentes doenças, como diabetes, câncer, inflamação (DUGO et al, 2007) e até transtornos psiquiátricos como esquizofrenia. No que diz respeito aos esteroides cardiotônicos, foi descrito que a cinobufagina, um ECT do grupo dos bufadienolidos, é capaz de inibir a via da GSK-3 $\beta$  em células de osteosarcoma, promovendo inibição de NF- $\kappa$ B, e consequente morte celular (YIN et al, 2013).

## 1.7. Justificativa e relevância

No trabalho desenvolvido durante o Mestrado (Amaral, 2011), avaliamos de forma sistemática a capacidade de bufadienólidos endógenos inibirem a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica de rim de porco e ativarem a via de sinalização  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-ERK1/2 em células LLC-PK1 (túbulo proximal de rim de porco). Observamos que os bufadienólidos bufalina e telocinobufagina foram capazes de inibir a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica com padrão semelhante ao do cardenólido ouabaína, porém a marinobufagina teve uma potência inibitória cerca de 10 vezes menor. Da mesma forma, todos foram capazes, em diferentes graus, de ativar a via de sinalização em concentrações que não afetam (ou pouco) a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica (1-100 nM), sendo a marinobufagina a que melhor conseguiu dissociar esses dois efeitos. Ao avaliar os efeitos desses esteroides sobre a proliferação de células LLC-PK1, observou-se que a ouabaína e a marinobufagina estimularam a proliferação celular em concentrações capazes de ativar ERK1/2 (1, 10 e 100 nM) enquanto que a bufalina e a telocinobufagina não afetaram (1 e 10 nM) ou mesmo reduziram (100 nM) a proliferação. Até onde sabemos, nossos resultados foram o primeiro relato de efeitos opostos de ECTs em um mesmo tipo celular, indicando que esses compostos apresentam seletividade funcional, ou seja, geram efeitos diferentes apesar de atuarem no mesmo e único receptor, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Entretanto, não tínhamos avaliados os mecanismos envolvidos nessa seletividade.

Portanto, a caracterização das vias de sinalização responsáveis pelos efeitos proliferativos e apoptóticos dos bufadienólidos é importante para que se possa entender o papel fisiopatológico desses hormônios e a razão da existência de diversos compostos da mesma classe serem sintetizados por mamíferos.

# Objetivos

---

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Como observamos anteriormente efeitos contrários dos bufadienolidos sobre células LLC-PK1 (AMARAL, 2011), decidimos investigar os mecanismos relacionados às diferenças dos efeitos celulares produzidos pela marinobufagina e telocinobufagina, bufadienolidos endógenos em seres humanos e estruturalmente semelhantes, em células LLC-PK1.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar:

- (1) O efeito dos bufadienolidos sobre a via MEK1/2-ERK1/2;
- (2) O efeito dos bufadienolidos sobre a viabilidade, ciclo celular e morte celular;
- (3) A associação de bufadienolidos sobre a proliferação celular;
- (4) A depleção de  $Ca^{2+}$  intracelular sobre a morte celular;
- (5) A inibição da via Src-ERK1/2 (e PI3K-Akt, p38, JNK1/2, PKG2) sobre a proliferação e viabilidade de células LLC-PK1 tratadas com bufadienolidos;
- (6) O efeito dos bufadienolidos sobre proliferação e viabilidade celular após tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina;
- (7) O efeito da telocinobufagina sobre a via da GSK-3 $\beta$ ;
- (8) A associação de telocinobufagina com inibidor de GSK-3 $\beta$  sobre a morte celular;

# **Materiais e Métodos**

---

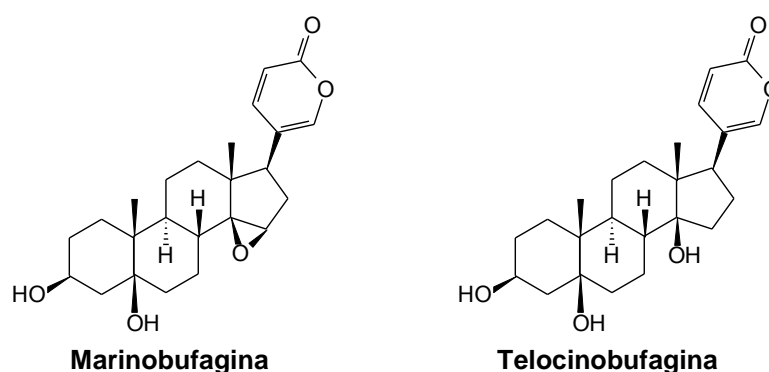
---



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção de bufadienolidos

A marinobufagina e a telocinobufagina, que não são comercialmente disponíveis, foram purificadas a partir da secreção glandular do sapo *Rhinella schneideri* (CUNHA-FILHO et al, 2005, 2010). O extrato bruto foi obtido de 360 espécimes (*Rhinella schneideri*, popularmente conhecido como sapo cururu) capturados em Brasília, Distrito Federal, e Bacabal, Maranhão (licença IBAMA/RAN nº. 097/06 - processo 02010.000832/04-74). As substâncias isoladas apresentam estrutura e peso molecular definidos (CUNHA-FILHO et al, 2010; Figura 13). Todo esse processo foi realizado pelo Dr. Geraldino Cunha Filho, pós-doutorando em nosso laboratório com bolsa PAPDRJ, CAPES/FAPERJ).



**Figura 13:** Estruturas químicas dos bufadienolidos utilizados

#### 3.2. Isolamento dos compostos e caracterização química

O veneno foi obtido por pressão manual, coletado em placas de Petri. Após desidratado em dissecador sob vácuo o veneno seco (95,1 g) foi pulverizado, extraído com acetato de etila por três vezes (300 mL), com

intervalos de uma semana, e concentrado em rota-evaporador sob vácuo fornecendo um resíduo marrom e amorfo (9,0 g).

Alíquotas com cerca de 1,2 g do extrato foram fracionadas por cromatografia em coluna *dry-flash* e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas pré-fabricadas de sílica-gel. Os compostos isolados foram submetidos às análises por infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio dos compostos isolados e dos derivados obtidos foram confirmados por experimentos de HMQC, HMBC e APT.

### 3.3. Linhagem celular

Utilizamos a cultura de células da linhagem LLC-PK1, derivada de túbulo proximal de rim de porco, rica em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e muito empregada em estudos com ECTs. Essas células foram mantidas em meio DMEM (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA),  $\text{NaHCO}_3$  (44 mM) e gentamicina (40 mg/L), pH 7,4, em estufa ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). O meio era trocado a cada 2 dias e as células foram subcultivadas utilizando solução EDTA-tripsina 0,25% (Invitrogen, EUA).

### 3.4. Efeito do tratamento com bufadienolidos sobre a via MEK1/2-ERK1/2 e GSK3- $\beta$

As células LLC-PK1 cultivadas em placas de 6 poços (Techno Plastic Products/TPP, Suíça), ao atingirem 70-90% de confluência, foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS -  $\text{NaCl}$  125 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2 mM,  $\text{KCl}$  5 mM) e incubadas com DMEM sem soro durante 12-24 h. Após esse período, as células foram pré-tratadas, por 15 min, com inibidores das cinases que ativam ERK1/2, MEK1/2 (U0126, 10  $\mu\text{M}$ ), ou inibidor da GSK3- $\beta$  (BIO, 500 nM) e em seguida, tratadas com marinobufagina ou telocinobufagina em diferentes concentrações por 15 min (tempo para efeito máximo – PIERRE et al, 2008). O meio então foi retirado, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de radioimunoensaio modificado (RIPA) contendo NP-40 1%, desoxicolato 0,25%,  $\text{NaCl}$  150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1

mM, NaF 1 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/ml, ácido ocadáico 10 nM e Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). O lisado celular foi centrifugado a 13.000g por 15 min, o sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteínas e experimentos de Western blot para avaliação da ativação de ERK 1/2 ou GSK3-β.

### **3.5. Dosagem de Proteínas**

A dosagem de proteínas foi adaptada para microplacas, segundo uma modificação do método colorimétrico proposto por LOWRY e colaboradores (1951). Para realização da curva-padrão, foi utilizada a albumina sérica bovina (BSA), cujas concentrações variaram entre 50 e 350 µg de BSA/mL. Nos poços destinados à curva-padrão foram adicionados 30 µL de cada concentração. Nos outros poços, foram adicionados 30 µL de proteína diluída. Em seguida, a todos os 96 poços da microplaca foram adicionados 250 µL de solução contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 0,1% e CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O 0,5%, seguido da adição de 15 µL do reagente de Folin-Ciocalteau (Merck, EUA). Após um intervalo de 45 min, os valores de absorbância foram obtidos em leitor de microplaca (Tecan, EUA) no comprimento de onda de 700 nm. Os cálculos foram realizados utilizando-se a curva-padrão de absorbância *versus* concentração de proteína, por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 4, GraphPad Software, EUA). O resultado do conteúdo de proteína foi expresso em mg proteína/ml de homogeneizado.

### **3.6. Ensaio de Western blot**

A técnica foi realizada como descrita anteriormente (ARNAUD-BATISTA et al, 2012). As preparações celulares de LLC-PK1 (20-40 µg proteína/poço), foram diluídas em tampão de amostra contendo glicerol 30%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %, 2-mercaptoetanol 15%, bromofenol 0,03%, tampão Tris 0,5 M-HCl (pH 6,8) 24% em água ultra-pura, na proporção 3:1 (volume de preparação:volume de amostra) e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 ou 12% com SDS (SDS-PAGE), com amperagem constante em torno de 40 mA e com voltagem inicial de 80 V. Foi utilizado padrão de

peso molecular para comparação das bandas ao final do experimento. Após a corrida, as amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência (Tris 4,55 g, glicina 21,6 g, metanol 300 mL, água deionizada *qsp* 1500 mL), com voltagem constante de 90 V, durante 1 h. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Rouge de Ponceau (Rouge de Ponceau 0,2 %, ácido tricloroacético 3 %, água deionizada *qsp* 100 mL) por 5-10 min para visualização das proteínas transferidas. As membranas foram então incubadas por 1 h em solução TBS (*Tris-buffered saline*) (NaCl 4 g, Tris 1,21 g-HCl até pH 7,6 , água deionizada *qsp* 1000 mL) com Tween 20 0,1% (TBS-T) e 5% de leite Molico<sup>®</sup> desnatado, com agitação constante, visando evitar a marcação inespecífica do anticorpo à membrana. Posteriormente, foram realizadas lavagens com TBS-T (1 lavagem de 15 min e 2 de 5 min) com agitação. Após lavagem, as membranas foram incubadas por 1 ou 2 h com anticorpos monoclonais primários de coelho contra as proteínas cinases ERK 1/2 (fosforiladas ou totais, para avaliação da ativação da sinalização; diluição 1:1000, Cell Signaling Technology, EUA) ou contra GSK3- $\beta$  (diluição 1:1000, Cell Signaling Technology, EUA). Após novas lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por mais 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:4000, Santa Cruz Biotechnology, EUA) conjugados à peroxidase. A imunorreatividade foi detectada pelo sistema Supersignal (Pierce, EUA), e as membranas foram expostas durante 30 s a 5 min, a filmes radiográficos de alta sensibilidade (CL-XPosure, Pierce, EUA). Os filmes foram escaneadas em Scanner (HP Scanjet G4050) e a quantificação da marcação, para comparar os diferentes grupos, foi realizada por análise densitométrica utilizando o software ImageJ (versão 1.42q, EUA).

### **3.7. Ensaio de inibição da via Src-ERK1/2, PI3K-mTOR, p38, JNK1/2, PKG2, GSK3- $\beta$ e avaliação sobre a proliferação e viabilidade celular**

Mostramos no mestrado que os dois bufadienolidos estudados ativam as MAP cinases ERK1/2 em baixas concentrações. Para avaliar se essa ativação é responsável pelos efeitos celulares, as células foram subcultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial entre 5.000 e 10.000 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em

estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 2 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de diferentes concentrações de bufadienolidos (1, 10 e 100 nM) e de inibidores de Src cinase (SU6656, 10 µM) e das cinases que ativam ERK1/2, MEK1/2 (U0126, 10 µM), além de inibidores específicos de PI3K (LY294002, 5 µM), PKG2 (KT5823, 2,5 µM), p38 (SB202190, 10 µM), JNK1/2 (SP600125, 1,5 µM), e GSK3-β (BIO, 500 nM) por diferentes períodos de tempo (24, 48 ou 72 h) para estudo da proliferação ou viabilidade. Para proliferação, em cada tempo indicado as células-controle e tratadas de dois poços foram retiradas com tripsina e as células centrifugadas a 2.500 rpm, por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e em seguida as células foram ressuspensas em PBS para contagem. As células foram coradas com azul de Tripán e a contagem foi realizada em hemocitômetro de Neubauer.

Além dos ensaios de contagem celular em hemocitômetro, avaliamos também, a proliferação e viabilidade celular, através de ensaios que estimam a função mitocondrial (MTT), avaliação da expressão de proteínas Bax e Bcl2, e o efluxo de enzimas intracelulares (LDH).

### **3.8. Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT**

O método colorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das células tratadas com os bufadienolidos. O princípio desse método descrito por MOSMANN (1983) consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Placas de cultura de 96 poços com 1.000 células/poço foram mantidas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 2 h e, em seguida o meio foi trocado para meio sem soro, onde as células foram mantidas por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de diferentes concentrações de bufadienolidos (1, 10 e 100 nM) por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h) e dos inibidores de Src cinase

(SU6656, 10  $\mu$ M) e MEK1/2 (U0126, 10  $\mu$ M). Ao término do período de incubação, foi feita a lavagem dos poços com PBS para remoção das células mortas e adicionado o MTT (12 mM) e as células foram incubadas por 4 h a 37 °C. Em seguida, foi adicionada solução SDS-HCl para solubilizar os cristais formados e após 4 h, foi realizada leitura da absorbância a 570 nm com auxílio de um leitor de placas.

### **3.9. Avaliação da viabilidade celular através da expressão das proteínas Bax e Bcl2**

As células de linhagem LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial entre 5.000 e 10.000 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37° C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 2 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de diferentes concentrações de esteróides cardiotônicos (1, 10 e 100 nM), por 4-5 h (telocinobufagina) ou 72 h (ouabaina e marinobufagina), para estudo da viabilidade. Foi realizada preparação membranar com as células seguindo o método já citado anteriormente. As preparações membranares foram submetidas a ensaio de Western blot, utilizando-se os anticorpos primários anti-Bcl e anti-Bax, marcadores de viabilidade celular.

### **3.10. Ensaio de LDH**

Placas de cultura de 24 poços com 10.000 células/poço foram mantidas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 2 h e em seguida as células foram mantidas em meio sem soro por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de diferentes concentrações de marinobufagina e telocinobufagina (100 nM) por 72 h. Após esse período, foram separadas alíquotas de 50  $\mu$ L do meio de cultura para avaliação da presença de lactato desidrogenase (LDH). O ensaio baseia-se na conversão de

piruvato para lactato na presença de LDH, com oxidação paralela de NADH. A formação de NAD<sup>+</sup> resulta em uma variação de absorbância, medida em espectrofotômetro a 340 nm. Alíquotas de 20 µL das amostras foram adicionadas a eppendorffs contendo 1 mL de solução tampão Tris pH 7,2 contendo piruvato e NaCl e aquecidos em banho a 37°C até o momento da leitura. No momento da leitura foram adicionados 25 µL de solução contendo NADH e a absorbância medida em espectrofotômetro a 340 nm em diferentes tempos (0, 1, 2 e 3 min).

### **3.11. Ensaio para avaliação dos estágios do ciclo celular por citometria de fluxo**

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, que, quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo (IP), permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo celular. Esta análise foi realizada por citometria de fluxo, utilizando como marcador o IP, fluorocromo que se intercala com bases de DNA. As células foram cultivadas em placas de 24 poços (10.000 células/poço) e tratadas com os bufadienolidos (1, 10 ou 100 nM) por 48 h. Em seguida, as células foram tripsinizadas e colocadas em tubos cônicos para lavagens. Após lavagens com HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), as células foram incubadas com solução para ciclo celular contendo IP (50 µg/mL, SIGMA), RNase (pâncreas bovino, SIGMA, EUA) a 1 mg/mL e Triton X-100 0,2%, no momento da leitura no Citômetro de Fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Dessa forma, foram avaliadas a porcentagem de células que estavam nos estágios G0/G1 (quiescente), S (sintético) e G2/M (pré-mitótico/mitótico) do ciclo. As células com conteúdo de DNA inferior aos apresentados na fase G1 na distribuição do ciclo celular foram contadas como células hipodiplóides (sub-fase G0), que representa a fração de células onde ocorreu fragmentação do DNA, característica de morte celular por apoptose.

### 3.12. Contagem de células

As células de linhagem LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial entre 10.000 e 20.000 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37° C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 1 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de diferentes concentrações de esteroides cardíacos (1, 10 e 100 nM), por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h), para estudo da proliferação. Para proliferação, em cada tempo indicado as células-controle e tratadas de dois poços foram retiradas com tripsina e as células centrifugadas a 2.500 rpm, por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e em seguida as células foram ressuspensas em solução PBS para contagem. As células foram coradas com azul de Tripán e a contagem foi realizada em hemocitômetro de Neubauer. Foram realizados três experimentos independentes feitos em duplicata para todos os ensaios. As células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara. A equação usada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{4}, \text{ onde:}$$

QC → Quantidade de células

FD → Fator de diluição (40x)

10<sup>4</sup> → Fator de correção da câmara de Neubauer

N° de células → Média do número total de células contadas nos 4 quadrantes

4 → número de quadrantes

### 3.13. Análise morfológica por microscopia de contraste de fase

As células de linhagem LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial de 10.000 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 1 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as



células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de telocinobufagina (1, 10 e 100 nM), por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h), e em seguida, examinadas e fotografadas por microscópio de contraste de fase (Software CellSens 1.5, Microscópio Olympus IX71, Olympus America, EUA), aumento de 400X.

### **3.14. Análise morfológica por microscopia de fluorescência**

As células LLC-PK1 foram cultivadas em lamínulas com densidade inicial de 5.000 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 2 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. Após esse intervalo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e, então, cultivadas em DMEM com 2,5% de soro, com ou sem adição de telocinobufagina 100 nM, por 24 h. Após o tratamento, as células LLC-PK1 foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o PFA foi retirado e as lamínulas incubadas com triton X-100 0,2% por 5 minutos a temperatura ambiente para permeabilização das células, seguido de 3 lavagens de 5 minutos em suave agitação orbital para a retirada do excesso de Triton X-100. Então as lamínulas foram incubadas com Hoechst (1/10.000) diluído em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas 3X por 5 minutos cada e realizada montagem das lâminas com ProLong Gold (Invitrogen-Carlsbad, Califórnia).

### **3.15. Avaliação do efeito do tratamento com metil-β-ciclodextrina (MβCD)**

As células LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial entre 5.000 e 10.000 células/poço, em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 2 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. O meio foi trocado para DMEM com 2,5% de soro, e as células pré-tratadas com 10 mM MβCD por 30 min. Após esse período, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 1 mM MβCD e 100 nM de

telocinobufagina por 72 h. Foi realizada, então, contagem celular seguindo o método já citado anteriormente.

### **3.16. Avaliação do efeito do BAPTA-AM sobre o tratamento com telocinobufagina**

Células LLC-PK1 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade inicial entre 5.000 e 10.000 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 2 h, o meio foi trocado por meio sem soro, onde as células permaneceram por 24 h. O meio foi trocado para DMEM com 2,5% de soro, e as células pré-tratadas com 5 µM BAPTA-AM por 30 min. Após esse período, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e tratadas com 100 nM telocinobufagina por 24h. As células foram examinadas e fotografadas por microscópio de contraste de fase (Software CellSens 1.5, Microscópio Olympus IX71, Olympus America, EUA), aumento de 100 e 400X.

### **3.17. Análise dos dados**

As análises estatísticas foram feitas por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste de Tukey, ou teste *t* de Student, utilizando o software GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 4, GraphPad Software, EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os dados representam os resultados de três ou mais experimentos e foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

# Resultados

---

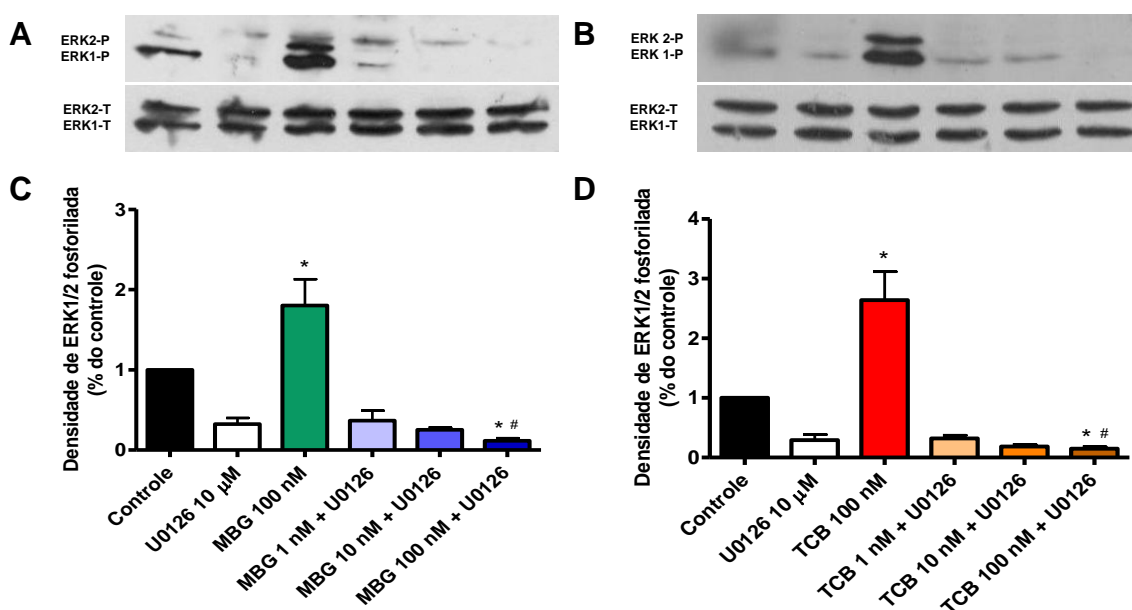
---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito dos bufadienolidos sobre a via de sinalização MEK1/2-ERK1/2

Já foi demonstrado por vários grupos que cardenolidos são capazes de rapidamente estimular ERK1/2 em concentrações nanomolares (LIANG et al, 2007; LUCAS et al, 2012). Resolvemos então avaliar o efeito de marinobufagina e telocinobufagina sobre essa via em células LLC-PK1. Esse tipo celular exibe maior densidade de bombas de Na<sup>+</sup> na região basolateral (MUTH e cols., 1998; DUNBAR e CAPLAN, 2001), por esse motivo, para que pudéssemos ter uma ativação mais eficiente do processo de sinalização, utilizamos culturas subconfluentes (70-90% de confluência).

Na concentração de 100 nM, tanto marinobufagina quanto telocinobufagina foram capazes de ativar rapidamente (15 min de incubação) ERK1/2 (Amaral, 2011) e esse efeito é prevenido com o pré-tratamento com U0126 10 µM, um inibidor de MEK1/2 (Fig. 14).



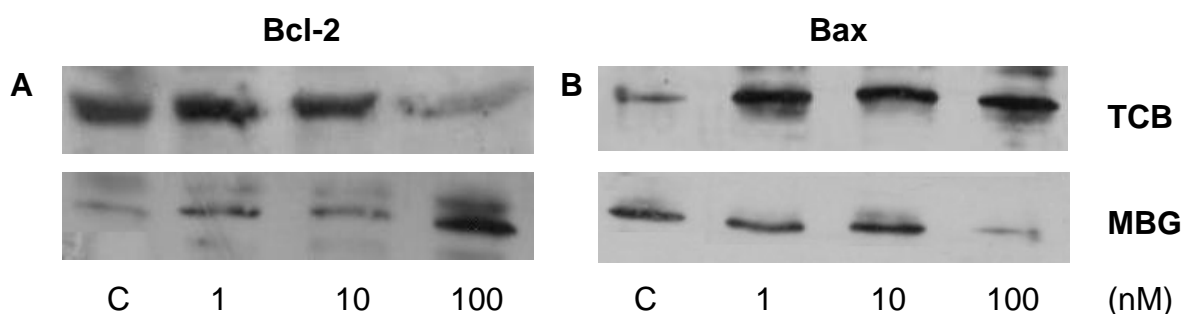
**Figura 14:** Efeito da marinobufagina (MBG) e telocinobufagina (TCB) sobre a densidade de ERK1/2 fosforilada (ERK1/2-P) e total (ERK1/2-T). Células LLC-PK1 pré-tratadas com U0126 10 µM (inibidor de MEK1/2) por 15 min, depois tratadas com MBG (A, Western blot típico; C, valores de densidade óptica) ou TCB (B, Western blot típico; D, valores relativos de densidade óptica) por 15 min. \* $p < 0,0001$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao MBG 100 nM. One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n = 3$ .

## 4.2. Efeito dos bufadienolidos sobre a viabilidade celular

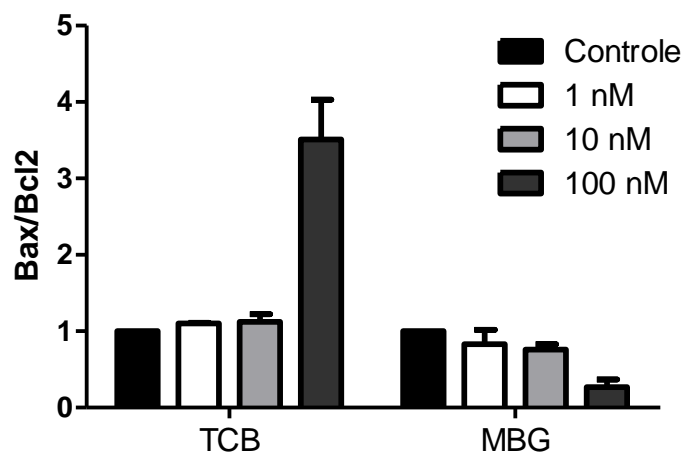
Para investigar mais detalhadamente os efeitos encontrados sobre a proliferação celular, ou seja, a marinobufagina estimula enquanto a telocinobufagina inibe (AMARAL, 2011), decidimos testar os efeitos dos bufadienolidos sobre a expressão de marcadores de viabilidade celular, a proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax nas células LLC-PK1 através da análise de Western blot. As preparações de células foram tratadas com os bufadienolidos por 72 h, tempo onde conseguimos melhor visualizar os efeitos sobre o crescimento celular. Apenas na concentração de 100 nM, tratamos as células por 4 h, pois após esse período a quantidade de células fica muito reduzida impossibilitando a preparação.

Ao observar a Fig. 15, verificamos que não houve alteração na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Bax nas células tratadas com telocinobufagina, nas concentrações de 1 e 10 nM, porém em 100 nM, houve diminuição na expressão de Bcl-2 e claro aumento na expressão de Bax, indicando diminuição na viabilidade celular.

Ao analisar os resultados de marinobufagina, ao contrário, observamos aumento na expressão de Bcl-2 e redução de Bax, de forma concentração-dependente, indicando aumento da viabilidade celular.



C

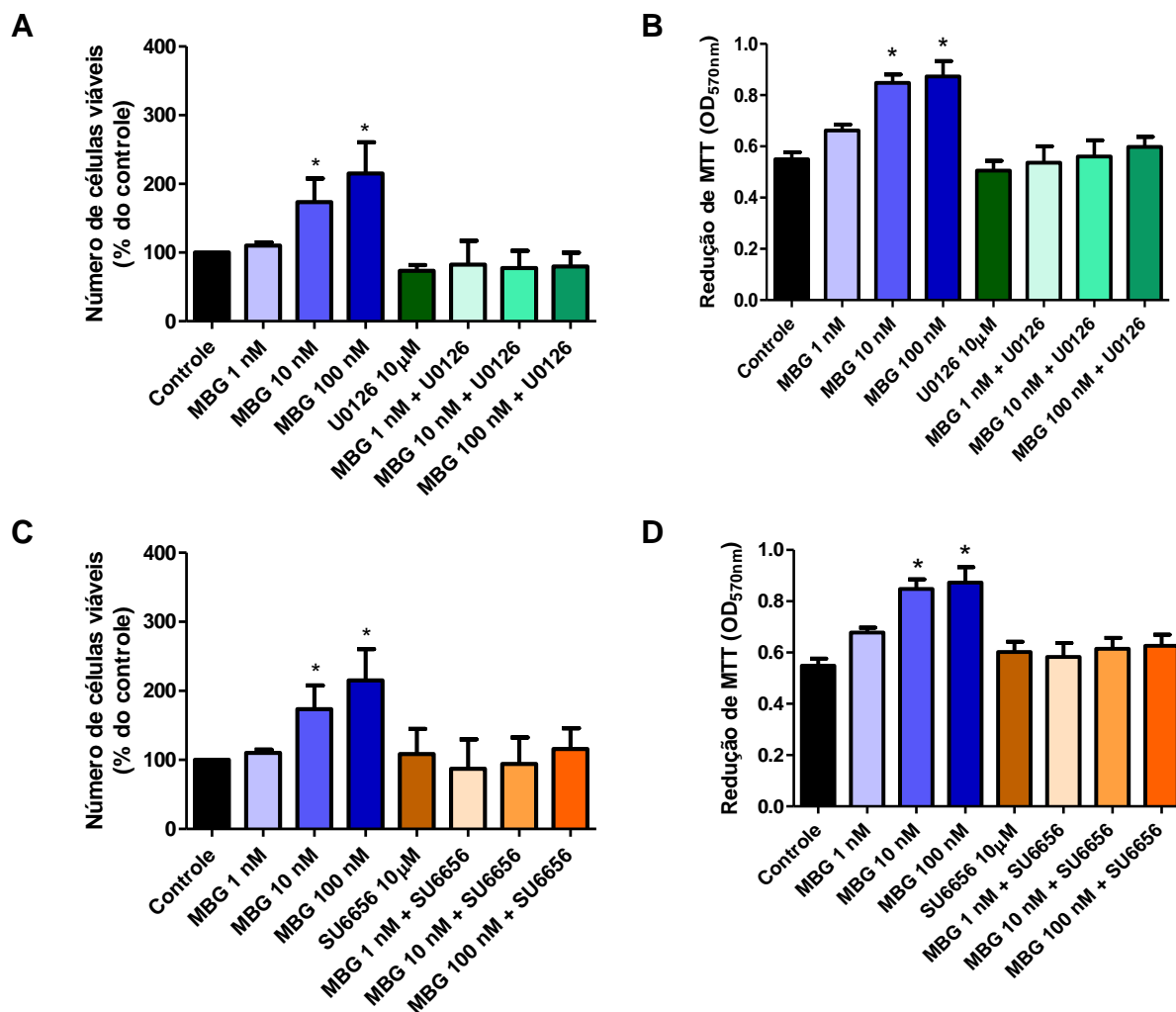


**Figura 15:** Efeito da marinobufagina (MBG) e telocinobufagina (TCB) sobre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax. Células da linhagem LLC-PK1 foram tratadas com concentrações de 1 a 100 nM de TCB ou MBG e submetidas à técnica de Western blot para medir os níveis de expressão das proteínas Bcl-2 e Bax (A e B, Western blots típicos; C, valores relativos de densidade óptica: razão Bax/Bcl-2), n=2.

#### 4.3. Avaliação da via Src-MEK1/2-ERK1/2 na estimulação da proliferação e viabilidade celular pela marinobufagina

Sabemos que a via da ERK1/2 está associada com diferentes funções celulares, como a proliferação (PEARSON et al, 2001), e já verificamos anteriormente que a marinobufagina estimula a proliferação celular (AMARAL, 2011). Tendo isso em mente, decidimos avaliar o efeito da inibição desta via de sinalização sobre a proliferação e viabilidade celular através de ensaios de contagem celular com exclusão de azul de Trypan e ensaios de MTT. Foram utilizados inibidores de MEK1/2 e de Src, para podermos inibir pontos diferentes da via de sinalização mediada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

A marinobufagina, nas concentrações de 10 e 100 nM, aumentou o número de células em 72 h. O tratamento com inibidor de MEK1/2 (U0126) e com inibidor de Src (SU6656) preveniu esse efeito, tanto nos ensaios de contagem, quanto nos ensaios de MTT (Fig. 16), indicando que a via da ERK1/2 está relacionada com os efeitos provocados pela marinobufagina.



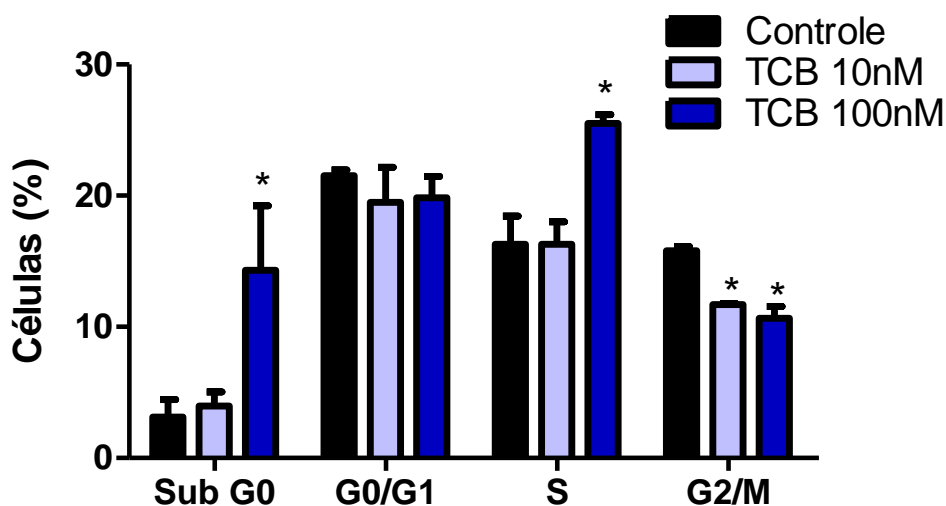
**Figura 16:** Inibição da via Src-ERK1/2 para avaliação do efeito da marinobufagina (MBG) sobre a proliferação e viabilidade celular. Células LLC-PK1 tratadas com MBG 1-100 nM, com ou sem adição de U0126 10 μM (inibidor de MEK1/2) ou SU6656 10 μM (inibidor de Src), por 72 h. **A** e **C**, contagem de células; **B** e **D**, ensaio de MTT. \* $p < 0,05$  comparado ao controle. One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n=4$ .

#### 4.4. Efeito de telocinobufagina sobre o estagiamento do ciclo celular e apoptose

Durante o mestrado, foi verificado que a telocinobufagina na maior concentração utilizada, 100 nM, promoveu diminuição no número de células e da viabilidade em relação ao controle. Com base nesses resultados, decidimos avaliar como estariam as fases do ciclo celular nas células tratadas com este bufadienolido, através de citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídeo.

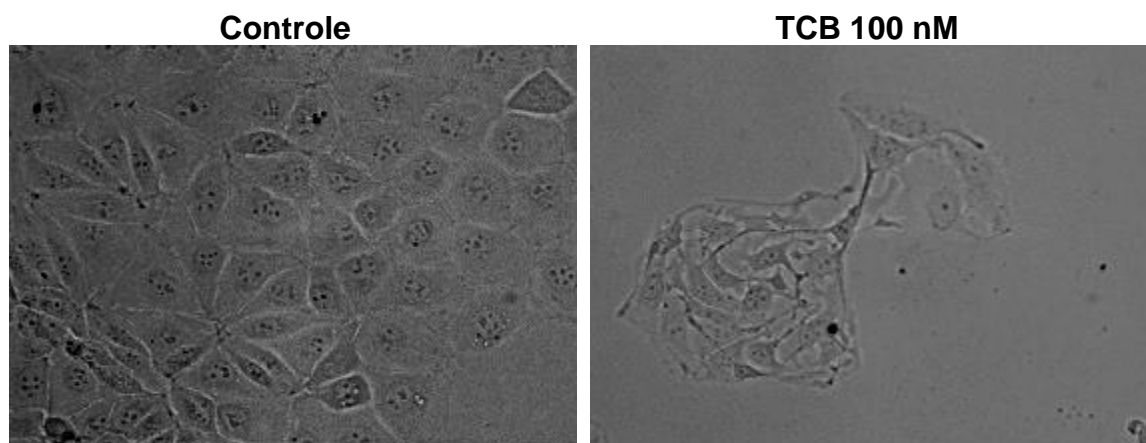
As células foram tratadas com os bufadienolidos por 48 h, quando foi feita, então, a leitura no citômetro. Escolhemos o tempo de 48h, pois em

tempos maiores, a quantidade de células, após tratamento com TCB, era muito baixa. Telocinobufagina 10 nM diminuiu a porcentagem de células na fase G2/M, porém não alterou as outras fases. telocinobufagina 100 nM aumentou significativamente a porcentagem de células nas fases Sub-G0, S (duplicação do DNA) e diminuiu a fase G2/M, que é a fase de mitose (Fig. 17).



**Figura 17:** Análise do ciclo celular em células LLC-PK1 tratadas com telocinobufagina (TCB) por citometria de fluxo. As células foram tratadas com TCB 10 e 100 nM por 48 h. Distribuição das células nas fases Sub-G0, G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. \* $p < 0,05$ , comparado ao controle, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n=3$ .

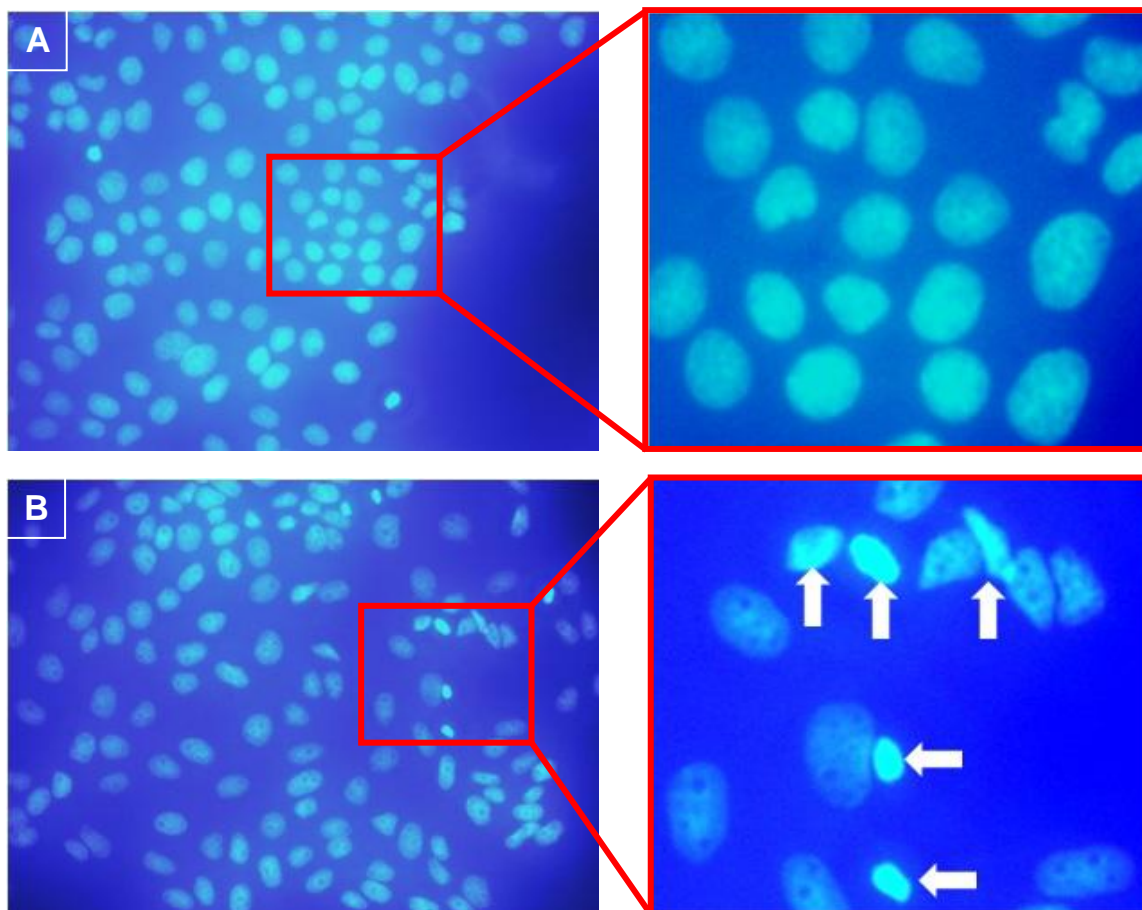
Além de diminuir o número de células, a telocinobufagina, na concentração de 100 nM, também promoveu intensa modificação na morfologia celular (Fig. 18).



**Figura 18:** Microscopia de contraste de fase de células LLC-PK1 tratadas com telocinobufagina (TCB) 100 nM por 72 h. Aumento de 400x.



A análise de imunofluorescência com marcação nuclear com Hoescht, após tratamento com telocinobufagina 100 nM, mostrou a presença de condensação de cromatina já em 24 h, efeito característico de células em processo apoptótico (Fig. 18).



**Figura 19:** Microscopia de fluorescência nuclear usando Hoescht (200x, à esquerda, e 400x, à direita) para avaliação de condensação de cromatina. Células LLC-PK1 tratadas por 24 h. **A:** Controle e **B:** TCB 100 nM. As setas indicam a presença de condensação de cromatina.

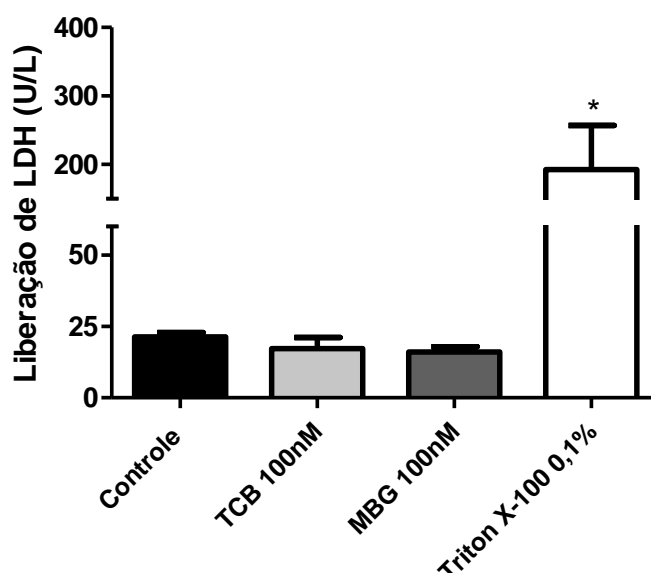
#### 4.5. Efeito da telocinobufagina sobre a necrose celular

Como o tratamento com telocinobufagina 100 nM promove diminuição no número de células em relação ao controle, surgiu a hipótese dessa diminuição estar ocorrendo por morte celular. Na Fig. 15 foi mostrado que telocinobufagina 100 nM promovera aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição na proteína anti-apoptótica Bcl-2, indicando

ocorrer apoptose. Decidimos verificar agora se também estaria ocorrendo necrose celular.

Para isso, realizamos ensaios de liberação de LDH (lactato desidrogenase). As células foram tratadas com telocinobufagina e marinobufagina 100 nM por 72 h, e depois avaliamos se o meio tinha presença de LDH. Como o LDH é uma enzima citossólica, ela é liberada no meio de cultura quando ocorre necrose e a célula é rompida; portanto, quanto maior sua presença no meio, maior o número de células necróticas.

O tratamento com marinobufagina 100 nM e telocinobufagina 100 nM não aumentou a liberação de LDH (Fig. 20) em relação ao controle, sugerindo que não está ocorrendo necrose. Nesses experimentos, utilizamos o Triton X-100 (0,1 %) como controle positivo.

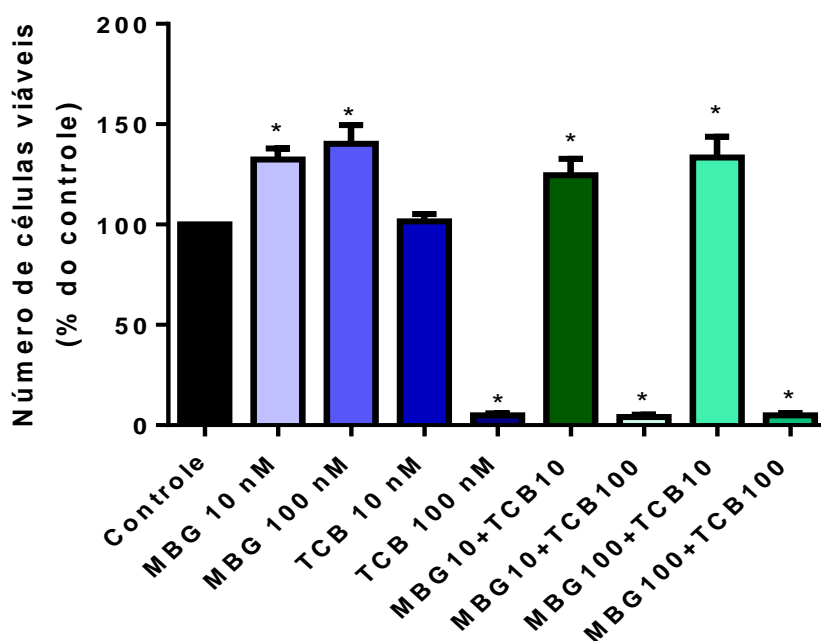


**Figura 20:** Efeito da telocinobufagina (TCB) ou marinobufagina (MBG) sobre a liberação de LDH. Células LLC-PK1 foram tratadas com TCB ou MBG 100 nM por 72 h. O Triton X-100 0,1% foi usado como controle positivo. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n=3$ .

#### 4.6. Avaliação da associação entre telocinobufagina e marinobufagina sobre a proliferação celular

Alguns trabalhos indicam que certos ECTs podem interferir no efeito de outros (MANUNTA et al, 2006; NESHER et al, 2010). Assim, avaliamos qual o

efeito final da associação entre telocinobufagina e marinobufagina sobre a proliferação celular através da contagem celular com exclusão de azul de Trypan. Tratamos as células LLC-PK1 com telocinobufagina e marinobufagina 10 e 100 nM, isolada e simultaneamente, para verificar se o efeito antiproliferativo de telocinobufagina, seria impedido com a adição de marinobufagina, já que a mesma induz proliferação celular. Podemos observar na Fig. 21 que tanto 10 nM quanto 100 nM de marinobufagina foram incapazes de inibir o efeito de telocinobufagina 100 nM.

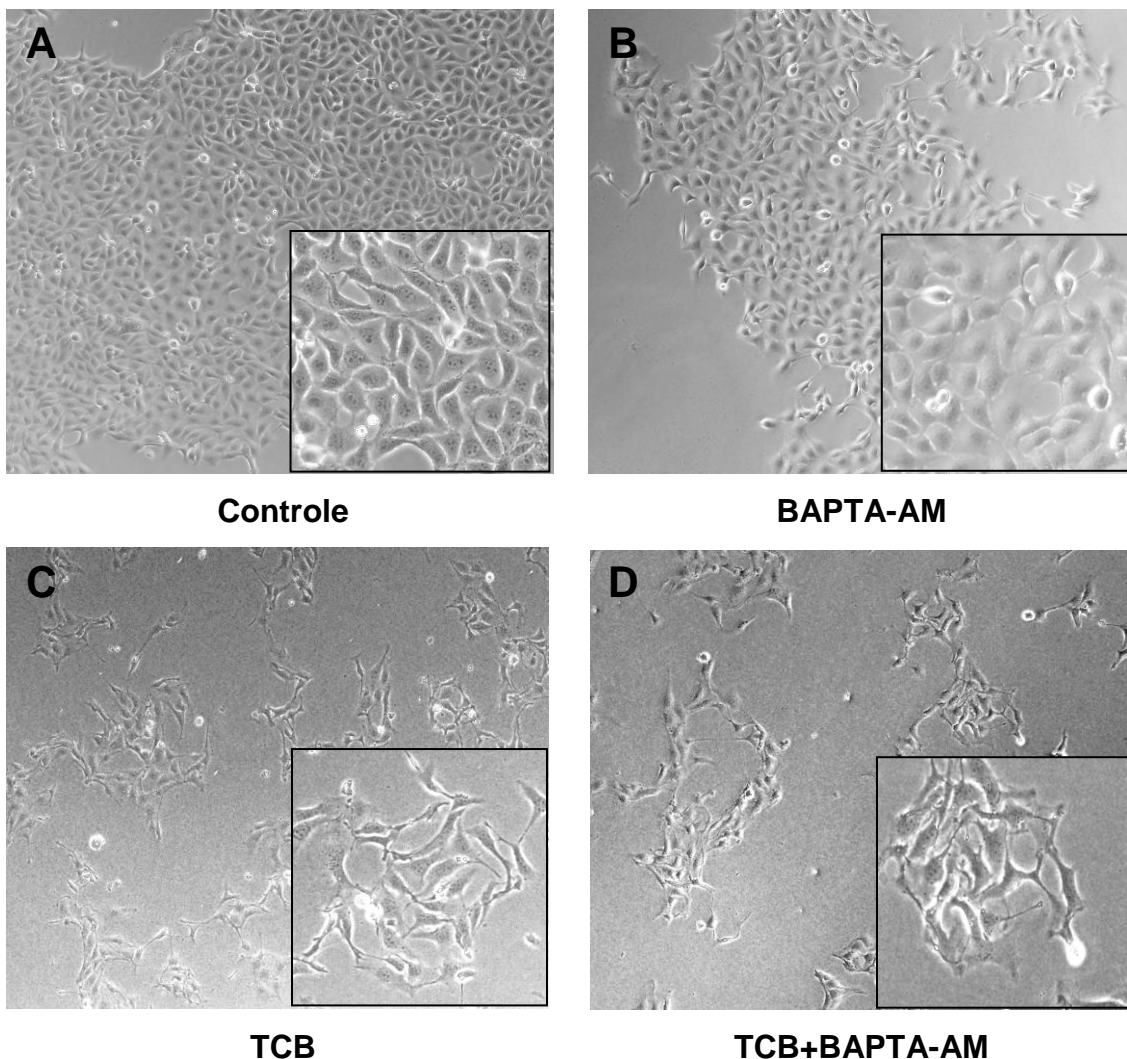


**Figura 21:** Avaliação do efeito do tratamento com marinobufagina (MBG) e telocinobufagina (TCB), isoladas ou combinadas, sobre a proliferação celular. Células LLC-PK1 tratadas com MBG e/ou TCB 10 ou 100 nM, por 72 h. \* $p < 0,05$  comparado ao controle. One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n=3$ .

#### 4.7. Avaliação da mediação do $Ca^{2+}$ intracelular sobre a morte celular induzida por telocinobufagina

É classicamente reconhecido que a inibição da atividade  $Na^+/K^+$ -ATPásica gera um relativo aumento da concentração intracelular de  $Na^+$  que, pela ação do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , resulta em aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  e efeitos celulares como, por exemplo, o inotropismo positivo (AKERA e

BRODY, 1978). Quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como o BAPTA-AM, podem bloquear esse efeito celular induzido pela inibição da atividade iônica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (HOSOI et al, 1997; PANAYIOTIDIS et al, 2010). Pré-incubamos as células com BAPTA-AM, que penetra na célula e é enzimaticamente convertido em BAPTA, incapaz de atravessar a membrana plasmática, e tratamos por 24 h com telocinobufagina 100 nM. Mesmo observando que o BAPTA-AM isolado (Fig. 22 B) apresenta algum efeito sobre as células controle, ele não conseguiu impedir o efeito da telocinobufagina (Fig. 22C e 22D).

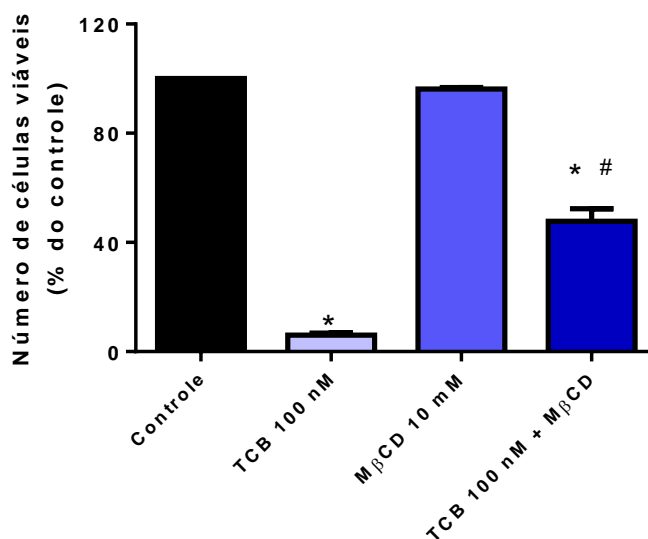


**Figura 22:** Efeito do BAPTA-AM sobre o tratamento com telocinobufagina (TCB). Microscopia de contraste de fase de células LLC-PK1 tratadas com veículo (A) ou BAPTA-AM (B) por 30 min seguido por TCB 100 nM por 24 h (C e D, respectivamente). Aumento de 200x (*inset*, 400x). n=2.

#### 4.8. Avaliação do efeito do tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase com função sinalizadora parece residir em cavéolas, que são invaginações vesiculares da membrana plasmática, ricas em colesterol e que apresentam a proteína caveolina como principal constituinte e marcador bioquímico (LIU et al, 2003; WANG et al, 2004; QUINTAS et al, 2010). Decidimos avaliar o efeito do tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), que sequestra colesterol da membrana e, conseqüentemente, desestrutura as caveolas (CASTAGNE et al, 2010).

As células LLC-PK1 foram tratadas com 10 mM M $\beta$ CD por 30 min, posteriormente o meio foi trocado e adicionou-se 1 mM M $\beta$ CD e 100 nM telocinobufagina por 72 h. Como indicado na Fig. 23, o tratamento com M $\beta$ CD preveniu parcialmente o efeito de telocinobufagina.



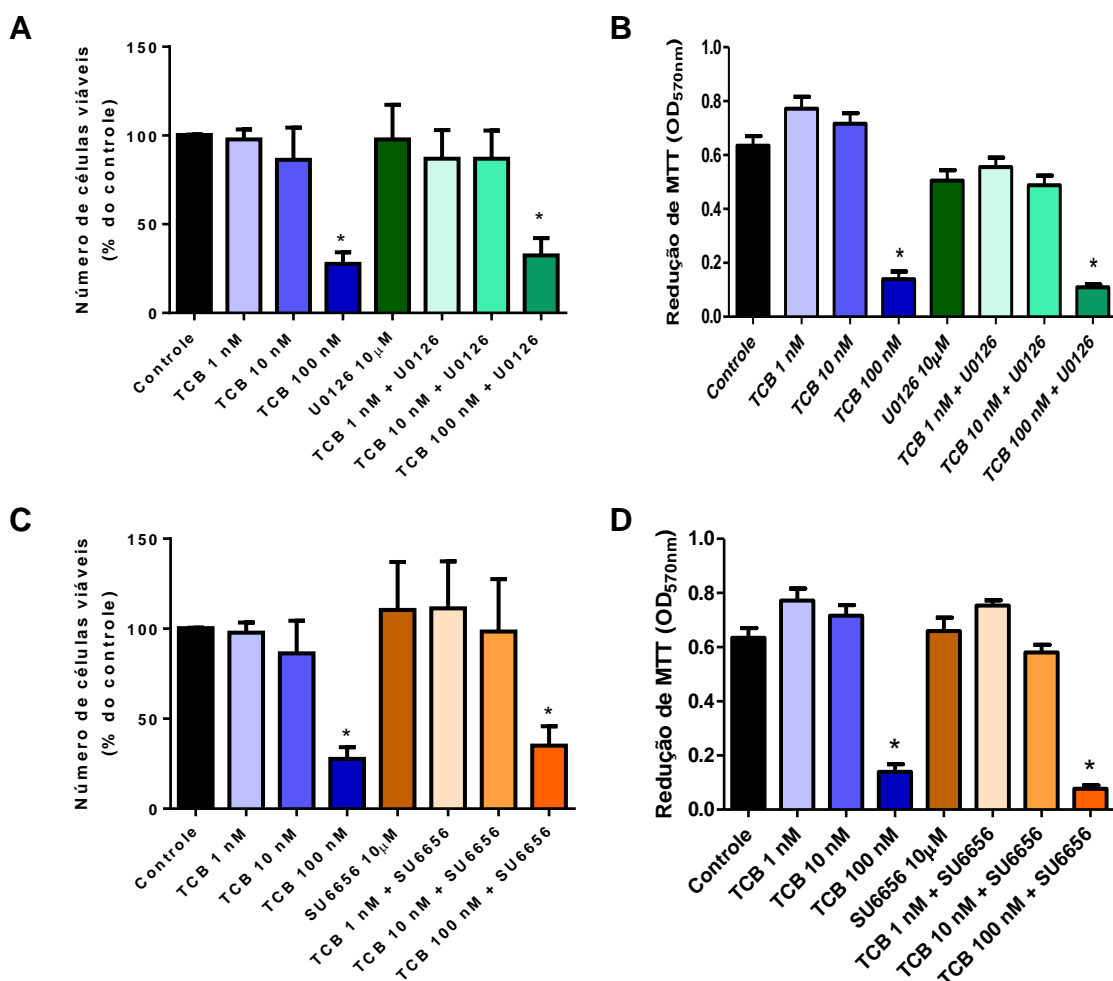
**Figura 23:** Efeito da redução de colesterol celular sobre o efeito antiproliferativo da telocinobufagina (TCB). Células LLC-PK1 foram tratadas com M $\beta$ CD 10 mM por 30 min e com TCB 100 nM por 72 h ou pré-tratadas com M $\beta$ CD 10 mM por 30 min e depois com TCB 100 nM por 24 h. \* $p < 0,05$  comparado ao controle. # $p < 0,05$  comparado ao TCB 100 nM, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n=3$ .

#### 4.9. Avaliação da via Src-MEK1/2-ERK1/2 na morte celular induzida por telocinobufagina

Mostramos anteriormente que a telocinobufagina diminui o número de células LLC-PK1, mas estimula a atividade de ERK1/2 (AMARAL, 2011), sendo

que esta última foi inibida por U0126 (Fig. 14). Assim, avaliamos se esta via de sinalização influenciaria a diminuição da proliferação e viabilidade celular através de ensaios de contagem celular com exclusão de azul de Trypan e ensaios de MTT. Da mesma forma como para marinobufagina, foram utilizados inibidores de MEK1/2 e de Src.

De forma contrária ao que ocorreu com a marinobufagina, após tratamento de 72 h, a telocinobufagina não promoveu qualquer alteração no número de células em relação ao controle, quando utilizada nas concentrações de 1 e 10 nM. Entretanto, na concentração de 100 nM, a telocinobufagina diminuiu o número de células viáveis. O tratamento com U0126 e SU6656 não preveniu esse efeito (Fig. 24).



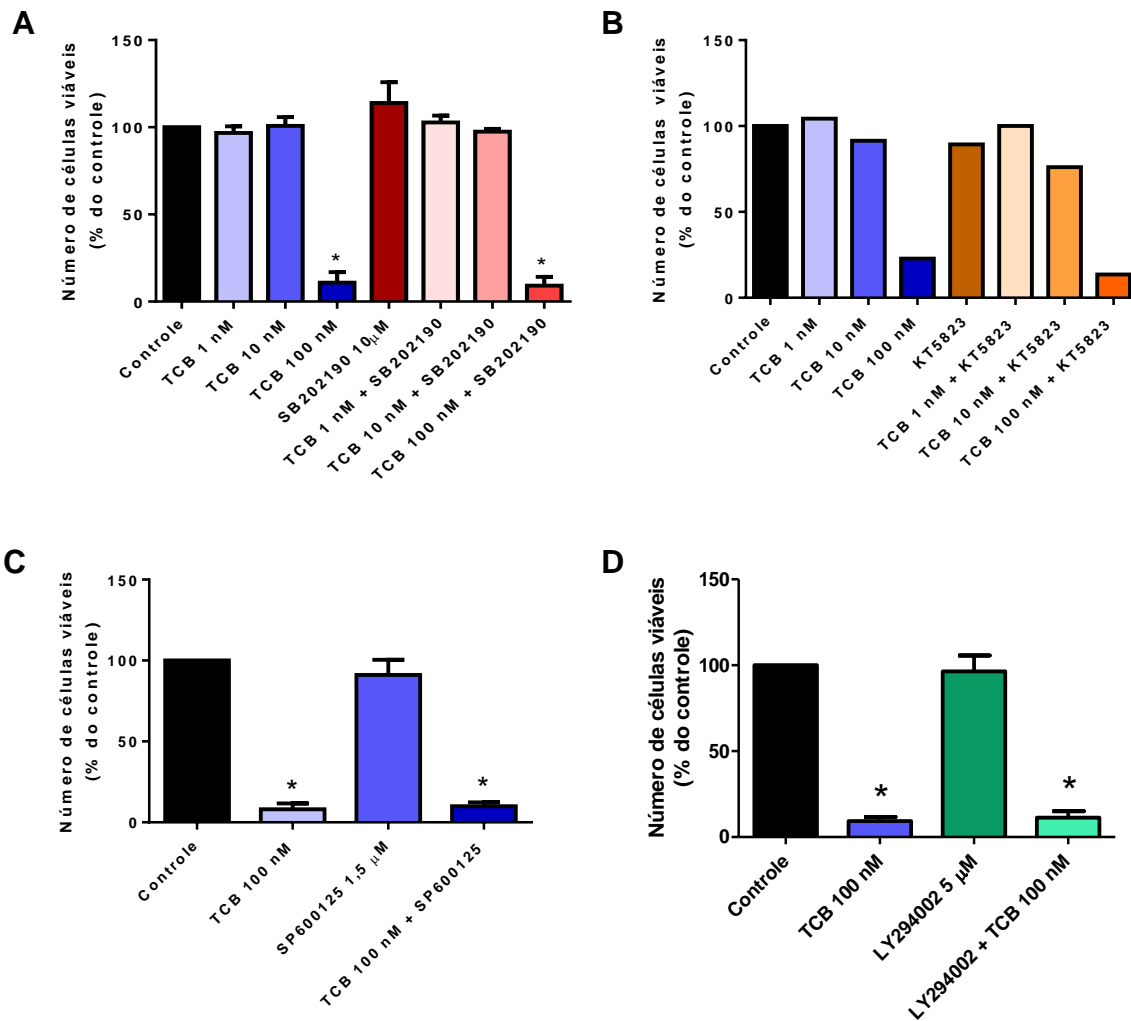
**Figura 24:** Inibição da via Src-ERK1/2 para avaliação do efeito da telocinobufagina (TCB) sobre a proliferação e viabilidade celular. Células LLC-PK1 tratadas com TCB 1-100 nM, com ou sem adição de U0126 10 μM (inibidor de MEK1/2) ou SU6656 10 μM (inibidor de Src), por 72 h. **A e C**, contagem de células; **B e D**, ensaio de MTT. \*p<0,05 comparado ao controle. One-way ANOVA, pós-teste de Tukey, n=4.

#### **4.10. Avaliação das vias p38, JNK1/2, PKG2 e PI3K-Akt na morte celular induzida por telocinobufagina**

Diversas cinases participam de diferentes funções como a proliferação, diferenciação, motilidade e apoptose em diferentes tipos celulares (PEARSON et al, 2001; MACCORKLE e TAN, 2005). Como JNK1/2 e p38 estão particularmente envolvidas com processos de morte celular e diferenciação, decidimos avaliar o possível envolvimento dessas vias nos efeitos observados com a telocinobufagina. Como a PKG2 foi considerado indutor de apoptose em células epiteliais (FALLAHIAN et al, 2011), decidimos avaliar também essa via.

Para isso, tratamos as células LLC-PK1 com inibidor de p38 (SB202190, 10  $\mu$ M), inibidor de JNK1/2 (SP600125, 1,5  $\mu$ M) e inibidor de PKG2 (KT5823, 2,5  $\mu$ M) e verificamos o efeito da telocinobufagina sobre o número de células, após 72 h. Como indicado na Fig. 25, nenhum dos inibidores preveniu o efeito da telocinobufagina.

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sinalizadora pode mediar a ativação de diferentes vias, além da via da ERK1/2. Uma dessas vias é a via PI3K/Akt/mTOR, que desempenha um importante papel na indução de hipertrofia, proliferação e/ou inibição de apoptose (LIU et al, 2007; KHUNDMIRI et al, 2007). Em geral, a via PI3K-Akt está envolvida no aumento da viabilidade e proliferação, existem algumas evidências de que a ativação da via induziria morte celular (HAMANAKA et al, 2005; WU et al, 2009). Com isso, também foi analisado o possível envolvimento dessa via sobre os efeitos dos bufadienolidos. As células LLC-PK1 foram tratadas com o inibidor de PI3K (LY2940025, 5  $\mu$ M) e verificamos o efeito dos bufadienolidos sobre a proliferação celular, após 72 h. O tratamento com LY2940025 não preveniu o efeito da telocinobufagina (Fig. 25D), o que seria esperado, já que a inibição de Akt já induziria inibição da proliferação.



**Figura 25:** Inibição das vias p38, JNK1/2 e PI3K para avaliação do efeito da telocinobufagina (TCB) sobre a proliferação celular. Células LLC-PK1 tratadas com TCB 1-100 nM, com ou sem adição de SB202190 10 μM (inibidor de p38, **A**), KT5823 2,5 μM (inibidor de PKG2, **B**), SP600125 1,5 μM (inibidor de JNK1/2, **C**) ou LY294002 5 μM (inibidor de PI3K, **D**) por 72 h. \* $p < 0,05$  comparado ao controle. One-way ANOVA, pós-teste de Tukey,  $n=3$ , exceto **B**,  $n=1$ .

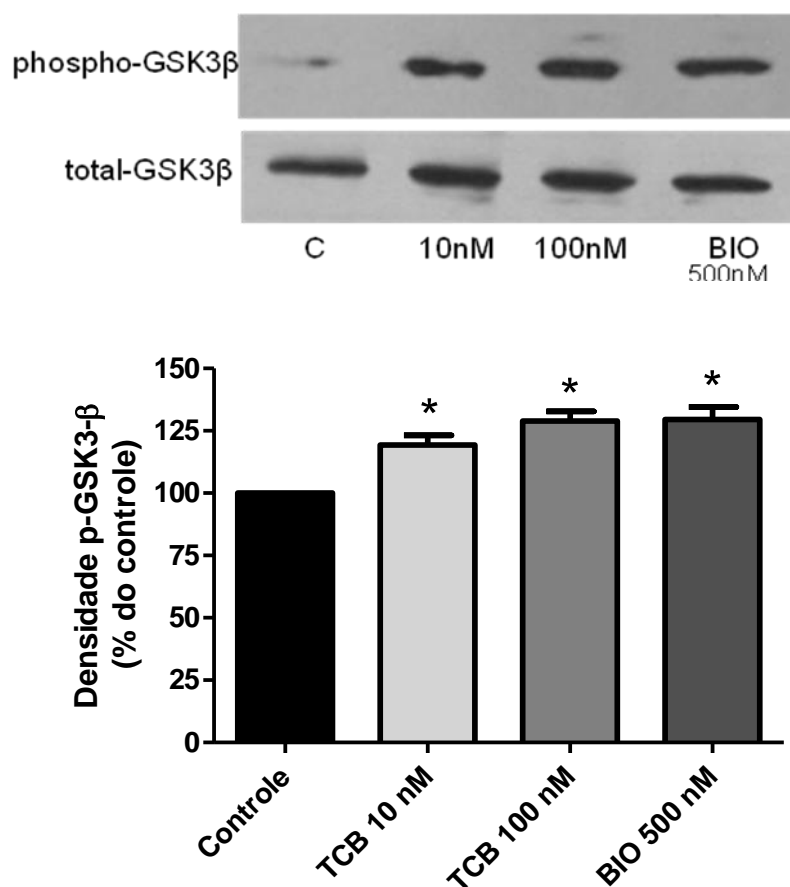
#### 4.11. Efeito do tratamento com telocinobufagina sobre a via da GSK3-β

Já foi visto que outro bufadienolido, a cinobufagina, é capaz de inibir a via da GSK3-β, levando a inibição de NF-κB, promovendo morte de células de osteosarcoma (Yin et al, 2013). Baseados neste dado, decidimos verificar o possível envolvimento da via da GSK3-β sobre os efeitos da telocinobufagina.

As células LLC-PK1 foram tratadas com 10 e 100 nM telocinobufagina e 500 nM BIO (inibidor de GSK3-β) por 15 min, para análise de Western blot. telocinobufagina 10 e 100 nM foram capazes de inibir GSK3-β, ou seja,

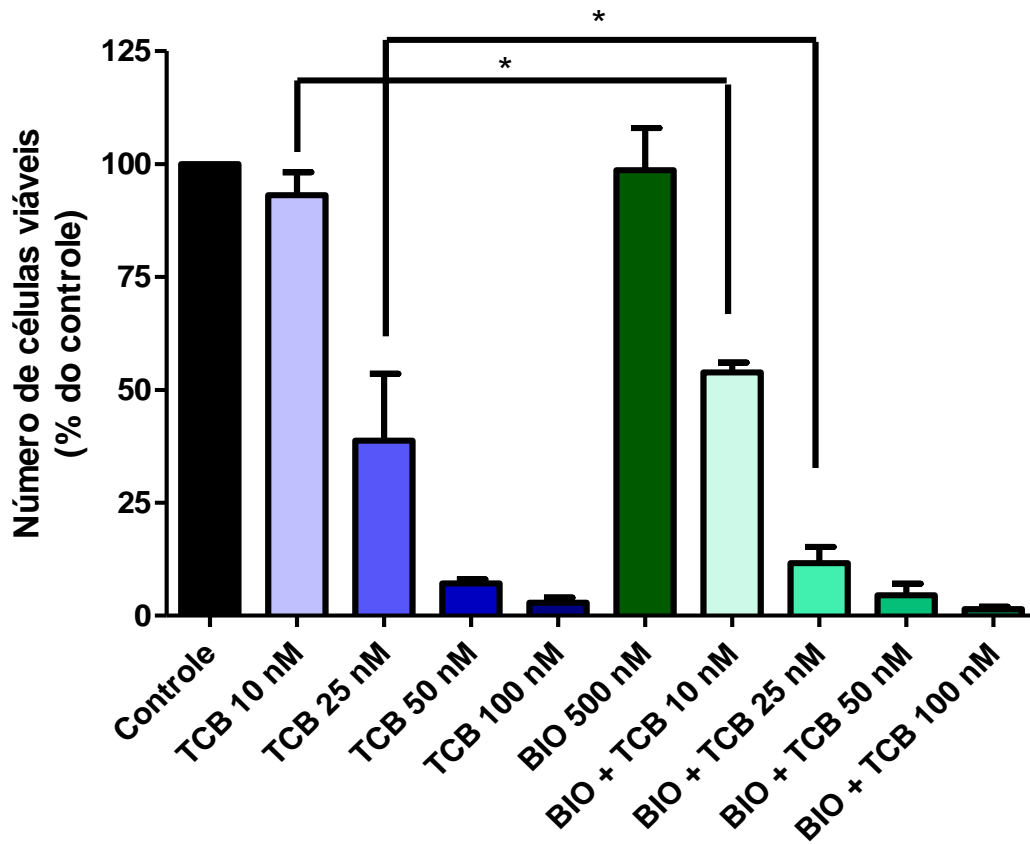


aumentar a forma fosforilada desta cinase. Essa inativação ocorreu de forma semelhante ao ocorrido após o tratamento com BIO 500 nM (Fig. 26).



**Figura 26:** Efeito da telocinobufagina (TCB) sobre GSK3- $\beta$  fosforilada (p-GSK3- $\beta$ ) e total. Células LLC-PK1 foram tratadas com TCB 10 e 100 nM, com ou sem a adição de BIO (inibidor de GSK3- $\beta$ ) 500 nM por 15 min. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, One-way ANOVA, pós-teste Tukey,  $n=3$ .

Em seguida, tentamos avaliar o efeito da inibição da atividade GSK3- $\beta$  sobre a proliferação celular. Para tanto, avaliamos o efeito de BIO 500 nM sozinho e na presença de diferentes concentrações de telocinobufagina, sendo algumas insuficientes para produzir por si só a inibição da GSK3- $\beta$ . As células foram tratadas com 500 nM BIO ou com 10, 25, 50 e 100 nM telocinobufagina por 72 h, para análise de proliferação celular. Enquanto o BIO não tem efeito próprio, ele aumenta a morte em células tratadas com telocinobufagina nas concentrações de 10 e 25 nM (Fig. 27), indicando um efeito potencializador.



**Figura 27:** Inibição da via GSK3- $\beta$  para avaliação do efeito da telocinobufagina (TCB) sobre a proliferação celular. Células LLC-PK1 tratadas com TCB 10, 25, 50 e 100 nM com ou sem a adição de BIO (inibidor de GSK-3 $\beta$ ) 500 nM por 72 h, n=2.

# Discussão

---

---

Com a nova função estabelecida para a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a descoberta de que alguns ECTs (cardenolidos e bufadienolidos) são secretados por diversos mamíferos, inclusive pelos seres humanos, de forma fisiológica e em alguns processos patológicos, sendo ainda obscuros os efeitos dessa produção endógena, surgiu o interesse de investigar e comparar a capacidade de diferentes bufadienolidos em inibir a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e de atuarem na via de sinalização mediada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Para isso, utilizamos o bufadienolidos marinobufagina e telocinobufagina, substâncias estruturalmente semelhantes.

Durante o trabalho que desenvolvemos durante o Mestrado neste Programa de Pós-Graduação (Amaral, 2011), verificamos que o bufadienolido telocinobufagina foi capaz de inibir a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica com padrão semelhante ao do cardenolido ouabaína, porém a marinobufagina teve uma potência inibitória cerca de 10 vezes menor. Da mesma forma, os dois ativaram a via de sinalização da ERK1/2, sendo a ativação produzida pela marinobufagina mais intensa que a ativação produzida por telocinobufagina. Além disso, a marinobufagina conseguiu ativar a sinalização em concentrações que não afetam a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica (1-100 nM), sendo, portanto, a que melhor conseguiu dissociar os efeitos de inibição da bomba e ativação de sinalização. Vale ressaltar que já foi observado para alguns ECTs que os efeitos regulatórios sobre a via de sinalização podem ocorrer em concentrações menores do que aquelas que exercem efeito sobre a atividade enzimática da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (SAUNDERS e SCHEINER-BOBIS, 2004; KOTOVA et al, 2006; KULIKOV et al, 2007; KARPOVA et al, 2010).

### **5.1. Efeitos de bufadienolidos sobre o número de células**

Como estes dois bufadienolidos promovem ativação da cascata Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2, verificamos o efeito dos mesmos sobre a proliferação celular da linhagem LLC-PK1, ou seja, verificamos o efeito celular da ativação da via. Ao avaliarmos os efeitos desses esteroides sobre a proliferação (contagem celular) de células LLC-PK1, evidenciamos efeitos contrários, já que a marinobufagina estimula a proliferação celular em concentrações de 1, 10 e 100 nM, que são capazes de ativar ERK1/2, enquanto a telocinobufagina não

tem efeito nas concentrações de 1 e 10 nM ou mesmo reduz a proliferação em 100 nM. Resultados semelhantes ao da telocinobufagina foram observados para a bufalina, outro bufadienolido, em alguns tipos de células normais, como as endometriais humanas (NASU et al, 2005) e endoteliais bovinas (LEE et al, 1997). Além disso, é importante ressaltar que a potência citotóxica da telocinobufagina é maior que a da marinobufagina, em linfócitos humanos (CUNHA-FILHO et al, 2010).

Esses resultados sugeriram que esses compostos apresentam seletividade funcional, ou seja, geram efeitos diferentes apesar de atuarem no mesmo e único receptor, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Com base nesses dados, surgiu o interesse de tentar compreender os mecanismos relacionados às diferenças dos efeitos celulares produzidos pelos bufadienolidos endógenos, marinobufagina e telocinobufagina.

## **5.2. Ativação da via da ERK1/2**

Já tínhamos visto que estes dois bufadienolidos eram capazes de ativar a via da ERK1/2, via sabidamente associada com diferentes funções celulares, como a proliferação (PEARSON et al, 2001). Desta forma, decidimos avaliar a possibilidade do envolvimento desta via de sinalização nos efeitos observados com o tratamento de marinobufagina e telocinobufagina. Inicialmente verificamos o efeito da inibição de MEK1/2, uma MAP cinase cinase que ativa ERK1/2, sobre a densidade de ERK1/2 fosforilada em células LLC-PK1. A marinobufagina e, com menor intensidade, a telocinobufagina foram capazes de ativar rapidamente a ERK1/2 (AMARAL, 2011) efeito que foi prevenido com a inibição de MEK1/2.

Decidimos inibir dois pontos da via de sinalização da ERK1/2, as proteínas Src e MEK1/2, e verificar o efeito sobre a proliferação celular após tratamento com os bufadienolidos. A marinobufagina induziu proliferação celular em 72 h e esse efeito foi prevenido após inibição de Src e de MEK1/2, mostrando que essa via de sinalização está envolvida com os efeitos proliferativos deste bufadienolido (fig. 27). Nota-se que já havia sido relatado um efeito proliferativo mediado por essa via para o cardenolido ouabaína em LLC-PK1 (TIAN et al, 2009), assim como em outros tipos celulares, como

células de músculo liso vascular (AYDEMIR-KOKSOY et al, 2001; ABRAMOWITZ et al, 2003; LI et al, 2007) e de próstata (CHUEH et al, 2001), fibroblastos (QUINTAS et al, 2010; WINNICKA et al, 2010) e em células epiteliais renais (DMITRIEVA e DORIS, 2003; KHUNDMIRI et al, 2006).

Por outro lado, o mesmo não foi verificado com a telocinobufagina, que promoveu redução do número de células em 100 nM. Este efeito não foi prevenido pela inibição de Src ou MEK1/2, indicando que essa via não estaria envolvida com os efeitos antiproliferativos da TCB.

### **5.3. Efeitos dos bufadienolidos sobre a morte celular**

Como a telocinobufagina diminuiu o número de células, decidimos analisar a possibilidade de estar ocorrendo morte celular. Para isso, realizamos ensaios de análise do ciclo celular, de viabilidade celular pela expressão das proteínas Bax e Bcl2, e de liberação de LDH.

A análise do ciclo celular mostrou aumento do número de células nas fases sub-G0 e S e diminuição do número de células na fase G2/M. O aumento de células na fase Sub-G0 revela fragmentação do DNA e sugere morte celular por apoptose. O aumento na fase S parece ocorrer para manter as células com possível dano nessa fase, impedindo que elas avancem para mitose, e com isso diminuindo a produção de células com danos, possivelmente como mecanismo de reparo. Ao detectar um erro durante a duplicação do DNA (fase S), a célula não mais seguiria para a mitose, mas sim, favoreceria a sua apoptose (ORMEROD, 2002). Esse resultado foi corroborado pela microscopia de fluorescência com células incubadas com o corante de ácidos nucleicos Hoechst, que emite fluorescência azul quando ligado ao DNA de dupla-fita. Após tratamento com telocinobufagina, verificamos alterações morfológicas como condensação de cromatina (núcleo picnótico), características de processo apoptótico. Associado a isso, ao analisarmos a expressão de proteínas associadas à apoptose, verificamos um aumento da proteína Bax, pró-apoptótica, e diminuição da proteína Bcl-2, anti-apoptótica, indicando que ocorre apoptose na presença de 100 nM deste bufadienolido. O contrário foi observado com marinobufagina na mesma concentração, resultado que está de acordo com o aumento da proliferação celular. Esses resultados corroboram a

hipótese da diminuição no número de células ser devido à apoptose causada por telocinobufagina. Salientamos que os trabalhos de investigação dos efeitos desse bufadienolido são raros, apesar dessa substância ter sido identificada como um ECT endógeno em humanos (KOMIYAMA et al, 2005). Para tentar excluir a possibilidade de necrose celular, realizamos experimento de liberação de LDH, e verificamos que a telocinobufagina não aumenta a liberação de lactato desidrogenase, característica de processo apoptótico.

Atualmente, diversos trabalhos têm sido realizados no intuito de avaliar o potencial citotóxico de ECTs em células tumorais (WANG et al, 2012). O efeito antiproliferativo e apoptótico dessas substâncias foi registrado em câncer de mama (LOPEZ-LAZARO et al, 2005), próstata (HUANG et al, 2004), melanoma (NEWMAN et al, 2006), pulmão (MIJATOVIC et al, 2007), pâncreas (NEWMAN et al, 2007), leucemia (RAGHAVENDRA et al, 2007), neuroblastoma (KULIKOV et al, 2007) e adenocarcinoma renal (LOPEZ-LAZARO et al, 2005) e parece envolver a ativação de cascatas de sinalização mediadas pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ . Entretanto, outros mecanismos também são considerados, como a própria inibição da enzima. Alguns trabalhos mostram que pode haver alteração da atividade e/ou expressão da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  em algumas linhagens (MIJATOVIC et al, 2007). Um dado muito interessante dos ECTs é que eles apresentam efeitos diferentes nas células normais e nas células tumorais, pois podem ser inativos/proliferativos em células normais e causar a morte das células tumorais (XIE et al, 2002; MCCONKEY et al, 2000; MIJATOVIC et al, 2006; TIAN et al, 2009). Enquanto os dados conhecidos até então revelam que diferentes células podem ter destinos distintos sob a ação de ECTs, ressaltamos que nosso trabalho é, até onde sabemos, o primeiro a mostrar efeitos opostos de ECTs em um mesmo tipo celular.

#### **5.4. Envolvimento do cálcio intracelular**

A inibição da função clássica transportadora de íons da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  reconhecidamente provoca a inibição do efluxo ativo de  $\text{Na}^+$ , aumento da sua concentração intracelular, resultando indiretamente no aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  via o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (AKERA e BRODY, 1978). A sobrecarga intracelular do íon  $\text{Ca}^{2+}$  é um notório gatilho de processos de morte

celular, particularmente a apoptose (ORRENIUS et al, 2003). Contudo, ao utilizar o quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA-AM, não observamos alteração do perfil de atividade de telocinobufagina sobre as células LLC-PK1, indicando que o efeito deve ser por modulação de vias de sinalização e não alteração do fluxo iônico. Este resultado é coerente com a concentração de telocinobufagina usada, 100 nM, que avaliamos ser capaz de inibir em torno de 25% da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica de rim de porco (AMARAL, 2011), sendo talvez insuficiente para gerar uma alteração significativa da concentração global de  $\text{Na}^+$ . Esta explicação apoia-se em alguns dados: (1) a ouabaína, que apresentou mesma potência inibitória que a telocinobufagina sobre a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica renal, estimula a proliferação de LLC-PK1 na concentração de 100 nM (AMARAL, 2011); (2) 100 nM de ouabaína não é capaz de modificar a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  em células LLC-PK1 (CAI et al, 2008); (3) Linhagens estáveis de células LLC-PK1 com *knockdown* da isoforma  $\alpha 1$  que chegam a cerca de 45% (A4-11) ou mesmo 8% (PY-17) da expressão de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase comparada com a LLC-PK1 são viáveis e não apresentam alterações morfológicas significativas (LIANG et al, 2007), demonstrando a grande capacidade de reserva da bomba de  $\text{Na}^+$  nessas células.

### **5.5. Localização na membrana e cascata de sinalização**

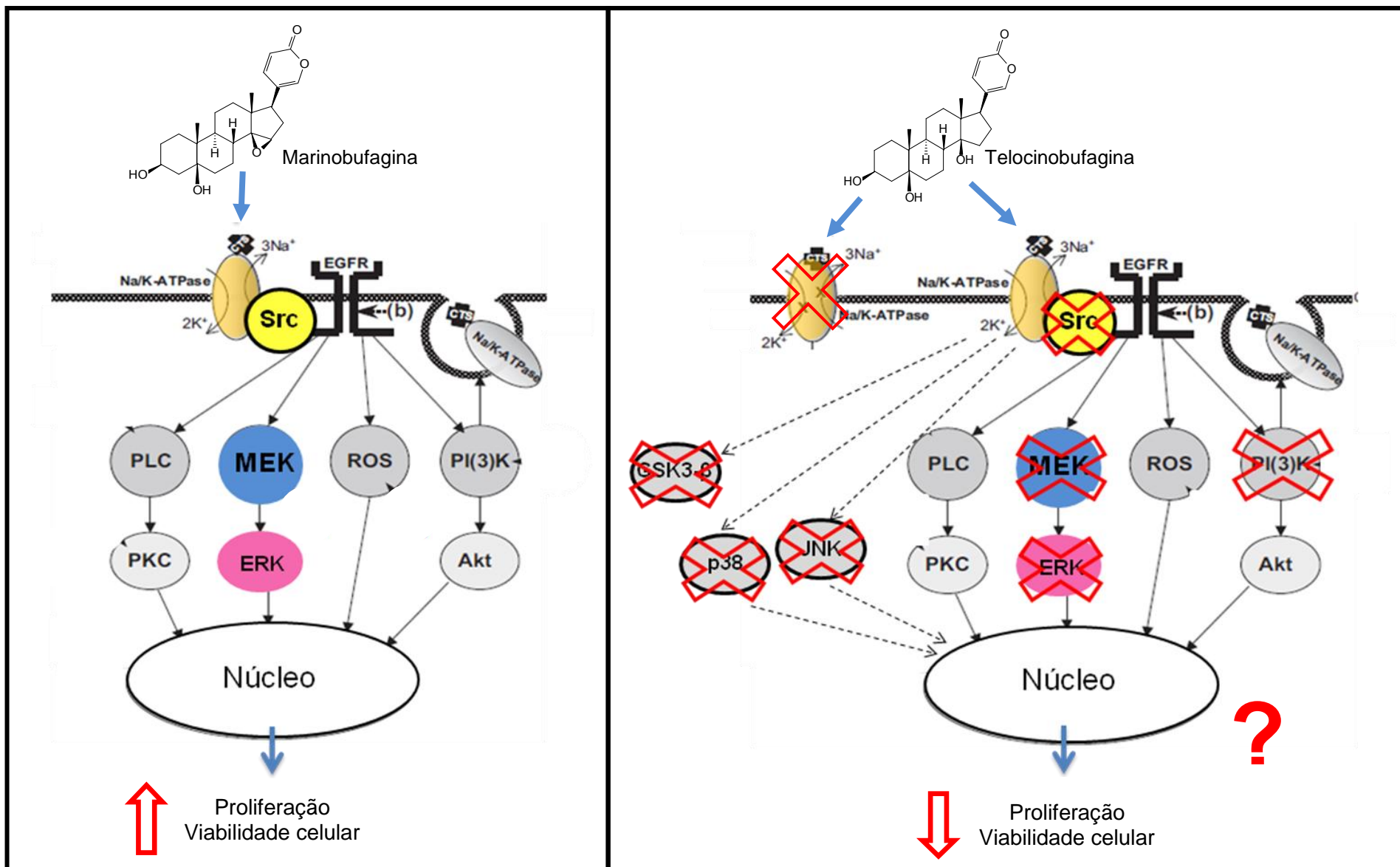
Diversos estudos mostram que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase com função sinalizadora residiria principalmente em caveolas, invaginações vesiculares da membrana plasmática ricas em colesterol (LIU et al, 2003; WANG et al, 2004; QUINTAS et al, 2010). Nós vimos que o efeito do tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), que sequestra colesterol da membrana e consequentemente desestrutura as caveolas, preveniu parcialmente o efeito de telocinobufagina, indicando que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sinalizadora localizada nesses domínios específicos seria importante para o efeito deste ECT.

A sinalização por meio de interações proteína-proteína mediada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pode ser independente de Src, como visto para PI3K-Akt (LIU et al, 2007; WU et al, 2013). Desta forma, analisamos outras possíveis vias de sinalização envolvidas, com o intuito de tentar desvendar o possível mecanismo responsável pelo efeito apoptótico da telocinobufagina.



Escolhemos as vias da p38 e JNK1/2, outras duas MAP cinases assim como a ERK, também conhecidas como SAP cinases (*stress-activated protein kinases*), pois são ativadas por estímulos diferentes da ERK1/2 e estão envolvidas com processos de degeneração e morte celular (PEARSON et al, 2001; PIMIENTA e PASCUAL, 2007). Ademais, alguns trabalhos já evidenciaram que a ouabaína é capaz de gerar morte celular pela ativação de p38 em células renais (AKIMOVA et al, 2009) e a cinobufagina em células de mieloma múltiplo (BAEK et al, 2015). Em células de câncer de pulmão não-pequenas, a ouabaína induz morte pela ativação de JNK1/2 (TRENTI et al, 2014) mecanismo também responsável pelo efeito da bufalina em células de câncer de colon (XIE et al, 2011). A via PI3K/Akt/mTOR, apesar de ser mais notória como promotora de viabilidade e proliferação celular (LIU et al, 2007; KHUNDMIRI et al, 2007), também já foi imputada como indutora de morte celular (HAMANAKA et al, 2005; WU et al, 2009). PKG2 foi considerada indutora de apoptose em células epiteliais (FALLAHIAN et al, 2011). Nossos resultados revelaram que nenhuma dessas vias estaria envolvida com o efeito da telocinobufagina.

Um trabalho realizado por YIN e colaboradores (2013) demonstrou que a cinobufagina, outra substância da classe dos bufadienolidos, promove inibição de GSK-3 $\beta$  em células de osteosarcoma, induzindo apoptose. O tratamento com inibidor de GSK-3 $\beta$  potencializava o efeito apoptótico. Com base nisso, tentamos avaliar o possível envolvimento da via da GSK-3 $\beta$  no efeito de telocinobufagina. A telocinobufagina, assim como a cinobufagina, também inibe GSK-3 $\beta$ . Além disso, o inibidor padrão de GSK-3 $\beta$ , BIO, potencializou o efeito da telocinobufagina, isto é, concentrações não-tóxicas de telocinobufagina foram capazes de reduzir o número de células viáveis quando associadas ao BIO. Por outro lado, o inibidor de GSK-3 $\beta$  sozinho não foi capaz de gerar morte celular, o que parece reduzir a importância dessa via para o efeito da telocinobufagina.



**Figura 28:** Efeito dos bufadienolidos sobre vias de sinalização celular. Marinobufagina estimula proliferação e viabilidade celular através de ativação da via Src/MEK/ERK, enquanto Telocinobufagina promove efeito contrário, por mecanismo diferente, ainda não estabelecido. X: inibição das vias para investigação de mecanismos.

## 5.6. Bufadienolidos e seletividade funcional

O termo seletividade funcional foi recentemente formulado na tentativa de explicar fenômenos que não podem ser entendidos à luz dos conceitos farmacológicos tradicionais. Um desses conceitos considera que a especificidade da resposta farmacológica se dá através da interação entre o ligante e o receptor, entidade macromolecular presente na célula e responsável pela deflagração do efeito. Os ligantes podem assim ser caracterizados pela sua afinidade ao receptor e eficácia, ou seja, a capacidade de geração da resposta. Nesse contexto, a classificação em agonistas (plenos, parciais ou inversos) e antagonistas foi criada considerando a eficácia um parâmetro independente do sistema (célula), sendo constante para um determinado complexo ligante-receptor (KENAKIN e WILLIAMS, 2014).

Este conceito vem sendo desafiado nos últimos anos, particularmente por estudos de receptores acoplados a proteína G que evidenciam que alguns ligantes apresentam respostas diferentes mediadas pelo mesmo e único receptor, numa mesma célula, dependendo do sistema (URBAN et al, 2007; KENAKIN, 2011). Neste contexto, o ligante teria a propriedade de induzir (em sintonia com a teoria do ajuste induzido, proposta por KOSHLAND em 1958) ou selecionar (em sintonia com a teoria da seleção conformacional, proposta por BURGEN em 1998) uma conformação do receptor que poderia ou não resultar na transdução de sinais intracelulares. Ou seja, podendo o receptor ser estabilizado pelo ligante em diferentes conformações termodinamicamente favoráveis, múltiplas possibilidades de ativação (ou de inativação) de vias de sinalização seriam esperadas (URBAN et al, 2007; KENAKIN, 2011).

Com a série de possibilidades hoje conhecidas em relação ao mecanismo de ação e efeito dos ECTs, o conceito de seletividade funcional deve ser considerado para ligantes da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Mais que isso, a descoberta de vários ECTs endógenos em mamíferos torna difícil acreditar que eles sejam produzidos para promover os mesmos efeitos celulares (NESHER et al, 2007). Em nossos resultados, verificamos que os bufadienolidos TCB e MBG produzem efeitos divergentes (tabela 1).

**Tabela 1:** Efeitos celulares divergentes dos bufadienólidos TCB e MBG 100 nM

	Número de células	MTT	Ca <sup>2+</sup> intracelular	Bax/Bcl2	LDH	Inibição NKA
<b>Telocinobufagina 100 nM</b>	↓	↓	–	↑	–	≈25%
<b>Marinobufagina 100 nM</b>	↑	↑	ND	↓	–	–

↑ aumento; ↓ diminuição; – sem efeito; ND: não determinado; NKA: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

De fato, alguns poucos trabalhos com ECTs apontam para isso. Por exemplo, PAMNANI e colaboradores (1991) mostraram que a bufalina, mas não a ouabaína, produz um efeito cronotrópico positivo em ratos. Ademais, a bufalina é muito mais natriurética e diurética do que a ouabaína, apesar delas inibirem a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica com a mesma potência. Nós mostramos que essa discrepância ocorra pela capacidade da bufalina ativar a via Src-ERK1/2 (ARNAUD-BATISTA et al, 2012), responsável pela endocitose da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase basolateral do epitélio renal (LIU et al, 2004). Um outro exemplo clássico é da digoxina, que impede o efeito hipertensor da ouabaína administrada cronicamente e pode reduzir a pressão arterial quando administrada sozinha (HUANG et al, 1999; MANUNTA et al, 2000). A ouabaína em baixas doses retarda o efeito tóxico da digoxina e da bufalina em ensaios de Langendorff com coração de cobaias, e parece envolver mecanismos de sinalização intracelular (NESHER et al, 2010). Vários ECTs, incluindo a digoxina, levam a endocitose inespecífica de proteínas de membrana em células NT2 e esse efeito é antagonizado pela ouabaína (FELDMANN et al, 2007).

Nossos resultados demonstram que os ECTs, neste caso bufadienólidos com características estruturais extremamente similares e identificados como esteroides endógenos em mamíferos, apresentam efeitos distintos por diferentes mecanismos de ação.

# Referências

---

---

ABRAMOWITZ J, DAI C, HIRSCHI KK, DMITRIEVA RI, DORIS PA, LIU L, AND ALLEN JC. Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. **Circulation** 108: 3048-3053, 2003.

AIZMAN O, UHLEN P, LAL M, BRISMAR H, APERIA A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98:13420-13424, 2001.

AKERA T, BRODY TM. The role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the inotropic action of digitalis. **Pharmacol Rev.** 29:187–220, 1978.

AKIMOVA OA, LOPINA OD, RUBTSOV AM, GEKLE M, TREMBLAY J, HAMET P, ORLOV SN. Death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence for p38 MAPK-mediated Na<sub>i</sub><sup>+</sup>/K<sub>i</sub><sup>+</sup>-independent signaling. **Apoptosis.** 14(11):1266-73, 2009.

AMARAL LS. Avaliação do efeito de bufadienólídeos em novas vias de sinalização intracelular mediadas pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal/ICB/UFRJ, 2011.

APELL HJ. Structure-function relationship in P-type ATPases - a biophysical approach. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 150:1-35, 2003.

ARNAUD-BATISTA FJ, COSTA GT, OLIVEIRA IM, COSTA PP, SANTOS CF, FONTELES MC, UCHÔA DE, SILVEIRA ER, CARDI BA, CARVALHO KM, AMARAL LS, PÔÇAS ES, QUINTAS LEM, NOËL F, NASCIMENTO NR. Natriuretic effect of bufalin in isolated rat kidneys involves activation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Src kinase pathway. **Am J Physiol Renal Physiol.** 302(8):F959-66, 2012.

ARYSTARKHOVA E, WETZEL RK, ASINOVSKI NK, SWEADNER KJ. The gamma subunit modulates Na(+) and K(+) affinity of the renal Na,K-ATPase. **J Biol Chem.** 274(47):33183-5, 1999.

AYDEMIR-KOKSOY A, ABRAMOWITZ J, AND ALLEN J. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. **J Biol Chem** 276: 46605-46611, 2001.

BAEK SH, KIM C, LEE JH, NAM D, LEE J, LEE SG, CHUNG WS, JANG HJ, KIM SH, AHN KS. Cinobufagin exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects through the modulation ROS-mediated MAPKs signaling pathway. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** 37(3):265-73, 2015.

BAGROV AY, FEDOROVA OV, DMITRIEVA RI, HOWALD W, N., HUNTER A, P., KUZNETSOVA EA, SHPEN VM. Characterization of a urinary bufodienolide Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **Hypertension** 31:1097-1103, 1998.

BAGROV AY, SHAPIRO JI, FEDOROVA OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacol Rev.** 61(1):9-38, 2009.

BARWE SP, ANILKUMAR G, MOON SY, ZHENG Y, WHITELEGGE JP, RAJASEKARAN SA, RAJASEKARAN AK. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. **Mol. Biol. Cell.** 16:1082-1094, 2005.

BLANCO G, MERCER RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology Renal Physiology.** 275:F633-50, 1998

BLANCO G, SÁNCHEZ G, MELTON RJ, TOURTELLOTTE WG, MERCER RW. The alpha4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 48:1023-32, 2000

BLAUSTEIN MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. **Am. J. Physiol.** 264 (6 Pt 1):C1367-87, 1993.

BONNI A, BRUNET A, WEST AE, DATTA SR, TAKASU MA, GREEBERG ME. Cell survival promoter by the Ras-MAPK signaling pathway by transcriptiondependent and independent mechanisms. **Science.** 286:1358-1362, 1999.

CAI H, WU L, QU W, MALHOTRA D, XIE Z, SHAPIRO JI, LIU J. Regulation of apical NHE3 trafficking by ouabain-induced activation of the basolateral Na<sub>2</sub>-K<sub>2</sub>-ATPase receptor complex. **Am. J. Physiol.Cell Physiol.** 294, C555–C563, 2008.

CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase roductio cascades. **Nature.** 410:37-40, 2001.

CHUEH S, GUH J, CHEN, LAI M, AND TENG C. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. **J. Urol.** 66: 347-353, 2001.

COHEN AW, HNASKO R, SCHUBERT W, LISANTI MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. **Physiol Rev.** 84(4):1341-79, 2004.

CORNELIUS F, MAHMMOUD YA. Direct activation of gastric H,K-ATPase by N-terminal protein kinase C phosphorylation. Comparison of the acute regulation mechanisms of H,K-ATPase and Na,K-ATPase. **Biophys J.** 84(3):1690-700, 2003.

CROUCH NR, DU TOIT K, MULHOLLAND DA, DREWES SE. Bufadienolides from bulbs of *Urginea lydenburgensis* (Hyacinthaceae: Urgineoideae). **Phytochemistry.** 67(19):2140-5, 2006.



CUNHA FILHO GA, SCHWARTZ CA, RESCK IS, MURTA MM, LEMOS SS, CASTRO MS, KYAW C, PIRES OR JR, LEITE JR, BLOCH C JR, SCHWARTZ EF. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**. 45(6):777-82, 2005.

CUNHA-FILHO GA, RESCK IS, CAVALCANTI BC, PESSOA CO, MORAES MO, FERREIRA JR, RODRIGUES FA, DOS SANTOS ML. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**. 56(3):339-48, 2010.

DALY JW, NOIMAI N, KONGKATHIP B, KONGKATHIP N, WILHAM JM, GARRAFFO HM, KANEKO T, SPANDE TF, NIMIT Y, NABHITABHATA J, CHAN-ARD T. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon**. 44(8):805-15, 2004.

DEAN RB, NOONAN TR, HAEGE L, FENN WO. Permeability of erythrocytes to radioactive potassium. **J Gen Physiol**. 24(3):353-65, 1941.

DEVLIN TM. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. (Edgard Blücher), São Paulo, 6ª edição. 2007.

DMITRIEVA RI, BAGROV AY, LALLI E, SASSONE-CORSI P, STOCCO DM, DORIS PA. Mammalian Bufadienolide Is Synthesized From Cholesterol in the Adrenal Cortex by a Pathway That Is Independent of Cholesterol Side-Chain Cleavage. **Hypertension** 36:442-448, 2000.

DOBLE B, WOODGETT JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **J Cell Sci**. 116(Pt 7):1175-1186, 2003.

DONNET C, ARYSTARKHOVA E, SWEADNER KJ. Thermal denaturation of the Na,K-ATPase provides evidence for alpha-alpha oligomeric interaction and

gamma subunit association with the C-terminal domain. **J. Biol. Chem.** 276: 7357-65, 2001.

DUGO L, COLLIN M, THIEMERMANN C. Glycogen synthase kinase 3beta as a target for the therapy of shock and inflammation. **Shock.** 27(2):113-23, 2007.

ERREDE B, CADE RM, YASHAR BM, KAMADA Y, LEVIN DE, IRIE K, MATSUMOTO K. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. **Mol Reprod Dev.** 42:477-485, 1995.

FALLAHIAN F, KARAMI-TEHRANI F, SALAMI S, AGHAEI M. Cyclic GMP induced apoptosis via protein kinase G in oestrogen receptor-positive and – negative breast cancer cell lines. **FEBS J.** 278(18):3360-9, 2011.

FEDOROVA OV, ZERNETKINA VI, SHILOVA VY, GRIGOROVA YN, JUHASZ O, WEI W, MARSHALL CA, LAKATTA EG, BAGROV AY. Synthesis of an Endogenous Steroidal Na Pump Inhibitor Marinobufagenin, Implicated in Human Cardiovascular Diseases, Is Initiated by CYP27A1 via Bile Acid Pathway. **Circ Cardiovasc Genet.** 8(5):736-45, 2015.

FELDMANN T, GLUKMANN V, MEDVENEV E, SHPOLANSKY U, GALILI D, LICHTSTEIN D. Role of endosomal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and cardiac steroids in the regulation of endocytosis. **Am J Physiol Cel Physiol.** 293:C885–C896, 2007.

FERRANDI M, MANUNTA P, FERRARI P, BIANCHI G. The endogenous ouabain: molecular basis of its role in hypertension and cardiovascular complications. **Front Biosci.** 10:2472-7, 2005.

FORBUSH B. Cardiotonic steroid binding to Na,K-ATPase. **Curr. Top. Membr. Transp.** 19:167-201, 1983.

FRÉMIN C, MELOCHE S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. **J Hematol Oncol.** 3:8, 2010.

FREY N, OLSON EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. **Annu Rev Physiol.** 65:45-79, 2003.

GALANDRIN S, OLIGNY-LONGPRÉ G, BOUVIER M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. **Trends Pharmacol Sci.** 28(8):423-30, 2007.

GEERING K. Function of FXYD proteins, regulators of Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes.** 37: 387-92, 2005

GLOOR P. Experiential phenomena of temporal lobe epilepsy. Facts and hypotheses. **Brain.** 113 (Pt 6):1673-94, 1990.

GLYNN IM. All hands to the sodium pump. **J Physiol** 462:1-30, 1993.

GLYNN IM. The Enzymes of Biological Membranes. **A. Martonosi** (ed.), Plenum Press, New York, 2<sup>nd</sup> edition, Vol.3 p. 35-114. 1985.

GOLDIN SM. Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla. Reconstitution of the purified enzyme into a well defined in vitro transport system. **J Biol Chem.** 252(16):5630-42, 1977.

GOTO A e YAMADA K. Purification of endogenous digitalis-like factors from normal human urine. **Clin Exp Hypertens** 20:551-556, 1998.

GOTO A, ISHIGURO T, YAMADA K, ISHII M, YOSHIOKA M, EGUCHI C, SHIMORA M, SUGIMOTO T. Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 173:1093-1101, 1990.

GRIMES CA, JOPE RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. **Prog Neurobiol.** 65(4):391-426, 2001.

HAAS M, WANG H, TIAN J, XIE Z. Src-mediated inter-receptor crosstalk between the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. **J. Biol. Chem.** 277:18694-18702, 2002.

HABIBA A, BLANCO G, MERCER RW. Expression, activity and distribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase subunits during in vitro neuronal induction. **Brain Res.** 875(1-2):1-13, 2000.

HALLBERG B, RAYTER SI, DOWNWARD J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. **J. Biol. Chem.** 269:3913-3916, 1994.

HAMLYN JM, BLAUSTEIN MP, BOVA S, DU CHARME DW, HARRIS DW, MANDEL F, MATHEWS WR, LUDENS JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88:6259-6263, 1991.

HAMLYN JM, RINGEL R, SCHAEFFER J, LEVINSON PD, HAMILTON BP, KOWARSKI AA, BLAUSTEIN MP. A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase associated with essential hypertension. **Nature.** 300(5893):650-2, 1982.

HASLER U, CRAMBERT G, HORISBERGER JD, GEERING K. Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase beta subunit revealed by tryptophan scanning. **J. Biol. Chem.** 276(19):16356-16364, 2001.

HLIVKO JT, CHAKRABORTY S, HLIVKO TJ, SENGUPTA A, JAMES PF. The human Na,K-ATPase alpha 4 isoform is a ouabain-sensitive alpha isoform that is expressed in sperm. **Mol Reprod Dev.** 73(1):101-15, 2006.

HOSOI R, MATSUDA T, ASANO S, NAKAMURA H, HASHIMOTO H, TAKUMA K, BABA A. Isoform-specific up-regulation by ouabain of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in cultured rat astrocytes. **J Neurochem.** 69(5):2189-96, 1997.

HUANG BS, KUDLAC M, KUMARATHASAN R, LEENEN FH. Digoxin prevents ouabain and high salt intake-induced hypertension in rats with sinoaortic denervation. **Hypertension**. 34:733–738, 1999.

HUANG C, JACOBSON K, SCHALLER MD. MAP kinase and cell migration". **J. Cell Sci**. 117:4619-4628, 2004.

HUNTER T. Signaling--2000 and beyond. **Cell**. 100(1):113-27, 2000.

HUTCHINSON DA, MORI A, SAVITZKY AH, BURGHARDT GM, WU X, MEINWALD J, SCHROEDER FC. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. 104(7):2265-70, 2007.

INGLEY E. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. **Biochim Biophys Acta**. 1784(1):56-65, 2008.

JOPE RS, YUSKAITIS CJ, BEUREL E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochem Res**. 32(4-5):577-95, 2007.

JORGENSEN PL. Purification and Characterization of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase. V. Conformational Changes in the Enzyme Transitions between the Na-form and The K-form Studied With Tryptic Digestion as a Tool. **Biochim. Biophys. Acta**. 356:53-67, 1975.

JUILLIÈRE Y, SELTON-SUTY C. Digoxin therapy: A persisting interest despite contrary winds. **Arch Cardiovasc Dis**. 103(5):281-4, 2010.

KAPLAN JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu. Rev. Biochem**. 71:511-35, 2002.

KARPOVA LV, BULYGINA ER, BOLDYREV AA. Different neuronal Na(+)/K(+)-ATPase isoforms are involved in diverse signaling pathways. **Cell Biochem Funct.** 28(2):135-41, 2010.

KAWAMURA A, GUO J, ITAGAKI Y, BELL C, WANG Y, HAUPERT JR, G.T., MAGIL S, GALLAGHER RT, BEROVA N, NAKANISHI K. On the structure of endogenous ouabain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96:6654-6659, 1999.

KENAKIN T. Functional selectivity and biased receptor signaling. **J Pharmacol Exp Ther.** 336(2):296-302, 2011.

KHUNDMIRI SJ, AMIN V, HENSON J, LEWIS J, AMEEN M, RANE MJ, DELAMERE NA. Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway. **Am J Physiol Cell Physiol.** 293(3):C1171-1180, 2007.

KHUNDMIRI SJ, METZLER MA, AMEEN M, AMIN V, RANE MJ, AND DELAMERE NA. Ouabain induces Cell Proliferation through Calcium Dependent Phosphorylation of Akt (Protein Kinase B) in Opossum Kidney Proximal Tubule Cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** 291: C1247-C1257, 2006.

KOÇAK-TOKER N, AKTAN G, AYKAÇ-TOKER G. The role of Na,K-ATPase in human sperm motility. **Int J Androl.** 25(3):180-5, 2002.

KOMIYAMA Y, DONG XH, NISHIMURA N, MASAKI H, YOSHIKA M, MASUDA M, AND TAKAHASHI H. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure. **Clinical Biochemistry** 38: 36-45, 2005.

KOTOVA O, AL-KHALILI L, TALIA S, HOOKE C, FEDOROVA OV, BAGROV AY, CHIBALIN AV. Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. **J Biol Chem** 281(29):20085-94, 2006.

KULIKOV A, EVA A, KIRCH U, BOLDYREV A, SCHEINER-BOBIS G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochim Biophys Acta** 1768(7):1691-702, 2007.

LAREDO J, HAMILTON JP e HAMLIN JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata. **Biochem Biophys Res Commun.** 212:487-493, 1995.

LAREDO J, SHAH JR, HAMILTON BP, HAMLIN JM. Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells. In: *Na/K-ATPase and Related ATPases*, edited by Taniguchi K and Kayas S. Amsterdam: **Elsevier Science.** 671-679, 2000.

LAREDO J, SHAH JR, LU ZR, HAMILTON BP, HAMLIN JM. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. **Hypertension.** 29:401-407, 1997.

LE GALL M, CHAMBARD JC, BREITMAYER JP, GRALL D, POUYSSEGUR J. AND VANBOBERGHEN-SCHILLING E. The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. **Mol. Biol. Cell.** 11:1103-1112, 2000.

LEE DY, YASUDA M, YAMAMOTO T, YOSHIDA T, KUROIWA Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. **Life Sci.** 60(2):127-34, 1997.

LEWIS TS, SHAPIRO PS, AHN NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. **Adv Cancer Res.** 74:49-139, 1998.

LI M, WANG Q, GUAN L. Effects of ouabain on proliferation, intracellular free calcium and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells. **J Comp Physiol B** 177(5):589-95, 2007.

LI Z, XIE Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. **Eur J Physiol.** 457:635-644, 2009.

LIANG M, TIAN J, LIU L, PIERRE S, LIU J, SHAPIRO J, XIE ZJ. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **J. Biol. Chem.** 282:10585–10593, 2007.

LIU J, KESIRY R, PERIYASAMY SM, MALHOTRA D, XIE Z, SHAPIRO JI. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na-K-ATPase in LLCPK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. **Kidney Int.** 66:227–241, 2004.

LIU J, TIAN J, HAAS M, SHAPIRO JI, ASKARI A, XIE Z. Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations. **J Biol Chem.** 275(36):27838-44, 2000.

LIU L, MOHAMMADI K, AYNASHAR B, WANG H, LI D, LIU J, IVANOV AV, XIE Z, ASKARI A. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Am J Physiol Cell Physiol** 284: C1550-C1560, 2003.

LIU L, ZHAO X, PIERRE SV, ASKARI A. Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol** 293(5):C1489-97, 2007.

LIU J, LIANG M, LIU L, MALHOTRA D, XIE Z, SHAPIRO JI. Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1. **Kidney Int.** 67:1844–1854, 2005.



LIU L, ABRAMOWITZ J, ASKARI A, ALLEN JC. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 287:H2173–H2182, 2004.

LOPINA OD. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. **Biochemistry (Mosc).** 66(10):1122-31, 2001.

LOWETH AC, WILLIAMS GT, SCARPELLO JH, MORGAN NG. Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. **FEBS Lett.** 400(3):285-8, 1997.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-75, 1951.

LUCAS TF, AMARAL LS, PORTO CS, QUINTAS LEM. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells. **Reproduction.** 144(6):737-45, 2012.

MACCORKLE RA, TAN TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. **Cell Biochem Biophys.** 43(3):451-61, 2005.

MANUNTA P, HAMILTON J, ROGOWSKI AC, HAMILTON BP, HAMLIN JM. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. **Hypertens Res.** 23 Suppl:S77-85, 2000.

MCGRAIL KM, PHILLIPS JM, SWEADNER KJ. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. **J Neurosci.** 11(2):381-91, 1991.

MERCER RW, BIEMESDERFER D, BLISS DP JR, COLLINS JH, FORBUSH B 3RD. Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. **The Journal of Cell Biology** 121: 579-586, 1993

MIJATOVIC T, VAN QUAQUEBEKE E, DELEST B, DEBEIR O, DARRO F, KISS R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochim Biophys Acta** 1776(1):32-57, 2007.

MOBASHERI A, AVILA J, COZAR-CASTELLANO I, BROWNLEADER MD, TREVAN M, FRANCIS MJ, LAMB JF, MARTIN-VASSALLO P. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports** 20:51-91, 2000.

MOLKENTIN JD, DORN II GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annual Review of Physiology**. 63:391-426, 2001

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 65(1-2):55-63, 1983.

MÜLLER-EHMSSEN J, JUVVADI P, THOMPSON CB, TUMYAN L, CROYLE M, LINGREL JB, SCHWINGER RH, MCDONOUGH AA, FARLEY RA. Ouabain and substrate affinities of human Na(+)-K(+)-ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. 281(4):C1355-64, 2001.

NASU K, NISHIDA M, UEDA T, TAKAI N, BING S, NARAHARA H, AND MIYAKAWA I. Bufalin induces apoptosis and the G0/G1 cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. **Molecular Human Reproduction** 11: 817–823, 2005.

NESHER M, SHPOLANSKY U, ROSEN H, LICHTSTEIN D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. **Life Sci.** 80:2093-107, 2007.

NESHER M, SHPOLANSKY U, VIOLA N, DVELA M, BUZAGLO N, COHEN BEN-AMI H, ROSEN H, LICHTSTEIN D. Ouabain attenuates cardiotoxicity induced by other cardiac steroids. **Br J Pharmacol.** 160(2):346-54, 2010.

ORMEROD MG. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **J Immunol Methods.** 265(1-2):73-80, 2002.

ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 4(7):552–565, 2003.

PANAYIOTIDIS MI, FRANCO R, BORTNER CD, CIDLOWSKI JA. OUABAIN-induced perturbations in intracellular ionic homeostasis regulate death receptor-mediated apoptosis. **Apoptosis.** 15(7):834-49, 2010.

PARTON RG, SIMONS K. The multiple faces of caveolae. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8(3):185-94, 2007.

PATEL S, DOBLE B, WOODGETT JR. Glycogen Synthase Kinase-3 in Insulin and Wnt Signalling : a Double-edged Sword? **Biochem Soc Trans.** 32(Pt 5): 803-808, 2004.

PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU BE, KARANDIKAR M, BERMAN K, COBB MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrinol.** 22:153–183, 2001.

PEINEAU S, BRADLEY C, TAGHIBIGLOU C, DOHERTY A, BORTOLOTTO ZA, WANG YT, COLLINGRIDGE GL. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. **Br J Pharmacol.** 153(Suppl 1):S428-S437, 2008.

PETRICH BG, WANG Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. **Trends Cardiovasc Med.** 14(2):50-5, 2004.

PIERRE SV, SOTTEJEAU Y, GOURBEAU JM, SÁNCHEZ G, SHIDYAK A, BLANCO G. Isoform specificity of Na-K-ATPase-mediated ouabain signaling. **Am J Physiol Renal Physiol.** 294(4):859-866. 2008.

PIERRE SV, XIE Z. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. **Cell Biochem Biophys.** 46(3):303-16, 2006.

PIMIENTA G, PASCUAL J. Canonical and alternative MAPK signaling. **Cell Cycle.** 6(21):2628-32, 2007.

POUYSSÉGUR J, LENORMAND P. Fidelity and ciátio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. **Eur. J. Biochem.** 270:3291-3299, 2003.

PRASSAS I, DIAMANDIS EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides; **Nature Reviews Drug Discovery.** 7:926-935, 2008.

PU HX, SCANZANO R, BLOSTEIN R. Distinct regulatory effects of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase gamma subunit. **The Journal of Biological Chemistry.** 277(23):20270-20276, 2002.

QAZZAZ H, GOUDY SL, VALDES RJ. Deglycosylated products of endogenous digoxin-like immunoreactive factor in mammalian tissue. **J Biol Chem** 271:8731-8737, 1996.

QUINTAS LE, PIERRE SV, LIU L, BAI Y, LIU X, XIE ZJ. Alterations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. **J Mol Cell Cardiol.** 49(3):525-31, 2010.

RATES SMK, BRID, R. Heterosídeos Cardioativos. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G.,

MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. 5<sup>a</sup>.ed Porto Alegre/ Florianópolis: Universidade (UFRGS)/ Editora UFSC, p. 686-710, 2004.

REEVES AS, COLLINS JH, SCHWARTZ A. Isolation and characterization of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase proteolipid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 95:1591-1598, 1980.

REPKE K, PORTIUS HJ. Über die identität der ionenpumpen-ATPase in der zellmembran des herzskeletts mit einem digitalis rezeptorenzym. **Experientia**. 19:452-58, 1963.

RIGANTI C, CAMPIA I, KOPECKA J, GAZZANO E, DOUBLIER S, ALDIERI E, BOSIA A, GHIGO D. Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. **Curr Med Chem**. 18(6):872-85, 2011.

ROBINSON JD, FLASHNER MS. Modification of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-dependent ATPase by acetic anhydride and trinitrobenzene sulfonate: specific changes in enzymatic properties. **Arch Biochem Biophys**. 196:350-62, 1979.

ROUX PP, BLENIS J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol Mol Biol Rev**. 68(2):320-44, 2004.

SAUNDERS R, SCHEINER-BOBIS G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. **Eur J Biochem** 271(5):1054-62, 2004.

SCHNEIDER R, ANTOLOVIC R, KOST H, SICH B, KIRCH U, TEPEL M, ZIDEK W, SCHONER W. Proscillaridin A immunoreactivity: its purification, transport in blood by a specific binding protein and its correlation with blood pressure. **Clin. Exp. Hyperten**. 20:593-599, 1998.

SCHONER W, SCHEINER-BOBIS G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **Am J Cardiovasc Drugs.** 7(3):173-89, 2007.

SCHÖNFELD W, WEILAND J, LINDIG C, MASNYK M, KABAT MM, KUREK A, WICHA J, REPKE KR. The lead structure in cardiac glycosides is 5 beta, 14 beta-androstane-3 beta 14-diol. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 329(4):414-26, 1985.

SEYA K, ONO K, FUJISAWA S, OKUMURA K, MOTOMURA S, FURUKAWA K. Cytosolic Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis in rat cardiomyocytes via mitochondrial NO-cGMP-protein kinase G pathway. **J Pharmacol Exp Ther.** 344(1):77-84, 2013.

SHAMRAJ O, LINGREL JB. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase a subunit gene is expressed in testis. **Proc Natl Acad Sci.** 91:12952-56, 1994.

SHATTOCK MJ, OTTOLIA M, BERS DM, BLAUSTEIN MP, BOGUSLAVSKYI A, BOSSUYT J, BRIDGE JH, CHEN-IZU Y, CLANCY CE, EDWARDS A, GOLDHABER J, KAPLAN J, LINGREL JB, PAVLOVIC D, PHILIPSON K, SIPIDO KR, XIE ZJ. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. **J Physiol.** 593(6):1361-82, 2015.

SHULL GE, GREEB J, LINGREL JB. Molecular cloning of three distinct forms of the Na,K-ATPase a subunit from rat brain. **Biochemistry.** 261:16788-91, 1986.

SILVA E, SOARES-DA-SILVA P. New insights into the regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by ouabain. **Int Rev Cell Mol Biol.** 294:99-132, 2012.

SKOU JC, ESMANN M. The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr.** 24(3):249-61, 1992.

SKOU JC. The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim. Biophys. Acta.** 23:394-401, 1957.

STEYN PS, VAN HEERDEN FR. Bufadienolides of plant and animal origin. **Nat Prod Rep.** 15(4):397-413, 1998.

SUGDEN PH, CLERK A. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart. **Adv Enzyme Regul.** 38:87-98, 1998.

SWEADNER KJ. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochim Biophys Acta.** 988:185-220, 1989.

THERIEN AG, BLOSTEIN R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol.** 279(3):C541-66, 2000.

THERIEN AG, GOLDSHLEGER R, KARLISH SJ, BLOSTEIN R. Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. **J Biol Chem.** 272(51):32628-34, 1997.

THOMAS SM, BRUGGE JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 13:513–609, 1997.

THOMSEN P, ROEPSTORFF K, STAHLHUT M, BO VAN DEURS. Caveolae Are Highly Immobile Plasma Membrane Microdomains, Which Are not Involved in Constitutive Endocytic Trafficking. **Mol. Biol. Cell.** 13(1):238-250, 2002.

TIAN J, CAI T, YUAN Z, WANG H, LIU L, HAAS M, MAKSIMOVA E, HUANG X-Y, XIE Z-J. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Forms a Functional Signaling Complex. **Molecular Biology of the Cell.** 17:317-326, 2006.

TIAN J, GONG X, XIE Z. Signal-transducing function of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 281:H1899-H1907, 2001.

TOKHTAEVA E, CLIFFORD RJ, KAPLAN JH, SACHS G, VAGIN O. Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase  $\alpha$ - $\beta$  heterodimers. **J Biol Chem.** 287(31):26115-25, 2012.

TRENTI A, GRUMATI P, CUSINATO F, ORSO G, BONALDO P, TREVISI L. Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. **Biochem Pharmacol.** 89(2):197-209, 2014.

TUNQUIST BJ, MALLER JL. Under arrest: cytosstatic factor (CFS)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. **Genes Dev.** 17:683-710, 2003.

URBAN JD, CLARKE WP, VON ZASTROW M, NICHOLS DE, KOBILKA B, WEINSTEIN H, JAVITCH JA, ROTH BL, CHRISTOPOULOS A, SEXTON PM, MILLER KJ, SPEDDING M, MAILMAN RB. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. **J Pharmacol Exp Ther.** 320(1):1-13, 2007.

VASILETS LA, SCHWARZ W. Structure-function relationships of cation binding in the Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase. **Biochim Biophys Acta.** 1154(2):201-22, 1993.

VLAHOS CJ, MCDOWELL SA, CLERK A. Kinases as therapeutic targets for heart failure. **Nat Rev Drug Discov.** 2(2):99-113, 2003.

WANG H, HAAS M, LIANG M, CAI T, TIAN J, LI S, XIE Z. Ouabain Assembles Signaling Cascades through the Caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **J Biol Chem** 279: 17250-17259, 2004.

WANG Z, ZHENG M, LI Z, LI R, JIA L, XIONG X, SOUTHALL N, WANG S, XIA M, AUSTIN CP, ZHENG W, XIE Z, SUN Y. Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. **Cancer Res.** 69(16):6556-64, 2009.



WEIDEMANN H. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development - a hypothesis. **Front Biosci.** 10:2165-76, 2005.

WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, JOHNSON GL. Mitogenactivated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev.** 79(1):143-180, 1999.

WILLIAMS CH. Malignant hyperthermia: A runaway thermogenic futile cycle at the sodium channel level. **Advances in Bioscience and Biotechnology.** Vol.5 No.3, 2014.

WINNICKA K, BIELAWSKI K, BIELAWSKA A, MILTYK W. Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. **Nat Prod Res** 24(3):274-85, 2010.

WOODGETT JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. **EMBO J.** 9(8):2431-2438, 1990.

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.** 52(50):9059-67, 2013.

WU P-L, HSU Y-L, WU T-S, BASTOW KF, LEE K-H. Kalanchosides A-C, New Cytotoxic Bufadienolides from the Aerial Parts of *Kalanchoe gracilis*. **Org. Lett,** 8(23):5207-5210, 2006.

XIE CM, CHAN WY, YU S, ZHAO J, CHENG CH. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation. **Free Radic Biol Med.** 51(7):1365-75, 2011.

XIE J, YE Q, CUI X, MADAN N, YI Q, PIERRE SV, XIE Z. Expression of rat Na-K-ATPase  $\alpha 2$  enables ion pumping but not ouabain-induced signaling in  $\alpha 1$ -

deficient porcine renal epithelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 309(6):C373-82, 2015.

XIE Z, ASKARI A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. **Eur. J. Biochem.** 269:2434-9, 2002.

XIE Z, CAI T. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. **Molecular Interventions** 3:157-168, 2003.

XIE Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. **Ann N Y Acad Sci.** 986:497-503, 2003.

XIE Z. Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer. **Cel. Mol. Biol.** 47:383-390, 2001.

YASUDA S. p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases. **Center Nerv Syst Agents Med Chem.** 11(1):45-49, 2011.

YIN JQ, WEN L, WU LC, GAO ZH, HUANG G, WANG J, ZOU CY, TAN PX, YONG BC, JIA Q, SHEN JN. The glycogen synthase kinase-3 $\beta$ /nuclear factor-kappa B pathway is involved in cinobufagin-induced apoptosis in cultured osteosarcoma cells. **Toxicol Lett.** 218(2):129-36, 2013.

ZHANG J, LEE MY, CAVALLI M, CHEN L, BERRA-ROMANI R, BALKE CW, BIANCHI G, FERRARI P, HAMLIN JM, TAKAHIRO I, LINGREL JB, MATTESON DR, WIER WG, BLAUSTEIN MP. Sodium pump K2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice. **J Physiol.** 569: 243–256, 2005.

ZUGASTI O, RUL W, ROUX P, PEYSSONNAUX C, EYCHENE A, FRANKE TF, FORT P, HIBNER U. Raf-MEK-ERK cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. **Mol. Cell Biol.** 21:6706-6717, 2001.

# Anexos

---

---

## Natriuretic effect of bufalin in isolated rat kidneys involves activation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Src kinase pathway

Francisco J. Arnaud-Batista,<sup>1</sup> Graciana T. Costa,<sup>1</sup> Ilana Mara Barbosa de Oliveira,<sup>1</sup> Paula P. C. Costa,<sup>1</sup> Cláudia F. Santos,<sup>1</sup> Manassés C. Fonteles,<sup>1</sup> Daniel E. Uchôa,<sup>2</sup> Edilberto R. Silveira,<sup>2</sup> Bruno A. Cardi,<sup>1</sup> Krishnamurti M. Carvalho,<sup>1</sup> Luciana S. Amaral,<sup>3</sup> Elisa S. C. Pôças,<sup>3</sup> Luis E. M. Quintas,<sup>3</sup> François Noël,<sup>3</sup> and Nilberto R. F. Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Superior de Biomedicina, Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará; <sup>2</sup>Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará; and <sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Submitted 3 March 2011; accepted in final form 5 January 2012

**Arnaud-Batista FJ, Costa GT, de Oliveira IMB, Costa PPC, Santos CF, Fonteles MC, Uchôa DE, Silveira ER, Cardi BA, Carvalho KM, Amaral LS, Pôças ESC, Quintas LEM, Noël F, Nascimento NRF.** Natriuretic effect of bufalin in isolated rat kidneys involves activation of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Src kinase pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F959–F966, 2012. First published January 11, 2012; doi:10.1152/ajprenal.00130.2011.—Bufadienolides are structurally related to the clinically relevant cardenolides (e.g., digoxin) and are now considered as endogenous steroid hormones. Binding of ouabain to Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase has been associated, in kidney cells, to the activation of the Src kinase pathway and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase internalization. Nevertheless, whether the activation of this cascade also occurs with other cardiotonic steroids and leads to diuresis and natriuresis in the isolated intact kidney is still unknown. In the present work, we perfused rat kidneys for 120 min with bufalin (1, 3, or 10 μM) and measured its vascular and tubular effects. Thereafter, we probed the effect of 10 μM 3-(4-chlorophenyl)-1-(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine (PP2), a Src family kinase inhibitor, and 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene (UO126), a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2, on bufalin-induced renal alterations. Bufalin at 3 and 10 μM profoundly increased several parameters of renal function in a time- and/or concentration-dependent fashion. At a concentration that produced similar inhibition of the rat kidney Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, ouabain had a much smaller diuretic and natriuretic effect. Although bufalin fully inhibited the rat kidney Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase *in vitro*, its IC<sub>50</sub> (33 ± 1 μM) was threefold higher than the concentration used *ex vivo* and all its renal effects were blunted by PP2 and UO126. Furthermore, the phosphorylated (activated) ERK1/2 expression was increased after bufalin perfusion and this effect was totally prevented after PP2 pretreatment. The present study shows for the first time the direct diuretic, natriuretic, and kaliuretic effects of bufalin in isolated rat kidney and the relevance of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction.

bufadienolides; sodium excretion; extracellular volume regulation; signal transduction; renal physiology

BUFADIENOLIDES ARE CARDIOTONIC steroids structurally related to the clinically relevant cardenolides (e.g., digoxin). Recently, some bufadienolides, now considered as steroid hormones, were also detected in mammals (2, 19, 23) and their (patho)physiological significance has started to be unveiled. Several works point out that the production of endogenous Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-

ATPase ligands, including bufadienolides, is associated to hypertension and salt loading and the resulting natriuretic response is achieved by renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition and vasoconstriction due to vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition (4, 5, 11, 13, 36).

Likewise, bufalin-like immunoreactivity was correlated to increased systolic pressure in rats and humans (28). Nevertheless, this putative natriuretic effect of cardiotonic steroids is still disputed as in the case of bufalin, one of the major components of the toad venom-prepared traditional Chinese medicine called Ch'an Su, where data are conflicting. Pamnani et al. (30) reported that bufalin increased urinary volume, excretion of sodium and potassium after intravenous infusion in rats. In contrast, equimolar doses of ouabain produced significantly smaller effects on urinary volume and sodium excretion (30). On the other hand, bufalin decreased glomerular filtration rate (GFR), urinary flow (UF), and urinary sodium excretion (ENa<sup>+</sup>) in male Sprague-Dawley rats that received intravenous infusion of bufalin (31). Eliades et al. (12) reported that intravenous infusion of bufalin to dogs did not cause significant diuresis, natriuresis, or alteration in renal blood flow. The conflicting results obtained with bufalin *in vivo* are probably due to differences in animal species/strain, dose range, route of administration, and/or experimental conditions (conscious vs. anesthetized rats; uniphrectomized vs. intact animals). More importantly, the *in vivo* evaluation of renal effects of bufadienolides may be misleading due to their potent systemic vascular effects allied to extrarenal regulatory mechanisms (hormonal, neuronal) and putative hepatic biotransformation.

It is now well-established that binding of cardiotonic steroids to Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase can also activate several signal transduction pathways, e.g., a downstream phosphorylation cascade via Src kinase-Ras-Raf-ERK1/2 pathway, which can be independent on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase ion pumping activity (21, 22, 37, 40). Indeed, the interaction between the α subunit of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Src kinase family forms a functional signaling complex (21, 37). The activation of this signaling pathway in the basolateral membrane of renal epithelial cells has been shown to induce caveolin-1- and/or clathrin-dependent endocytosis of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (24, 25) and decrease the expression and activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 3 (NHE3) in the apical membrane, reducing sodium reabsorption (9, 29). The regulation of the NHE3 trafficking and subsequent inhibition of its activity occurred independent of intracellular Na<sup>+</sup> concentration alterations (9). Whether the activation of

Address for reprint requests and other correspondence: F. Noël, Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Av. Carlos Chagas, 373, sala J1-17, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil (e-mail: fnoel@pharma.ufrj.br).

this cascade leading to diuresis and natriuresis operates in the isolated intact kidney is still unknown. Although similar in structure, the different cardiotonic steroids exhibit diverse biological responses (11) so that these effects observed with ouabain cannot be necessarily extrapolated to bufalin.

The present study was conducted to compare the effects of bufalin on renal  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity in vitro and its direct effects on renal function in the ex vivo isolated, perfused kidney. This model keeps renal function free of the interference of humoral factors, neurotransmitters, and blood-borne vasoactive substances. In addition, we evaluated the impact of

the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Src kinase-ERK1/2 signal on bufadienolide effect.

**MATERIALS AND METHODS**

*Animals.* Adult male Wistar rats (250–300 g) obtained from the Central Animal House of the Federal University of Ceará were used. The rats were maintained under the conditions of constant temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and relative humidity ( $55 \pm 10\%$ ), in 12:12-h light-dark cycles. The animals were fed with standard animal chow (Purina) and had free access to drinking water. All animals were randomized into groups. The study protocols were approved by the Institutional Ethics

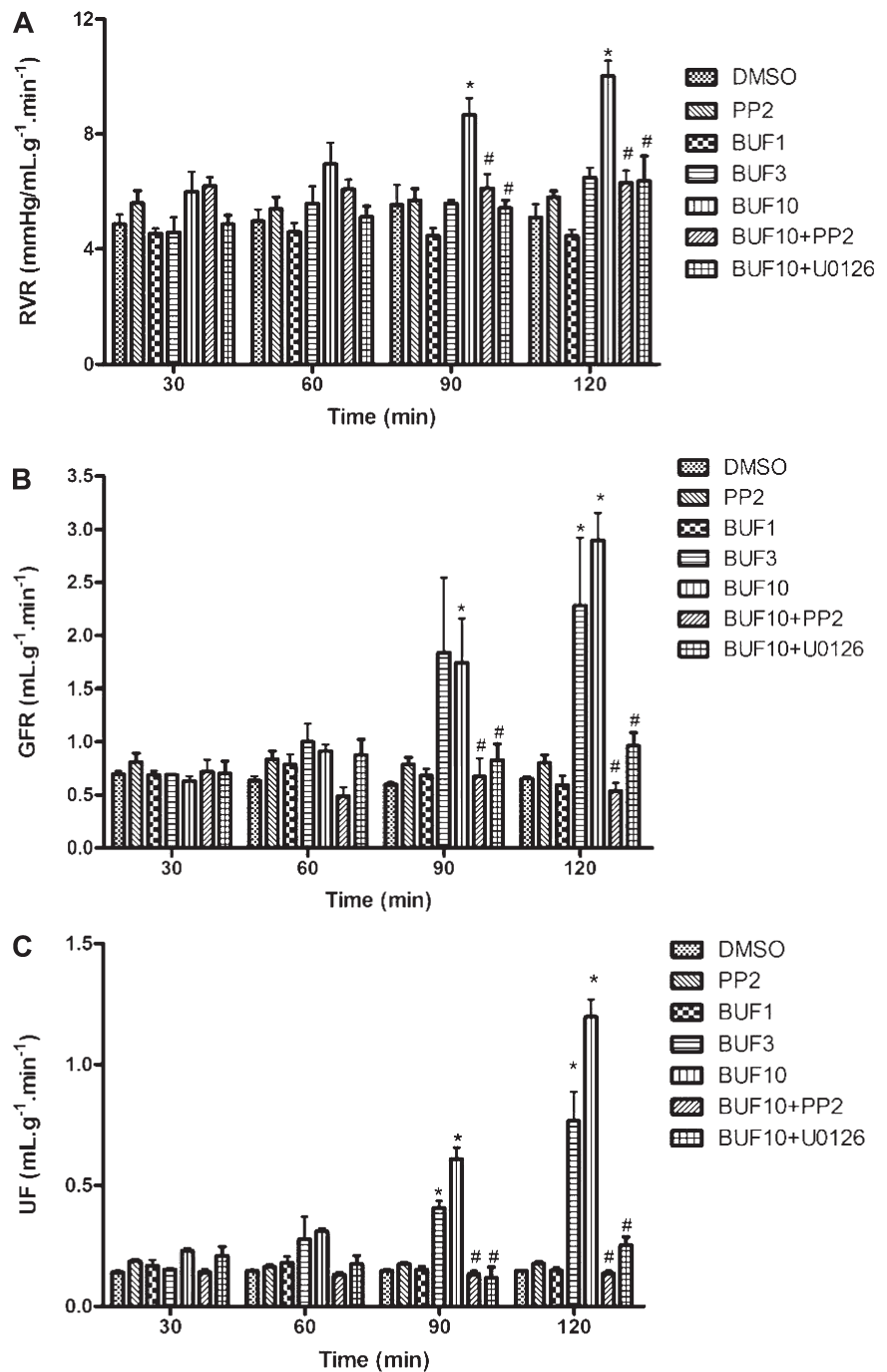


Fig. 1. Effect of bufalin (BUF), PP2 (a relatively specific Src kinase inhibitor), and UO126 (a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2) on the renal vascular resistance (RVR; A), glomerular filtration rate (GFR; B), and urinary flow (UF; C) of perfused rat kidneys. BUF (1, 3, or 10  $\mu\text{M}$ ) was added after a 30-min period of controlled perfusion and its effect was measured 30, 60, and 90 min later. BUF10+PP2: PP2 (10  $\mu\text{M}$ ) was perfused 30 min before 10  $\mu\text{M}$  bufalin. BUF10+UO126: UO126 (10  $\mu\text{M}$ ) was perfused 30 min before 10  $\mu\text{M}$  bufalin. \* $P < 0.05$  vs. DMSO. # $P < 0.05$  vs. BUF10, ANOVA followed by Bonferroni.

Committee of the Ceará State University and are in accordance with the guidelines of National Institutes of Health on the use and care of animals for experimentation.

**Drugs, reagents, and bufalin purification.** 3-(4-Chlorophenyl)-1-(1,1-dimethylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine (PP2) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). The reagents for standard solutions were of analytical grade obtained from either Sigma (St. Louis, MO) or Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Bufalin was isolated from the skin secretion of *Rhinella jimi* (formerly *Bufo paracnemis*) as previously described (27). The fractions were purified to homogeneity by HPLC on a preparative Shim-Pack PREP-ODS column (30 cm × 2.5) eluted isocratically (9 ml/min) with acetonitrile/water (1:2.5) and analyzed at 214 nm to detect different bufadienolides as well as other biologically active substances from this venom. The peak eluted at 48 min was recovered and chromatographed again to estimate its purity (>94%; the online version of this article contains supplemental data; see Supplemental Fig. S1).

The structure of 3,14-dihydroxy-5β-bufa-20,22-dienolide (bufalin) was unambiguously determined by spectrometric techniques such as infrared, mass spectrometry, and a combination of one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) methods (as an example, see H1 NMR spectral data in Supplemental Fig. S2). The bufadienolide was diluted in DMSO so that the final concentration of this solvent in the perfusate of the kidney was 0.05%.

**Kidney perfusion and membrane preparation.** The animals were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip) and thereafter,

3 ml of 20% manitol were injected via the left femoral vein to make it easier to perform the cannulation of the urether. After incision in the linea alba, the right kidney was isolated and the right urether was clamped and cannulated with a PE-20 tube for urine collection in preweighed vials. The superior mesenteric and renal arteries were dissected and after clamping of the superior mesenteric artery, this vessel was cannulated and a stainless catheter (30 × 10 adapted needle) was introduced and displaced until the renal artery. The kidney was perfused in situ to avoid interruption of flow and then was transferred to the perfusion system. The perfusate consisted of a modified Krebs-Henseleit solution (MKHS) with the following composition (in mM): 118 NaCl, 1.2 KCl, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.5 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, and 25 NaHCO<sub>3</sub>. Bovine serum albumin (6% wt/vol) was added to the MKHS and dialyzed for 48 h at 4°C against 10 Vol of MKHS. Immediately before the beginning of each perfusion, urea (0.1% wt/vol), inulin (0.05% wt/vol), and glucose (0.05% wt/vol) were added to the solution and pH was adjusted to 7.4. The total volume of perfusate solution was 100 ml and the flow rate was adjusted to achieve a perfusion pressure ~100 mmHg, as measured by an aneroid manometer. This was normally attained by using a flow rate ~20 ml/min. The solution was warmed to 37°C, the pH adjusted to 7.4, and gassed by means of an artificial lung (sylastic membrane) with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Besides the manometer, a bubble trapper, a 1.2-μm millipore filter, and a flowmeter (Gilmont, Barrington, IL) were coupled to the system. A 30-min perfusion period was observed as an equilibration period. The perfusion pressure and

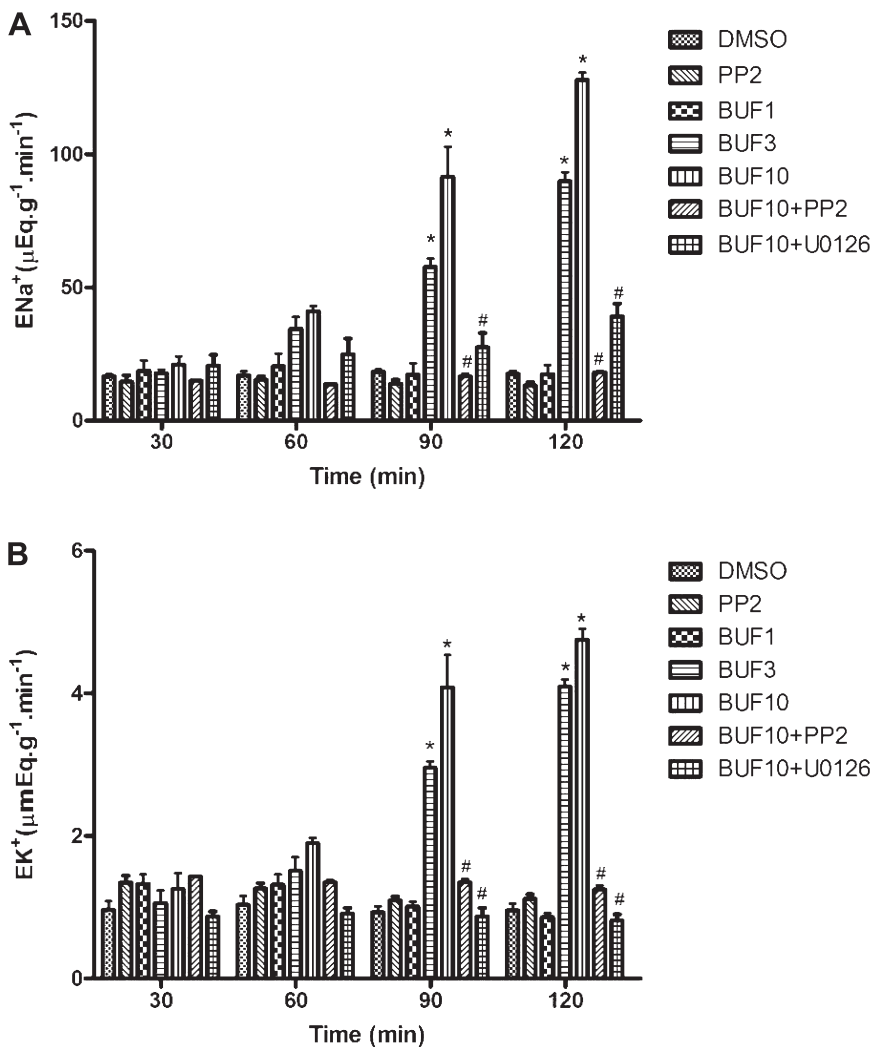


Fig. 2. Effect of BUF (1, 3, or 10 μM) on renal sodium (A) and potassium (B) excretion and the effect of 30-min period pretreatment with 10 μM PP2 (a relatively specific Src kinase inhibitor) or 10 μM UO126 (a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2). \**P* < 0.05 vs. DMSO. #*P* < 0.05 vs. BUF10, ANOVA followed by Bonferroni.

flow rate were recorded continuously. All the experiments lasted 120 min divided in four periods of 30 min: from 0 to 30 min (*t*30), from 31–60 min (*t*60), from 61 to 90 min (*t*90), and from 91 to 120 min (*t*120). During these 120 min, the first 30 are used as an internal quality control. DMSO (0.05% in MKHS), bufalin, or ouabain was added after the end of the 30-min control period. When pharmacological inhibitors were used, they were added in the perfusion system at *time 0*, i.e., 30 min before addition of bufalin. The glomerular filtration rate was determined by the inulin clearance, using the method described by Walser et al. (39) as modified by Fonteles et al.

(14). Inulin was measured by a colorimetric method after direct acid hydrolysis with acetic acid and chloridric acid and by using diphenylamine as color reagent. Sodium and potassium concentrations in both urine and perfusate were analyzed by means of a flame photometer (International Laboratories, model 443 IL). Osmolality of the perfusate and urine was measured by means of a vapor pressure osmometer (Vapro model 5100c, Advanced Instruments, Needham Heights, MA).

After the end of the perfusion period, the kidney was rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Crude membrane preparations

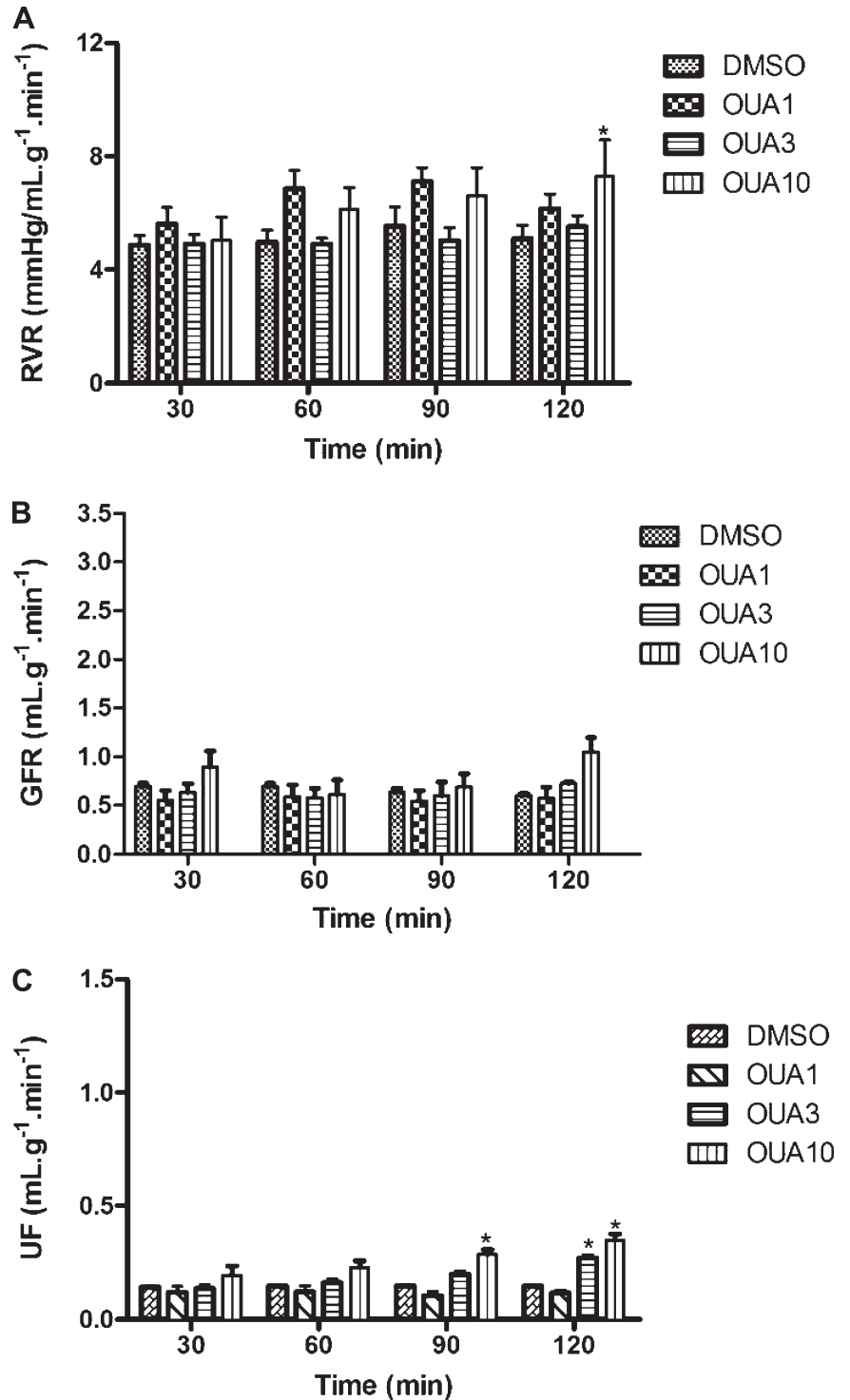


Fig. 3. Effect of ouabain (OUA) on the RVR (A), GFR (B), and UF (C) of perfused rat kidneys. OUA (1, 3, or 10  $\mu\text{M}$ ) was added after a 30-min period of controlled perfusion and its effect was measured 30, 60, and 90 min later.  $*P < 0.05$  vs. DMSO, ANOVA followed by Bonferroni.

were performed according to Quintas et al. (33), with modifications. Briefly, kidneys were minced and homogenized in Ultra-Turrax (9,500 rpm × 10 s and two steps of 13,500 rpm × 10 s) in a solution containing (in mM) 250 sucrose, 10 EGTA, 1 EDTA, 0.5 DTT, 1 PMSF, and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), plus 15 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml antipain, followed by additional homogenization in Dounce apparatus and ultracentrifugation (100,000 *g*<sub>av</sub> × 60 min). The pellets were resuspended with the same buffer and stored at -80°C until use for Western blot analysis.

**Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase preparation from rat kidney.** To evaluate the direct effect of bufalin on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity *in vitro*, adult male Wistar rats were killed by decapitation and their kidneys were rapidly excised and stored at -80°C. Preparations enriched in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase were obtained by chaotropic treatment with 2 M KI for 1 h and 0.1% DOC (sodium deoxycholate) overnight, followed by differential centrifugation (26). The protein concentration was measured using bovine serum albumin as the standard, as previously described (34).

**Inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity.** The Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity was determined by the Fiske and Subbarow method with slight modifications (32). The specific activity of the enzyme corresponds to the difference between the total ATPase activity and the activity measured in the presence of 1 mM ouabain (ouabain-resistant activity). The maximal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity was ~60 μmol Pi·mg protein<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, corresponding to 70% of the total ATPase activity. The quantity of protein was adjusted to hydrolyze no more than 10–15% of the substrate during the incubation period. The reaction was started by addition of kidney preparation, incubated at 37°C for 2 h, in a total volume of 0.5 ml. Unless otherwise stated, the incubation was performed in the presence of (in mM) 84 NaCl, 3 KCl,

3 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 ATPNa<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 sodium azide, and 20 maleic acid-Tris buffer (pH 7.4). Inhibition curves were obtained in the presence of increasing concentrations of bufalin.

**Western blot.** Samples were resolved by 12% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes. After staining the membranes with Ponceau red to confer homogeneous transfer, they were incubated (in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20) with 5% nonfat dry milk for 1 h, followed by the primary (anti-phospho or -total ERK1/2, 1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology) and secondary (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, 1:2,000 dilution; Promega) antibodies, for 1 h each (34). Proteins were detected using chemiluminescence kit (Supersignal; Termo Fisher Scientific) by exposure to CL-Xposure films (Termo Fisher Scientific) and blots were analyzed by Image J software (NIH).

**Statistical analysis.** Results are shown as means ± SE of *n* experiments for each group. Differences between groups were analyzed by using the ANOVA followed by the Bonferroni test. The level of significance was set at *P* < 0.05.

The inhibition curves were fitted using a computerized nonlinear regression analysis of the untransformed data (Prism, GraphPad Software), assuming a single population of enzymes.

**RESULTS**

**Effect of bufalin on renal function in the *ex vivo* isolated, perfused kidney.** After the 20-min equilibration period, all functional parameters of the control perfused kidney remained stable throughout the experiment and were not changed by addition of the vehicle (0.05% DMSO in MKHS, *n* = 5). The

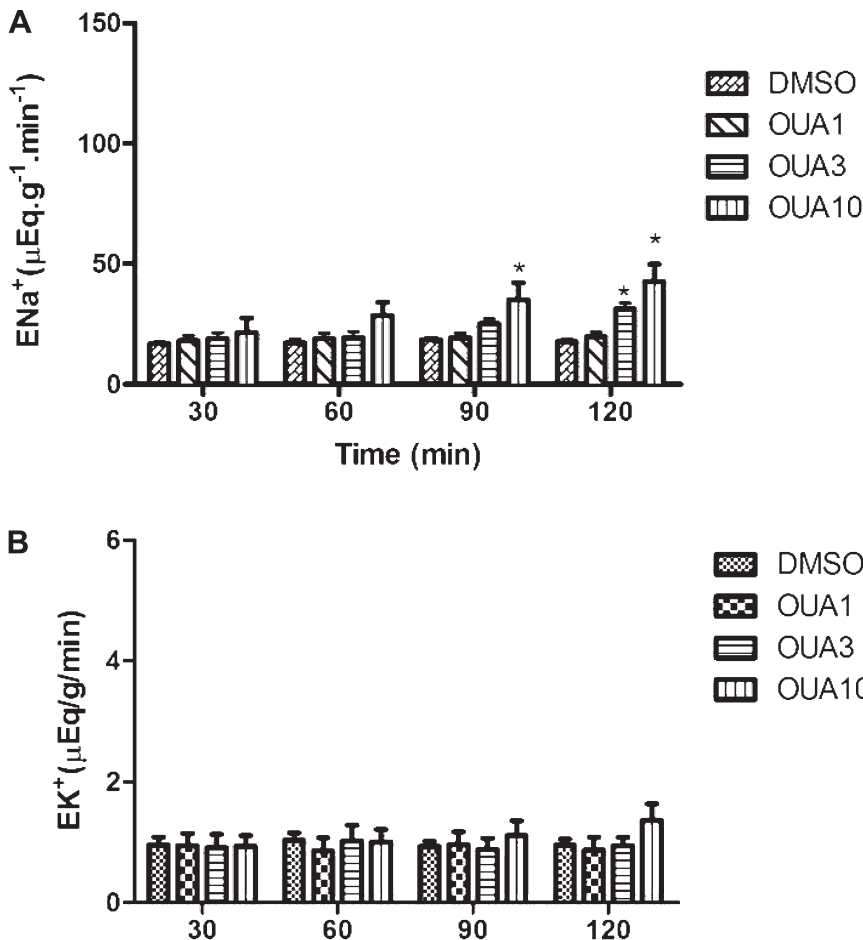


Fig. 4. Effect of OUA (1, 3, or 10 μM) on renal sodium (A) and potassium (B) excretion. \**P* < 0.05 vs. DMSO, ANOVA followed by Bonferroni.



addition of 1  $\mu\text{M}$  bufalin, after the 30-min equilibrium period, did not affect GFR, UF, and  $\text{ENa}^+$  throughout the experiment (Figs. 1 and 2). On the other hand, perfusion with 3 and 10  $\mu\text{M}$  bufalin increased renal vascular resistance (RVR; Fig. 1A), GFR (Fig. 1B), UF (Fig. 1C),  $\text{ENa}^+$  (Fig. 2A), and urinary potassium excretion ( $\text{EK}^+$ ; Fig. 2B) in a time- and/or concentration-dependent fashion. Compared with the vehicle, the highest increases occurred 90 min after bufalin addition (i.e.,  $t = 120$  min). For instance, 10  $\mu\text{M}$  bufalin led to increments around two- (RVR, Fig. 1A), five- (GFR, Fig. 1B, and  $\text{EK}^+$ , Fig. 2B), and eightfold (UF, Fig. 1C, and  $\text{ENa}^+$ , Fig. 2A). Ouabain, a classical cardenolide used as comparator, has also a diuretic and natriuretic effect in our conditions (Figs. 3 and 4) but its intensity is much less than the one produced by bufalin, even when comparing concentrations that produced similar inhibition of the rat kidney  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , i.e., 10  $\mu\text{M}$  ouabain vs. 3  $\mu\text{M}$  bufalin.

**Effect of bufalin on rat kidney  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity *in vitro*.** Cardiotonic steroids are known as specific inhibitors of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and their effect on mammalian kidney has been considered responsible for their natriuretic effect (4, 5, 13). To measure the direct inhibitory effect of bufalin on the rat renal  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , we performed a concentration-effect curve using a purified preparation routinely used in our laboratory in diverse situations to assess ouabain potency (26, 32). Bufalin inhibited the rat kidney  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in a concentration-dependent manner, with an  $\text{IC}_{50}$  of  $33 \pm 1$   $\mu\text{M}$  (Fig. 5), a value 2.5-fold lower than for ouabain tested in the same condition ( $86 \pm 9$   $\mu\text{M}$ ; Fig. 5). Note that the same  $\text{IC}_{50}$  for bufalin was achieved when using crude membrane preparations from the kidneys employed in our functional *ex vivo* experiments ( $\text{IC}_{50}$  in  $\mu\text{M}$ ): nonperfused ( $33 \pm 12$ ), PP2-perfused ( $35 \pm 14$ ), bufalin-perfused ( $30 \pm 10$ ), and bufalin+PP2-perfused ( $35 \pm 5$ ).

**Effect of Src kinase-Ras-Raf-ERK1/2 inhibition on the functional alterations induced by bufalin in perfused rat kidneys.** To evaluate whether the novel  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  signal transduction pathway (phosphorylation cascade via Src kinase-Ras-

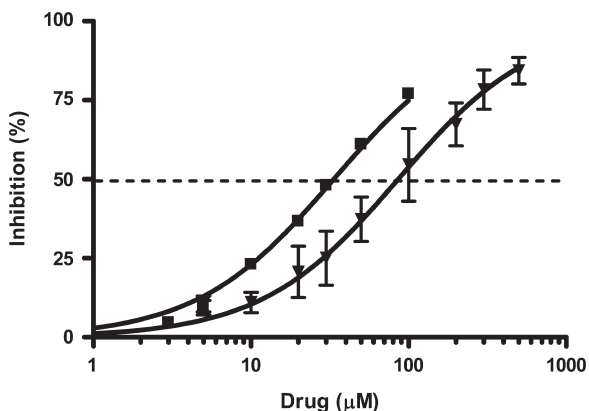


Fig. 5. Effects of BUF and OUA on rat kidney  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity. The effect of BUF ( $\blacksquare$ ) and OUA ( $\blacktriangledown$ ) on  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity was tested *in vitro* using a partially purified preparation of kidneys from untreated rats. Results were expressed as percent of the inhibition measured in the presence of 1 mM OUA (means  $\pm$  SE) and were obtained from 3 experiments performed in triplicate. Curves were drawn using the parameters fitted by nonlinear regression analysis with the model of sigmoidal concentration-response curve ( $\text{Imax}$  fixed at 100%).

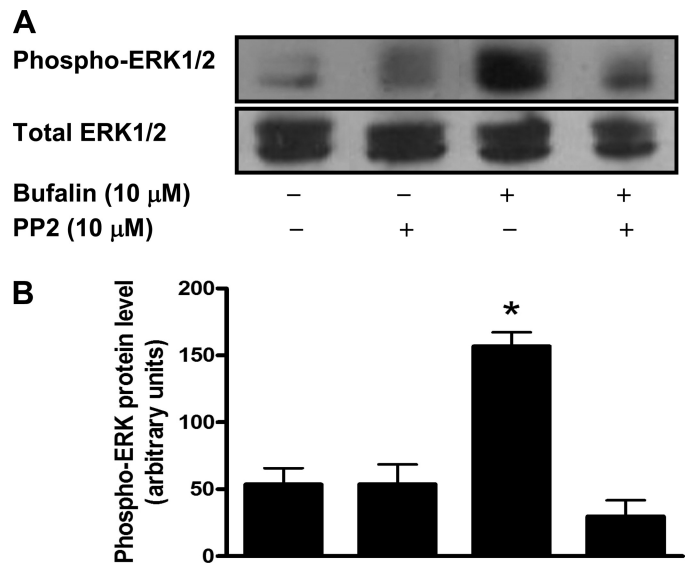


Fig. 6. Effects of BUF on ERK1/2 phosphorylation in rat kidney. The effect of BUF on ERK1/2 expression was measured *ex vivo* by performing immunoblots of phosphorylated and total ERK1/2 in isolated, perfused rat kidneys treated or not with BUF and the Src kinase inhibitor PP2. A: representative Western blot. B: densitometric data for the phosphorylated ERK1/2. \* $P = 0.0019$  ( $n = 3$ ), ANOVA followed by Tukey.

Raf-ERK1/2) was involved in the bufalin effects observed in our model of perfused rat kidney, two critical kinases implicated in that cascade were studied, i.e., Src and ERK1/2. PP2 (10  $\mu\text{M}$ ), the widely used inhibitor of the Src family of protein kinases (6), was perfused before 10  $\mu\text{M}$  bufalin and completely prevented bufalin-evoked renal effects (Figs. 1 and 2). PP2 alone had no significant influence on renal parameters (Figs. 1 and 2). Although PP2 is generally considered as a selective inhibitor of Src family tyrosine kinases, it is not specific so that we decided to test the effects of another inhibitor of this pathway. Figures 1 and 2 show that administration of a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2 (10  $\mu\text{M}$  U0126) before 10  $\mu\text{M}$  bufalin completely prevented the bufalin-evoked renal effects. Moreover, when ERK1/2 was investigated in these kidneys, we observed a clear increase of the phosphorylated (activated) ERK1/2 expression after bufalin perfusion. Furthermore, this increase was totally prevented when the kidneys were pretreated with PP2 (Fig. 6).

## DISCUSSION

Endogenous bufadienolides are thought to contribute to sodium excretion during conditions of salt overload by their natriuretic properties and the primary underlying mechanism is supposed to be the inhibition of the renal  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , resulting in decreased sodium transport of the renal tubular ultrafiltrate into the peritubular blood (5, 11, 13, 36), but a case-by-case evaluation is necessary since the different cardiotonic steroids exhibit diverse biological responses (11).

Here, we showed for the first time that bufalin exerted a profound diuretic and natriuretic effect in the isolated, perfused rat kidney, a model free of the interference of humoral factors, neurotransmitters, and blood-borne vasoactive substances and that this effect is higher than for ouabain. Qualitatively similar results were obtained by Brownlee et al. (7) and Pamnani et al. (30), but *in vivo*, so that they might be at least partially related

to the hypertensive and inotropic effects of these cardiac steroids. In our model, 3  $\mu\text{M}$  bufalin induced a significant increase in sodium excretion with increased GFR but with no increase in RVR. At 10  $\mu\text{M}$ , the perfusion pressure was increased as well as sodium excretion and both GFR and RVR, as also observed after high concentrations of angiotensin II in the isolated kidney (17). Therefore, increased filtration, increased distal delivery, and decreased tubular reabsorption are probably involved in the bufalin natriuretic effect. Despite the cortical blood flow and GFR being kept under narrow limits of variation, under a wide range of perfusion pressure modification, the renal papilar blood flow is not autoregulated and with increased perfusion pressure the vasa recta capilar pressure and the interstitial pressure also increase leading to decreased sodium reabsorption (10). Bufalin induced similar increases in GFR at the concentration of 3 and 10  $\mu\text{M}$  but there was a significantly more pronounced natriuresis with the concentration of 10  $\mu\text{M}$ , which promoted higher RVR increase. The increased RVR associated with bufalin perfusion could be interpreted as a more prominent vasoconstrictor effect on postglomerular capillaries than in preglomerular capillaries. This is reinforced by the fact that ouabain, which only induced a transient increase in perfusion pressure, did not induce such increases in GFR and RVR. Also, an increased distal delivery is probably related to the kaliuresis induced by bufalin since this effect is not observed in the ouabain-perfused kidneys. The smaller increase of sodium excretion exerted by ouabain (2- vs. 7-fold induced by bufalin) is probably dependent mainly on tubular mechanisms.

Early works demonstrated a positive correlation between natriuresis and inhibition of renal  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  by ouabain (18, 38). Here, we showed that bufalin inhibits rat kidney  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity in vitro with an  $\text{IC}_{50}$  of 33  $\mu\text{M}$ , a value consistent with the well-known low affinity of the kidney  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  isoform of this species (1). Interestingly, however, is that  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  inhibition and natriuresis did not occur in the same range of concentrations indicating that other mechanisms besides direct enzyme inhibition are involved in bufalin-induced effects. This assumption is highly supported by our observation that ouabain produced a much smaller diuretic and natriuretic effect than bufalin when comparing concentrations that produced the same level of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  inhibition in the rat kidney. Novel roles of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  have been intensely investigated for which its interaction with the nonreceptor tyrosine kinase Src has a key role for activating an entire phosphorylation cascade in which one of the main components is ERK1/2 (8, 21, 37). Through this mechanism, cardiotoxic steroids induce basolateral  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and apical NHE3 endocytoses in cultured kidney cells (9, 24, 25, 29) and this is attributed to work in vivo for urinary sodium excretion. Our results demonstrate that in isolated rat kidney this signal transduction system is stimulated by bufalin (revealed by ERK1/2 phosphorylation) and, more importantly, that it is critical for the renal effects produced by such bufadienolide (revealed by Src and MEK pharmacological blockade). Although the model (hepatocellular carcinoma) is quite different, the activation of ERK1/2 by bufalin has already been demonstrated (20).

As the vasoactive effect of cardiotoxic steroids has been traditionally explained by  $\text{Na}^+$  pump inhibition (3), little is known about the importance of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  signal trans-

duction. Although the existence of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-Src}$  pathway has been demonstrated in rat A7r5 cells (15, 16) and human umbilical artery endothelial cells (35), to our knowledge, this is the first time that this signaling cascade is related to a functional vascular effect (increase of RVR, also blocked by PP2 and UO126).

Bufalin has not been irrefutably characterized in mammals, but bufalin derivatives as well as bufalin-like immunoreactive factors were detected (19, 23, 28). Our findings reveal that bufalin ex vivo acts as a natriuretic compound and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -mediated signal transduction might be considered the primary mechanism but whether there is a physiological or physiopathological significance in mammals, where endogenous cardiotoxic steroids seem to circulate at nanomolar concentration, is still unknown.

In conclusion, the present study shows for the first time the direct diuretic, natriuretic, and kaliuretic effects of bufalin in isolated rat kidney and the relevance of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -mediated Src kinase-Ras-Raf-ERK1/2 pathway.

**GRANTS**

This study was partially funded by Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Luciana S. Amaral is a recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior fellowship. Francisco J. Arnaud-Batista is a recipient of FUNCAP fellowship and Graciana T. Costa is a recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas fellowship.

**DISCLOSURES**

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Author contributions: F.J.A.-B., G.T.C., I.M.B.O., P.P.C., C.F.S., D.E.U., B.A.C., L.S.A., and E.S.P. performed experiments; F.J.A.-B., G.T.C., I.M.B.O., P.P.C., C.F.S., D.E.U., E.R.S., B.A.C., K.M.C., L.S.A., E.S.P., L.E.M.Q., and N.R.N. analyzed data; F.J.A.-B., G.T.C., I.M.B.O., P.P.C., M.C.F., D.E.U., E.R.S., B.A.C., K.M.C., L.S.A., E.S.P., L.E.M.Q., F.N., and N.R.N. interpreted results of experiments; F.J.A.-B., G.T.C., P.P.C., C.F.S., D.E.U., K.M.C., L.S.A., and E.S.P. prepared figures; M.C.F., L.E.M.Q., F.N., and N.R.N. edited and revised manuscript; E.R.S., K.M.C., L.E.M.Q., F.N., and N.R.N. conception and design of research; L.E.M.Q. and N.R.N. drafted manuscript; F.N. and N.R.N. approved final version of manuscript.

**REFERENCES**

- Allen JC, Schwartz A. A possible biochemical explanation for the insensitivity of the rat to cardiac glycosides. *J Pharmacol Exp Ther* 168: 42–46, 1969.
- Bagrov AY, Fedorova OV, Dmitrieva RI, Howald WN, Hunter AP, Kuznetsova EA, Shpen VM. Characterization of a urinary bufadienolide  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  inhibitor in patients after acute myocardial infarction. *Hypertension* 31: 1097–1103, 1998.
- Bagrov AY, Roukoyatkina NI, Pinaev AG, Dmitrieva RI, Fedorova OV. Effects of two endogenous  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol* 274: 151–158, 1995.
- Bagrov AY, Shapiro JI. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat Clin Pract Nephrol* 4: 378–392, 2008.
- Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 61: 9–38, 2009.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLaughlan H, Klevernic I, Arthur JSC, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408: 297–315, 2007.
- Brownlee AA, Lee G, Mills IH. Marked inhibition of canine renal  $\text{Na-K-ATPase}$  by a bufadienolide, but weak natriuretic activity in the rat. *J Physiol* 390: 94P, 1987.

8. Cai T, Wang H, Chen Y, Liu L, Gunning WT, Quintas LEM, Xie ZJ. Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na-K-ATPase. *J Cell Biol* 182: 1153–1169, 2008.
9. Cai H, Wu L, Qu W, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI, Liu J. Regulation of apical NHE3 trafficking by ouabain-induced activation of the basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase receptor complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C555–C563, 2008.
10. Cowley AW Jr. Role of the renal medulla in volume and arterial pressure regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R1–R15, 1997.
11. Dvula M, Rosen H, Feldmann T, Neshor M, Lichtstein D. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. *Pathophysiology* 14: 159–166, 2007.
12. Eliades D, Pannani MB, Swindall BT, Haddy FJ. Effects of bufalin on renal venous outflow, urine flow and natriuresis in the anesthetized dog. *Adv Exp Med Biol* 308: 205–210, 1991.
13. Fedorova OV, Talan MI, Agalakova NI, Lakatta EG, Bagrov AY. Endogenous ligand of  $\alpha_1$  sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride-dependent hypertension. *Circulation* 105: 1122–1127, 2002.
14. Fonteles MC, Cohen JJ, Black AJ, Wertheim SJ. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 244: F235–F246, 1983.
15. Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 275: 27832–27837, 2000.
16. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 277: 18694–18702, 2002.
17. Hilchey S, Quilley J, Bell-Quilley C. vascular and excretory effects of angiotensin II in the rat isolated perfused kidney: influence of an AT1 and a nonselective at receptor antagonist. *Pharmacology* 57: 196–205, 1998.
18. Hook JB. A positive correlation between natriuresis and inhibition of renal Na-K adenosine triphosphatase by ouabain. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 731–734, 1969.
19. Komiya Y, Dong XH, Nishimura N, Masaki H, Yoshika M, Masuda M, Takahashi H. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure. *Clin Biochem* 38: 36–45, 2005.
20. Li H, Wang P, Gao Y, Zhu X, Liu L, Cohen L, Meng Z, Yang P. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_3$  mediates sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to bufalin. *Oncol Rep* 25: 825–830, 2011.
21. Liang M, Cai T, Tian J, Qu W, Xie ZJ. Functional characterization of Src-interacting Na-K-ATPase using RNA interference assay. *J Biol Chem* 281: 19709–19719, 2006.
22. Liang M, Tian J, Liu L, Pierre S, Liu J, Shapiro J, Xie ZJ. Identification of a pool of nonpumping Na-K-ATPase. *J Biol Chem* 282: 10585–10593, 2007.
23. Lichtstein D, Gati I, Samuelov S, Berson D, Rozenman Y, Landau L, Deutsch J. Identification of digitalis-like compounds in human cataract lenses. *Eur J Biochem* 216: 261–268, 1993.
24. Liu J, Kesiry R, Periyasamy SM, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na-K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney Int* 66: 227–241, 2004.
25. Liu J, Liang M, Liu L, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na-K-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1. *Kidney Int* 67: 1844–1854, 2005.
26. Noël F, Godfraind T. Heterogeneity of ouabain specific binding sites and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition in microsomes from rat heart. *Biochem Pharmacol* 33: 47–53, 1984.
27. Nogueira RMD, Costa DC, Patrocínio MCA, Camarão GC, Uchoa DEA, Silveira ER, Scorza FA, Santos NF, Cavalheiro EA, Carvalho KM. Status epilepticus induced by marinobufagin, a bufadienolide isolated from *Bufo paracnemis* Lutz (1925) parotid glands secretions. *J Venom Anim Toxins* 9: 388, 2004.
28. Oda M, Kurosawa M, Numazawa S, Tanaka S, Akizawa T, Ito K, Maeda M, Yoshida T. Determination of bufalin-like immunoreactivity in serum of humans and rats by time-resolved fluoroimmunoassay for using a monoclonal antibody. *Life Sci* 68: 1107–1117, 2001.
29. Oweis S, Wu L, Kiela PR, Zhao H, Malhotra D, Ghishan FK, Xie Z, Shapiro JI, Liu J. Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F997–F1008, 2006.
30. Pannani MB, Chen S, Bryant HJ, Schooley JF, Eliades DC, Yuan CM, Haddy FJ. Effects of three sodium-potassium adenosine triphosphatase inhibitors. *Hypertension* 18: 316–324, 1991.
31. Patel AR, Kurashina T, Granger JP, Kirchner KA. Acute Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition with bufalin impairs pressure natriuresis in the rat. *Hypertension* 27: 668–671, 1996.
32. Pôças ESC, Costa PRR, Silva AJ, Noël F. 2-Methoxy-3,8,9-trihydroxy coumestan: a new synthetic inhibitor of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase with an original mechanism of action. *Biochem Pharmacol* 66: 2169–2176, 2003.
33. Quintas LEM, Lopez LB, Souccar C, Noël F. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase density is sexually dimorphic in the adult rat kidney. *Ann N Y Acad Sci* 834: 552–554, 1997.
34. Quintas LEM, Lafayette SSL, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Noël F. Role of noradrenaline on the expression of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_2$  isoform and the contractility of cultured rat vas deferens. *Biochem Pharmacol* 64: 1431–1437, 2002.
35. Saunders R, Scheiner-Bobis G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur J Biochem* 271: 1054–1062, 2004.
36. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Role of endogenous cardiotonic steroids in sodium homeostasis. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2723–2729, 2008.
37. Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, Maksimova E, Huang XY, Xie ZJ. Binding of Src to Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell* 17: 317–326, 2006.
38. Torretti J, Hendlar E, Weinstein E, Longnecker RE, Epstein FH. Functional significance of Na-K-ATPase in the kidney: effects of ouabain inhibition. *Am J Physiol* 222: 1398–1405, 1972.
39. Walser M, Davidson DG, Orloff J. The renal clearance of alkali-stable inulin. *J Clin Invest* 34: 1520–1523, 1955.
40. Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 279: 17250–17259, 2004.

# Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ 1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat Sertoli cells

Thaís F G Lucas, Luciana S Amaral<sup>1</sup>, Catarina S Porto and Luis E M Quintas<sup>1</sup>

Setor de Endocrinologia Experimental, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, São Paulo, Brazil and <sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco J, sala J-017, CEP 21941-902 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to L E M Quintas; Emails: [lquintas@farmaco.ufrj.br](mailto:lquintas@farmaco.ufrj.br); [lquintas@ufrj.br](mailto:lquintas@ufrj.br)

## Abstract

Novel roles for the interaction of cardiotonic steroids to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase have been established in recent years. The aim of this study was to investigate the intracellular signaling events downstream the action of ouabain on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Sertoli cell obtained from immature rats. Treatment of Sertoli cells with ouabain (1  $\mu$ M) induced a rapid and transient increase in the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2 or MAPK3/1) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/serine–threonine protein kinase (AKT) phosphorylation. Also, ouabain upregulated the expression of cyclin D1 and incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine, both of which were dependent on MAPK3/1 but not AKT intracellular cascade, as shown by pretreatment with MEK (MAP2K1/2) inhibitor U0126 and PI3K inhibitor wortmannin respectively. Moreover, the effect of ouabain on these proliferation parameters was completely prevented by phospho-cAMP response element-binding protein (CREB)/CREB-binding protein complex inhibitor KG501 and only partially by nuclear factor  $\kappa$ B nuclear translocation inhibitor SN50. Pretreatment with estrogen receptor antagonist ICI 182 780 showed that MAPK3/1 activation by ouabain does not involve this receptor. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 isoform, but not  $\alpha$ 4, was detected in Sertoli cells, suggesting that ouabain effects in Sertoli cells are mediated via  $\alpha$ 1. Taken together, these results show a rapid ouabain action in the Sertoli cells, which in turn can modulate nuclear transcriptional events essential for Sertoli cell proliferation in a critical period of testicular development. Our findings are important to understand the role of ouabain in the testis and its possible implications in male infertility.

*Reproduction* (2012) **144** 737–745

## Introduction

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, besides its ion-pumping role, is now considered a receptor that interacts with many membrane and cytosolic proteins, for example, SRC family of tyrosine kinases, and activates different downstream signaling pathways after bound to cardiotonic steroids (Pierre & Xie 2006). A complex set of cell type-dependent short- and long-term effects has been reported after activation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, such as contraction (Mohammadi *et al.* 2003), proliferation/viability (Abramowitz *et al.* 2003, Tian *et al.* 2009, Li *et al.* 2010, Quintas *et al.* 2010), differentiation (Fedorova *et al.* 2009), secretion (Quintas *et al.* 2010), and apoptosis (Jiang *et al.* 2010). The role of cardiotonic steroids becomes more remarkable because, in addition to their therapeutic use as inotropic compounds, they have also been detected endogenously in mammals and are recognized as a new class of steroid hormones (Bagrov *et al.* 2009). Both cardenolides (e.g. ouabain) and bufadienolides (e.g. marinobufagin) are found in the circulation and their concentrations may increase at

distinct physiological and pathological conditions (Bagrov *et al.* 2009).

In testicular cells, particularly Sertoli cells, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase function has been poorly investigated. The few available studies show that the pump has an apparent polarized, lateroapical distribution and plays a role on the ionic composition of the seminiferous tubular fluid (Rato *et al.* 2010) and the intracellular pH of the Sertoli cells (Oliveira *et al.* 2009). On the other hand, the putative effects of cardiotonic steroids such as the specific sodium pump ligand ouabain have not been analyzed in detail so far. Recent study has shown that ouabain can stimulate SRC-RAF-MAPK cascade and also cAMP response element-binding (CREB) protein in rat-derived Sertoli cell line 93RS2, but the ouabain-induced cellular effects have not been established (Konrad *et al.* 2011).

Sertoli cells are known to divide in the fetal rat testis, proliferating maximally on day 20 postconception, with a progressive decrease in division until postnatal day 21, when division ceases. The Sertoli cell population remains relatively constant in adult mammals, and each

Sertoli cell supports ~30–50 germ cells at different stages of development in the seminiferous epithelium. Recent studies have also shown that Sertoli cells are capable of dividing even in adult animals, under experimental and physiological conditions. The micro-environment of the seminiferous epithelium, wherein each Sertoli cell supports germ cells at different stages of development, locally produces autocrine and paracrine factors involved with spermatogenesis (reviewed in Lucas *et al.* (2011)). Thus, a better knowledge about the role of these factors and also of the cardiotoxic steroids in the regulation of homeostasis and function of Sertoli cells will be important for the control of male fertility. In this study, we show that different intracellular signaling pathways are activated by ouabain in primary culture of Sertoli cells obtained from immature rats and that MAPK3/1 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2), CREB, and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) are involved in ouabain-induced cell proliferation.

## Results

### Ouabain induces MAPK3/1 and AKT phosphorylation in primary rat Sertoli cells

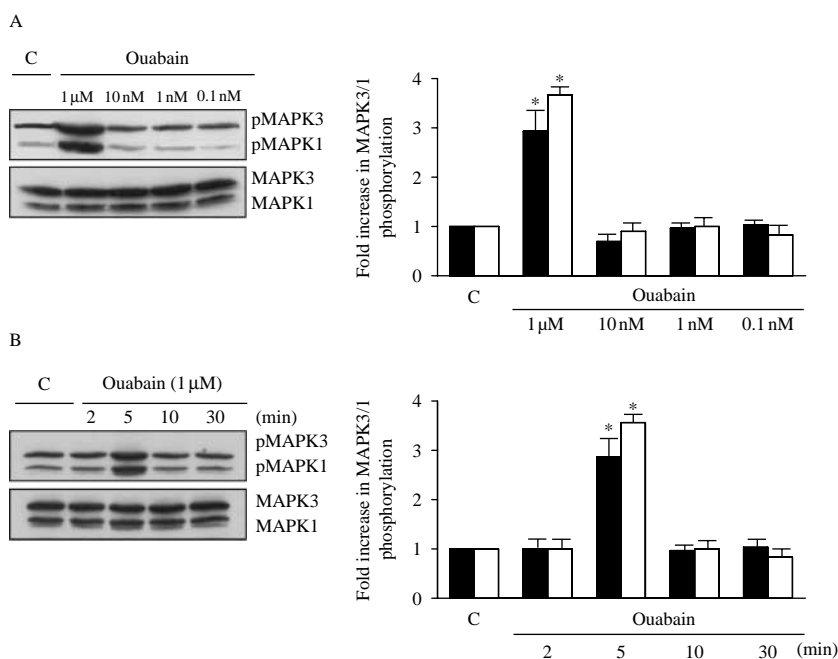
Cardiotonic steroids rapidly activate several intracellular signaling pathways in different cells, including MAPK3/1 (Kometiani *et al.* 1998, Quintas *et al.* 2010) and Akt (Liu *et al.* 2007). Increase in MAPK3/1 phosphorylation was observed with 1  $\mu$ M ouabain in Sertoli cells (Fig. 1A). Treatment with lower concentrations of ouabain was not able to activate MAPK3/1. The peak of MAPK3/1 phosphorylation occurred at 5 min ( $2.9 \pm 0.5$ - and  $3.6 \pm 0.2$ -fold increase for MAPK3 and

MAPK1 respectively compared with control) (Fig. 1B). Similar results were observed for AKT phosphorylation (Fig. 2). No differences were observed in total MAPK3/1 or AKT protein expression under any of these conditions (Figs 1 and 2).

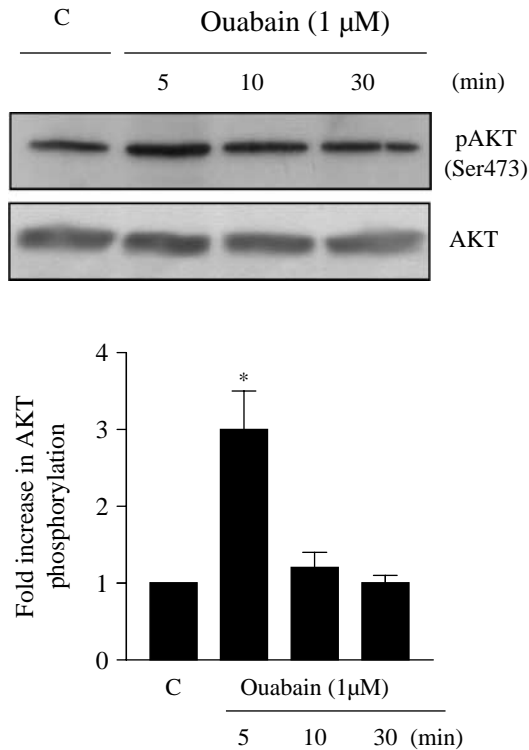
Considering that rat Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  isoforms have distinct sensitivities to the inhibitory activity of cardiotoxic steroids (Lopez *et al.* 2002) as well as to the stimulation of signaling pathways (Pierre *et al.* 2008), we investigated which  $\alpha$  isoforms are present in rat Sertoli cells. The expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 4 isoform was not detected at the protein level in three different batches of primary culture of Sertoli cells, but it was clearly detectable in a human spermatozoa preparation used as a positive control (Fig. 3). Only the housekeeping  $\alpha$ 1 isoform protein was observed in Sertoli cells, which is consistent with the micromolar ouabain concentration range responsible for activation of signaling pathways.

### Ouabain induces cyclin D1 expression and Sertoli cell proliferation through MAPK3/1, CREB, and NF- $\kappa$ B in primary rat Sertoli cells

Ouabain may stimulate cell proliferation via MAPK3/1 and/or AKT in different cells (Dmitrieva & Doris 2003, Khundmiri *et al.* 2006, Tian *et al.* 2009), and these protein kinases are involved in the upregulation of cyclin D1 (CCND1) and cell cycle progression (Liang & Slingerland (2003), reviewed in Musgrove *et al.* (2011)). The treatment of Sertoli cells with ouabain (1  $\mu$ M, 24 h) increased the expression of CCND1 (Fig. 4). 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) was used as a positive control (Lucas *et al.* 2010).



**Figure 1** Effect of ouabain on MAPK3/1 phosphorylation in rat Sertoli cells. Cells were incubated in the absence (C, control) and presence of increasing concentrations of ouabain for 5 min (A) or in the absence (C, control) and presence of 1  $\mu$ M ouabain for 2–30 min (B). Total cell lysates (60  $\mu$ g protein/lane) were resolved in 10% SDS/PAGE, transferred and probed with antibodies specific for phosphorylated (p) MAPK3/1 (top panel) or total (phosphorylation state-independent) MAPK3/1 proteins (bottom panel). The relative positions of pMAPK3/1 and total MAPK3/1 proteins are shown at the right. The data shown are representative of four independent experiments. Right panel: bars represent the densitometric analysis of the western blot assays. Solid bars, pMAPK3; open bars, pMAPK1. Results were normalized to total MAPK3/1 expression in each sample and plotted (mean  $\pm$  S.E.M.) in relation to control, C (=1). \*MAPK3/1 activation significantly greater than that of control ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test).



**Figure 2** Effect of ouabain on AKT (Ser473) phosphorylation in rat Sertoli cells. Cells were incubated in the absence (C, control) and presence of 1 μM ouabain for 5–30 min. Total cell lysates (60 μg protein/lane) were resolved in 10% SDS/PAGE, transferred and probed with antibodies specific for phosphorylated (p) AKT (Ser473) (top panel), or total (phosphorylation state-independent) AKT protein (bottom panel). The relative positions of pAKT and total AKT protein are shown at the right. The data shown are representative of four independent experiments. Bars represent the densitometric analysis of the western blot assays. Results were normalized to total AKT expression in each sample and plotted (mean ± S.E.M.) in relation to control, C (=1). \*AKT activation significantly greater than that of control ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test).

In order to evaluate which signaling pathways are involved in the expression of CCND1 in Sertoli cells, inhibitors of MAP2K1/2 (U0126) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (wortmannin) were used. Ouabain-induced CCND1 expression was blocked by pretreatment with U0126 (Fig. 5A). Wortmannin did not significantly change the expression of CCND1 induced by ouabain (Fig. 5A).

Transcription factors, such as CREB and NF-κB, are activated by different intracellular signaling pathway and are also involved in cell proliferation (Witzel *et al.* 2010, Royer *et al.* 2012). KG501, the compound that disrupts the phospho-CREB/CREB-binding protein (CPB) complex, blocked the expression of CCND1 induced by ouabain in Sertoli cells (Fig. 5B). On the other hand, pretreatment with NF-κB nuclear translocation inhibitor SN50 produced partial inhibition of CCND1 expression (Fig. 5B). The treatment with U0126, wortmannin,

KG501, and SN50 for 30 min, in the absence of ouabain, did not have any effect on CCND1 (data not shown).

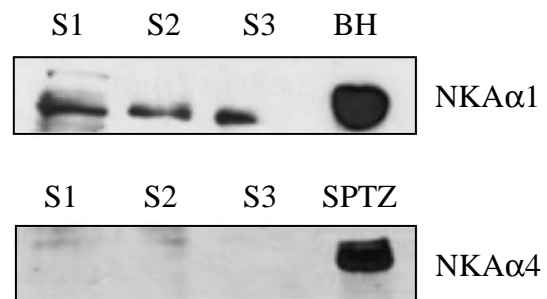
Ouabain caused an enhancement of 69% of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine incorporation after 24-h incubation (Fig. 6). In addition, pretreatment of Sertoli cells with U0126 and KG501 markedly reduced the [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into DNA induced by ouabain (Fig. 6). Pretreatment with SN50 only produced partial inhibition of this effect (Fig. 6).

Some cardiotoxic steroids, e.g. digitoxin, may interact with estrogen receptors (ERs; Rifka *et al.* 1976) and have been inferred as putative natural estrogens (Schussheim & Schussheim 1998). Sertoli cells express the classic estrogen receptors (ESR1 and ESR2). The activation of these receptors produces a rapid and transient increase in the phosphorylation of MAPK3/1 (Lucas *et al.* 2008a, 2008b) and AKT (Royer *et al.* 2012) and are blocked by the ER antagonist ICI 182 780 (Lucas *et al.* 2008a, 2008b). Thus, we tested whether ICI 182 780 affected ouabain-induced MAPK3/1 phosphorylation. As shown in Fig. 7, ICI 182 780 did not change MAPK3/1 phosphorylation induced by ouabain, indicating that ouabain did not play a role through ERs. The treatment with ICI 182 780 for 30 min, in the absence of ouabain, did not have any effect on MAPK3/1 phosphorylation (Fig. 7).

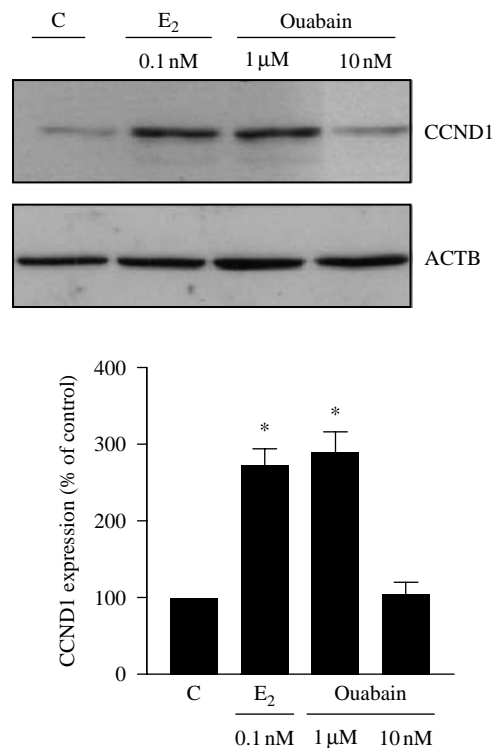
We also tested whether ICI 182 780 affected ouabain-induced CCND1 expression. As expected, ICI 182 780 did not change CCND1 expression induced by ouabain (data not shown).

### Discussion

Cardiotonic steroids have been extensively investigated due to their promising pharmacological, pathological, and physiological properties. It is now well established that cardiotonic steroids bind to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and modulate several signaling pathways (Pierre & Xie 2006).



**Figure 3** Detection of protein expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 and α4 isoforms in rat Sertoli cells. Total homogenates obtained from cultured Sertoli cells from 15-day-old rats (S1, S2, and S3; 80 μg protein/lane), rat brain hemispheres (BH; 10 μg protein/lane) and human spermatozoa (SPTZ; 20 μg protein/lane) were resolved in 10% SDS/PAGE, transferred and probed with antibodies specific for α1 and α4. BH and SPTZ were used as positive controls for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 and α4 isoforms respectively.



**Figure 4** Effect of ouabain on cyclin D1 (CCND1) expression in rat Sertoli cells. Cells were incubated in the absence (C, control) and presence of 10 nM and 1  $\mu$ M ouabain or 0.1 nM 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) for 24 h. Total cell lysates (40 protein/lane) were resolved in 15% SDS/PAGE, transferred and probed with an antibody specific for CCND1. The data shown are representative of five independent experiments. Bars represent the densitometric analysis of the western blot assays. Results were normalized to actin expression in each sample and plotted (mean  $\pm$  S.E.M.) in relation to control, C (= 100%). \*CCND1 expression significantly different from control ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test). E<sub>2</sub> was used as a positive control.

Sertoli cell plays a key role in spermatogenesis, and a better knowledge about the role of steroid hormones and growth factors in the regulation of the homeostasis and function of this cell will be important for the control of male fertility (reviewed in Lucas *et al.* (2011)).

Immature rat Sertoli cells responded to 1  $\mu$ M ouabain treatment in 5 min with a significant increase in MAPK3/1 and AKT phosphorylation. The activation of these effector kinases by ouabain at this concentration range has been reported in different rodent cell types and is consistent with the major/exclusive presence of the relatively insensitive Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 isoform (Haas *et al.* 2000, Elkareh *et al.* 2007, Liu *et al.* 2007, Pierre *et al.* 2008, Quintas *et al.* 2010). Ouabain has been shown to induce different time courses of activation of signaling pathways (Kometiani *et al.* 1998, Dmitrieva & Doris 2003, Kulikov *et al.* 2007, Nguyen *et al.* 2007, Pierre *et al.* 2008). Rat Sertoli cells exhibit a very quick and short-lived stimulation profile of the MAPK pathway by ouabain, similar to that reported for other cell types (Dmitrieva & Doris 2003, Pierre *et al.* 2008). This rapid

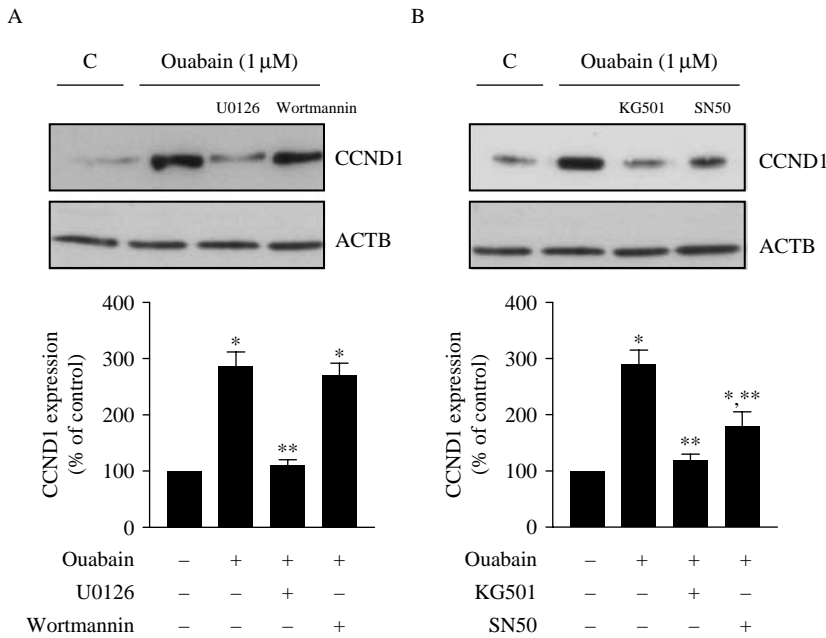
and transient increase in the phosphorylation state of MAPK3/1 by ouabain in Sertoli cells is similar to that observed with E<sub>2</sub> (Lucas *et al.* 2008a), G protein-coupled ER 1 (GPER) G-1 agonists (Lucas *et al.* 2010), retinol (Gelain *et al.* 2006), and FSH (Crépieux *et al.* 2001) in these cells. On the other hand, Sertoli cells respond with different kinetics of activation to the nonhydrolyzable androgen agonist R1881, which induces a rapid (1–15 min) and sustained (12 h) increase in the phosphorylation state of MAPK3/1 (Fix *et al.* 2004), or to carbachol, a stable analog of acetylcholine, which also induced a rapid and sustained phosphorylation of MAPK3/1 (1–60 min) (Lucas *et al.* 2008b). Therefore, these results suggest that the time-dependent activation of MAPK3/1 in Sertoli cells is agonist-specific.

Both MAPK3/1 and PI3K/AKT are associated with cell proliferation and viability (Mendoza *et al.* 2011) and ouabain has been shown to produce such effects (Dmitrieva & Doris 2003, Khundmiri *et al.* 2006, Tian *et al.* 2009). Our results demonstrate that in immature rat Sertoli cells, 1  $\mu$ M ouabain also induced proliferation, but this appears to be only dependent on MAPK3/1 as inhibition of PI3K/AKT pathway did not affect ouabain-evoked CCND1 overexpression. As a possible explanation, Khundmiri *et al.* (2007) reported that MAPK3/1 is a positive upstream regulator of AKT and it seems to be a specific feature of ouabain signaling. Nonetheless, AKT still depends on PI3K activity to be activated (Khundmiri *et al.* 2007). Thus, the role of AKT phosphorylation by ouabain in Sertoli cells needs further investigation.

In Sertoli cells, CREB is an important transducer of FSH (Walker *et al.* 1995), testosterone (Fix *et al.* 2004, Cheng *et al.* 2007), and E<sub>2</sub> (Royer *et al.* 2012) signals to induce gene expression. Ouabain stimulates CREB phosphorylation in the rat Sertoli cell line 93RS2 (Konrad *et al.* 2011), and in this study, ouabain also induced CCND1 expression and proliferation via CREB activity. Activation of CREB in Sertoli cells plays an important role in spermatogenesis. For instance, overexpression of a phosphorylation-defective CREB mutant in Sertoli cells *in vivo* results in apoptosis and elimination of germ cells (Scobey *et al.* 2001).

Ouabain-induced CCND1 expression and proliferation was partially dependent on NF- $\kappa$ B activity. In rat kidney cells and hippocampus, ouabain stimulates NF- $\kappa$ B causing cell proliferation and cellular protection (Li *et al.* 2006, Kawamoto *et al.* 2012). Thus, both NF- $\kappa$ B and CREB are the mediators of ouabain action in the proliferative activity of Sertoli cells and spermatogenesis.

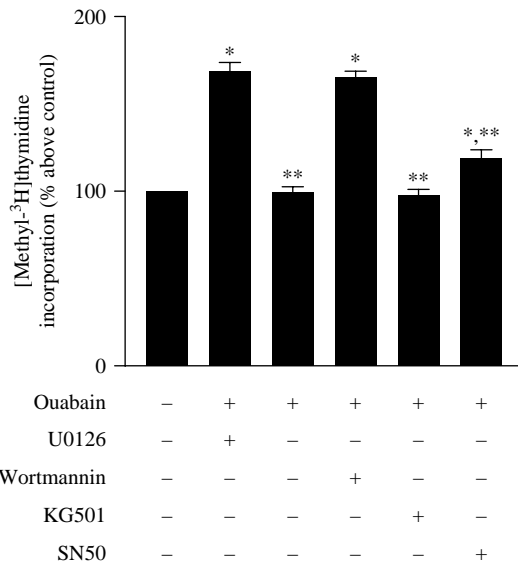
Using *in situ* hybridization and immunohistochemistry assays, previous studies reported that the adult testis has the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 4 isoform in mature sperm, but not in any other cell types including Sertoli and Leydig cells (Blanco *et al.* 2000, Woo *et al.* 2000). In fact, the  $\alpha$ 4 isoform (mRNA and protein) was not detected until 4 weeks of age and reached a maximum level of expression (threefold) at 6 weeks, indicating that this



**Figure 5** Signaling pathways involved on cyclin D1 (CCND1) expression induced by ouabain in rat Sertoli cells. Cells were untreated or pretreated with 20 μM MEK1/2 inhibitor (U0126), 1 μM PI3K inhibitor (wortmannin) (A), 25 μM disruptor of the CREB:CBP complex (KG501), or 1 μM NF-κB nuclear translocation inhibitor (SN50) (B) for 30 min. Cells were incubated in the absence (C, control) and presence of 1 μM ouabain for 24 h. Total cell lysates (40 μg protein/lane) were resolved in 15% SDS/PAGE, transferred and probed with an antibody specific for CCND1. The data shown are representative of five independent experiments. Bars represent the densitometric analysis of the western blot assays. Results were normalized to actin expression in each sample and plotted (mean ± S.E.M.) in relation to control, C (= 100%). \*CCND1 expression significantly different from control ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test). \*\*Significantly different from ouabain ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test).

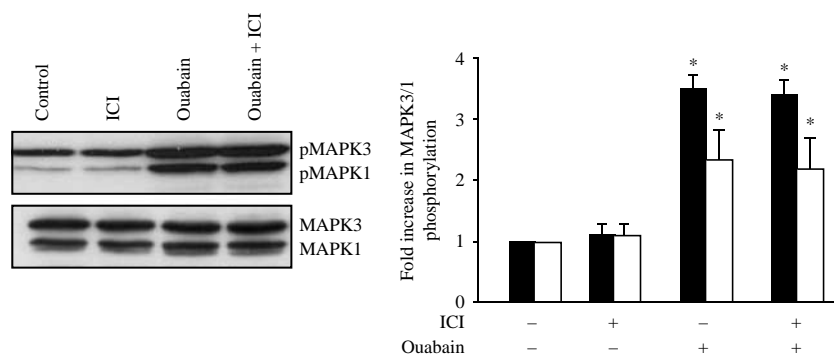
isoform is regulated in parallel to the onset of sexual maturity (Woo *et al.* 2000). The ubiquitous α1 isoform, on the other hand, was detected at a constant level throughout the life of the animal. Wagoner *et al.* (2005) showed low levels of α4 isoform in 1-week-old rat testis using a preparation enriched in germ cell types by means of unit gravity sedimentation method, thus preventing the interference of other testis cells, and in spermatogonia isolated from 10-day-old rats. In contrast, Konrad *et al.* (2011) detected the mRNA for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 and α4 isoforms in prepubertal rat-derived Sertoli cell line 93RS2 and in pubertal Sertoli cell line SCIT-C8, both immortalized cells (Jiang *et al.* 1997, Konrad *et al.* 2005). It is important to emphasize that, different from primary Sertoli cells, the immortalized cells fail to express androgen receptors and to respond to androgens and FSH (Konrad *et al.* 2005). The mRNA for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α4 isoform was also detected in primary culture of Sertoli cell from 19-day-old rat (Konrad *et al.* 2011); at this age, rat Sertoli cells start differentiation. We were not able to detect the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α4 isoform at the protein level in Sertoli cells obtained from immature rats (15-day-old), similar to the findings of Woo *et al.* (2000), and found that the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 present in these cells mediates a rapid ouabain-induced signaling cascade, which is to a great extent similar to the rapid signaling pathway triggered by testosterone and E<sub>2</sub>, and plays a role in Sertoli cell proliferation. Interestingly, differently from rodents, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 isoform is sensitive to cardiotonic steroids as ouabain (Touza *et al.* 2011).

The concentration of endogenous ouabain (Manunta *et al.* 2009, Neshet *et al.* 2009) is lower than that used in this study. In addition to systemic hormones, it is



**Figure 6** Effect of ouabain on rat Sertoli cell proliferation. Cells were initially incubated with 2 μCi/ml [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine for 6 h. Cells were untreated or pretreated with 20 μM MEK1/2 inhibitor (U0126), 1 μM PI3K inhibitor (wortmannin), 25 μM disruptor of the CREB:CBP complex (KG501), or 1 μM NF-κB nuclear translocation inhibitor (SN50) for 30 min. Afterward, cells were incubated in the absence (basal incorporation) and presence of 1 μM ouabain for 24 h. The reaction was stopped, the cells rinsed with ice-cold PBS and 5% trichloroacetic acid, and then solubilized with 0.5 N NaOH. Bound radioactivity was determined and the results were expressed in relation to control, basal levels of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine incorporation (absence of ouabain and inhibitors) as mean ± S.E.M. of five independent experiments performed in triplicate. \*[Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine incorporation activation significantly greater than control ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test). \*\*Significantly different from ouabain ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test).





**Figure 7** Effect of antiestrogen ICI 182 789 on MAPK3/1 phosphorylation induced by ouabain in rat Sertoli cells. Cells were untreated or pretreated with estrogen receptor (ESR1 and ESR2) antagonist ICI 182 780 (ICI, 0.1 nM) for 30 min. Afterward, cells were incubated in the absence (C, control) and presence of 1  $\mu$ M ouabain for 5 min. Total cell lysates (60  $\mu$ g protein/lane) were resolved in 10% SDS/PAGE, transferred and probed with antibodies specific for phosphorylated (p) MAPK3/1 (top panel), or total (phosphorylation state-independent) MAPK3/1 proteins (bottom panel). The relative positions of pMAPK3/1 and total MAPK3/1 proteins are shown at the right. The data shown are representative of four independent experiments. Right panel: bars represent the densitometric analysis of the western blot assays. Solid bars, pMAPK3; open bars, pMAPK1. Results were normalized to total MAPK3/1 expression in each sample and plotted (mean  $\pm$  S.E.M.) in relation to control, C (=1). \*MAPK3/1 activation significantly greater than that of control or ICI 182 780 ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test).

important to consider the local conversion of steroids and that intra-testicular androgens and estrogens levels do not always mirror systemic levels. The levels of these intra-testicular hormones are dependent on the presence and activity of local steroid-metabolizing enzymes, such as 5 $\alpha$ -reductase (Killian *et al.* 2003, Pratis *et al.* 2003) and aromatase (reviewed in Carreau *et al.* (2011) and Haverfield *et al.* (2011)), and the concentration of these steroids is very high in intra-testicular level than in plasma. The main source of endogenous ouabain is the adrenal cortex and hypothalamus (Laredo *et al.* 1995, Hamlyn *et al.* 1998). Interestingly, endogenous digoxin-like immunoreactivity has been detected in seminal fluid of men (Vadazs *et al.* 1992). Whether endogenous ouabain and/or other cardiotonic steroids might be produced by the testis, as the early precursors are present (pregnenolone and progesterone) and the sequential enzymes are unknown, remain to be explored and open questions for further studies.

In conclusion, these results indicate that ouabain- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$  may regulate the expression of CCND1 and proliferation in Sertoli cells through MAPK3/1/pCREB obtained from testes of immature rats. Furthermore, NF- $\kappa$ B is also partially involved in this effect. Our findings are important to clarify the role of ouabain in testis and to direct further studies, which may contribute to better understanding of the causes of male infertility.

## Materials and Methods

### Sertoli cell culture

Primary cultures of Sertoli cell were obtained from 15-day-old male Wistar rats housed in the Animal Facility at Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR), Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

(UNIFESP-EPM), and maintained on a 12 h light:12 h darkness lighting schedule, at 23  $^{\circ}$ C, with food and water *ad libitum*. The experimental procedures were conducted according to guidelines for the care and use of laboratory animals as approved by the Research Ethical Committee from UNIFESP-EPM (protocol 121/08). The testes were removed and decapsulated and Sertoli cells were prepared as described previously (Lucas *et al.* 2004, 2008a, 2008b, 2010). The cells ( $4.5 \times 10^5$  cells/ml) were plated at a density of  $4 \times 10^6$  cells/9 ml in 100 mm dish (about  $5 \times 10^4$  cells/cm $^2$ ) to allow the formation of monolayer in phenol red-free Ham F12/DMEM (1:1, Gibco, Invitrogen) containing 0.02 g/l gentamicin (Sigma Chemical Co.), pH 7.2–7.4, and supplemented with 10  $\mu$ g/ml insulin, 10  $\mu$ g/ml transferrin, 10 ng/ml sodium selenite, and 10 ng/ml epidermal growth factor (Sigma). Cells were grown in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ –95% air at 35  $^{\circ}$ C and, after 48 h, they were treated with 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, to lyse residual germ cells (Galdieri *et al.* 1981) and allowed to grow for another 24 h. Culture medium was replaced by another one without supplements 20 h before the experiments with Sertoli cells. At this stage, cells were 90–95% confluent and viable cells in each culture was more than 90% as determined by trypan blue exclusion. The presence of other cell types in the primary culture of Sertoli cells was evaluated by several criteria that confirmed the absolute predominance of Sertoli cells in the primary culture (Lucas *et al.* 2008a, 2008b).

### Human spermatozoa homogenates

Semen sample was collected by masturbation from a healthy adult donor enrolled in the Setor de Reprodução Humana e Infertilidade (Instituto de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro) with normal spermiogram. The procedure was approved by the Institutional Research Ethics Committee and a written informed consent was obtained. The sample was diluted 1:1 with cryoprotectant medium (test yolk buffer with glycerol) frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$   $^{\circ}$ C. Subcellular homogenate was performed according to

Blanco *et al.* (2000), with modifications. After thawed, the sample was centrifuged at 800 *g* for 10 min and the pellet resuspended in 0.32 M sucrose, 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EGTA, and homogenized using a glass-glass homogenizer. Protein concentration was determined by Bio-Rad protein assay, using BSA as standard (Bio-Rad Laboratories).

### **Western blot for detection of phospho- and total MAPK3/1 and AKT, CCND1, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ isoforms**

Primary Sertoli cell cultures were incubated in the absence (control) or presence of 0.1 nM–1  $\mu$ M ouabain (Sigma) for 5 min and 1  $\mu$ M ouabain for 2–30 min at 35 °C for detection of phospho- and total MAPK3/1 and/or AKT (Lucas *et al.* 2008a, 2008b). For CCND1, Sertoli cells were incubated with 1  $\mu$ M and 10 nM ouabain and/or E<sub>2</sub> (0.1 nM) for 24 h at 35 °C (Lucas *et al.* 2008a, 2008b). In some experiments, the cells were pretreated for 30 min with the ER antagonist ICI 162780 (0.1 nM, AstraZeneca, Macclesfield, UK), MAP2K1/2 inhibitor U0126 (20  $\mu$ M, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), PI3K inhibitor wortmannin (1  $\mu$ M, Sigma), disruptor of the CREB:CBP complex KG501 (25  $\mu$ M, Sigma), or translocation inhibitor of the NF- $\kappa$ B active complex into the nucleus SN50 (1  $\mu$ M, Calbiochem, San Diego, CA, USA).

Afterward, the medium was removed, cells were washed with ice-cold PBS, and lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; Sigma), as previously reported (Lucas *et al.* 2008a, 2008b, 2010). Total cell lysates (40  $\mu$ g protein/lane) were incubated with sample buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol and subjected to 10% SDS/PAGE. For Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  isoforms, total Sertoli cell lysates (80  $\mu$ g protein/lane) were used, as well as human spermatozoa (20  $\mu$ g protein/lane) and brain hemisphere (10  $\mu$ g protein/lane) preparations as positive controls for  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 1 isoforms respectively (Quintas *et al.* 2002). Proteins were electrotransferred onto PVDF membranes (0.45  $\mu$ m pore size, ImmobilonP, Millipore, Billerica, MA, USA) overnight, 20 V at 4 °C. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) containing 0.2% Tween 20 (TBST) and 5% nonfat dry milk for 2 h at room temperature. After washes in TBST, membranes were incubated with rabbit polyclonal antibodies against MAPK3/1 (p44/p42 MAP kinase, ERK1/ERK2, Cell Signaling Technology), phospho-MAPK3/1 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology), phospho-AKT (Ser473, Cell Signaling Technology), CCND1 (cyclin D1, Cell Signaling Technology) or  $\beta$ -actin (Sigma), rabbit MAB against AKT (AKT (pan), Cell Signaling Technology), mouse MAB against Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and mouse polyclonal antiserum against Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 4 (gently provided by Dr Gustavo Blanco, University of Kansas Medical Center, USA) diluted in blocking solution overnight at 4 °C. After incubation with donkey anti-rabbit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) or rabbit anti-mouse (Promega, Madison, WI, USA) HRP-conjugated secondary antibodies diluted in TBST for 1 h at room temperature,

proteins were visualized by enhanced chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences). Apparent molecular weights of these proteins were determined from molecular weight standards (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Band intensities from individual experiments were quantified by densitometric analysis of linear-range autoradiograms using Epson Expression 1680 scanner (Epson America, Inc., Long Beach, CA, USA) and Quick Scan 2000 WIN software (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Results were normalized based on total MAPK3/1, total AKT, or  $\beta$ -actin expression in each sample and plotted (mean  $\pm$  s.e.m.) in relation to control.

### **[Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assays**

For proliferation assays, Sertoli cells were prepared as described earlier and used for the experiments when the cultures reached a confluency between 50 and 60%. Incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine into cell DNA was estimated as described by Guizzetti *et al.* (1996) with slight modifications (Lucas *et al.* 2004, 2008a). In previous studies, we determined that incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine (2  $\mu$ Ci/ml, specific activity 79.0 Ci/mmol, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA, USA) in cultured Sertoli cells was time dependent and linear from 2 to 10 h of incubation. All studies were performed after incubation with [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine for 6 h (Lucas *et al.* 2004, 2008a). On day 4 of culture, primary Sertoli cells were incubated with 2  $\mu$ Ci/ml [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine for 6 h at 35 °C. Incubation was continued in the absence (basal incorporation) and presence of ouabain (1  $\mu$ M, Sigma) for 24 h at 35 °C. The cells were also untreated or pretreated with MEK1/2 inhibitor U0126 (20  $\mu$ M, Cell Signaling Technology; 30 min), PI3K inhibitor wortmannin (1  $\mu$ M, Sigma; 30 min), disruptor of the CREB:CBP complex KG501 (25  $\mu$ M, Sigma; 30 min), or NF- $\kappa$ B nucleus translocation inhibitor SN50 (1  $\mu$ M, Calbiochem; 30 min). Afterward, the cells were stimulated with ouabain (1  $\mu$ M, for 24 h) at 35 °C. The reaction was stopped by cooling the cells at 0 °C. The medium was aspirated and the cells rinsed twice with ice-cold PBS and 5% trichloroacetic acid (Sigma). The cells were then solubilized with 0.5 M NaOH, collected with cotton swabs, and transferred to 5 ml OptiPhase HiSafe-3 scintillation liquid (PerkinElmer Life Science Products, Boston, MA, USA). Bound radioactivity was determined in a scintillation  $\beta$  counter (LS 6000 IC, Beckman Coulter, Inc., Palo Alto, CA, USA). Results were expressed in relation to control, basal levels of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine incorporation (absence of ouabain and inhibitors).

### **Declaration of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **Funding**

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant number 2010/52306-8 to C S Porto) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à

Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), grant number E-26/110.370/2010 to L E M Quintas). T F G Lucas is recipient of FAPESP postdoctoral fellowship and L S Amaral CAPES PhD fellowship.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Whitaker Jean Jacques, Sirlene Lucena, and Drs Maria do Carmo Borges de Souza and Tônia Costa from Setor de Reprodução Humana e Infertilidade, Instituto de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, for providing human sperm sample. They are also grateful to Dr Gustavo Blanco from University of Kansas Medical Center for his valuable suggestions.

## References

- Abramowitz J, Dai C, Hirschi KK, Dmitrieva RI, Doris PA, Liu L & Allen JC 2003 Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Circulation* **108** 3048–3053. (doi:10.1161/01.CIR.0000101919.00548.86)
- Bagrov AY, Shapiro JI & Fedorova OV 2009 Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacological Reviews* **61** 9–38. (doi:10.1124/pr.108.000711)
- Blanco G, Sánchez G, Melton RJ, Tourtellotte WG & Mercer RW 2000 The  $\alpha 4$  isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **48** 1023–1032. (doi:10.1177/002215540004800801)
- Carreau S, Bouraima-Lelong H & Delalande C 2011 Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis* **1** 90–94. (doi:10.4161/spmg.1.2.16766)
- Cheng J, Watkins SC & Walker WH 2007 Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in Sertoli cells. *Endocrinology* **148** 2066–2074. (doi:10.1210/en.2006-1465)
- Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F & Reiter E 2001 The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* **20** 4696–4709. (doi:10.1038/sj.onc.1204632)
- Dmitrieva RI & Doris PA 2003 Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **278** 28160–28166. (doi:10.1074/jbc.M303768200)
- Elkareh J, Kennedy DJ, Yashaswi B, Vetteth S, Shidyak A, Kim EG, Smaili S, Periyasamy SM, Hariri IM, Fedorova L *et al.* 2007 Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* **49** 215–224. (doi:10.1161/01.HYP.0000252409.36927.05)
- Fedorova LV, Raju V, El-Okdi N, Shidyak A, Kennedy DJ, Vetteth S, Giovannucci DR, Bagrov AY, Fedorova OV, Shapiro JI *et al.* 2009 The cardiotoxic steroid hormone marinobufagenin induces renal fibrosis: implication of epithelial-to-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **296** F922–F934. (doi:10.1152/ajprenal.90605.2008)
- Fix C, Jordan C, Cano P & Walker WH 2004 Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *PNAS* **101** 10919–10924. (doi:10.1073/pnas.0404278101)
- Galdieri M, Ziparo E, Palombi F, Russo MA & Stefanini M 1981 Pure Sertoli cells culture: a new model for the study of somatic–germ cell interactions. *Journal of Andrology* **5** 249–259.
- Gelain DP, Cammarota M, Zanotto-Filho A, de Oliveira RB, Dal-Pizzol F, Izquierdo I, Bevilacqua LR & Moreira JC 2006 Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. *Cellular Signalling* **18** 1685–1694. (doi:10.1016/j.cellsig.2006.01.008)
- Guizzetti M, Costa P, Peters J & Costa LG 1996 Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *European Journal of Pharmacology* **297** 265–273. (doi:10.1016/0014-2999(95)00746-6)
- Haas M, Askari A & Xie Z 2000 Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal transducing function of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **275** 27832–27837.
- Hamlyn JM, Lu ZR, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ & Hamilton BP 1998 Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clinical and Experimental Hypertension* **20** 523–533. (doi:10.3109/10641969809053230)
- Haverfield JT, Ham S, Brown KA, Simpson ER & Meachem SJ 2011 Teasing out the role of aromatase in the healthy and diseased testis. *Spermatogenesis* **1** 240–249. (doi:10.4161/spmg.1.3.18037)
- Jiang C, Hall SJ & Boekelheide K 1997 Development and characterization of a prepubertal rat Sertoli cells line 93RS2. *Journal of Andrology* **18** 393–399.
- Jiang Y, Zhang Y, Luan J, Duan H, Zhang F, Yagasaki K & Zhang G 2010 Effects of bufalin on the proliferation of human lung cancer cells and its molecular mechanisms of action. *Cytotechnology* **62** 573–583. (doi:10.1007/s10616-010-9310-0)
- Kawamoto EM, Lima LS, Munhoz CD, Yshii LM, Kinoshita PF, Amara FG, Pestana RR, Orellana AM, Cipolla-Neto J, Britto LR *et al.* 2012 Influence of *N*-methyl-D-aspartate receptors on ouabain activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* **90** 213–228. (doi:10.1002/jnr.22745)
- Khundmiri SJ, Metzler MA, Ameen M, Amin V, Rane MJ & Delamere NA 2006 Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **291** C1247–C1257. (doi:10.1152/ajpcell.00593.2005)
- Khundmiri SJ, Amin V, Henson J, Lewis J, Ameen M, Rane MJ & Delamere NA 2007 Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **293** C1171–C1180. (doi:10.1152/ajpcell.00535.2006)
- Killian J, Pratis K, Clifton RJ, Stanton PG, Robertson DM & O'Donnell L 2003  $5\alpha$ -Reductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. *Biology of Reproduction* **68** 1711–1718. (doi:10.1095/biolreprod.102.009142)
- Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A & Xie Z 1998 Multiple signal transduction pathways link  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **273** 15249–15256. (doi:10.1074/jbc.273.24.15249)
- Konrad L, Munir Keilani M, Cordes A, Völck-Badouin E, Laible L, Albrecht M, Renneberg H & Aumüller G 2005 Rat Sertoli cells express epithelial but also mesenchymal genes after immortalization with SV40. *Biochimica et Biophysica Acta* **1722** 6–14. (doi:10.1016/j.bbagen.2004.10.015)
- Konrad L, Dietze R, Kirch U, Kirch H, Eva A & Scheiner-Bobis G 2011 Cardiotoxic steroids trigger non-classical testosterone signaling in Sertoli cells via the  $\alpha 4$  isoform of the sodium pump. *Biochimica et Biophysica Acta* **1813** 2118–2124. (doi:10.1016/j.bbamcr.2011.07.012)
- Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A & Scheiner-Bobis G 2007 Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochimica et Biophysica Acta* **1768** 1691–1702. (doi:10.1016/j.bbamem.2007.04.012)
- Laredo J, Hamilton BP & Hamlyn JM 1995 Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212** 487–493. (doi:10.1006/bbrc.1995.1996)
- Li J, Zelenin S, Aperia A & Aizman O 2006 Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF- $\kappa$ B. *Journal of the American Society of Nephrology* **17** 1848–1857. (doi:10.1681/ASN.2005080894)
- Li J, Khodus GR, Kruusmägi M, Kamali-Zare P, Liu XL, Eklöf AC, Zelenin S, Brismar H & Aperia A 2010 Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney. *Nature Communications* **1** 1–7. (doi:10.1038/ncomms1043)

- Liang J & Slingerland JM** 2003 Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* **2** 339–345. (doi:10.4161/cc.2.4.433)
- Liu L, Zhao X, Pierre SV & Askari A** 2007 Association of PI3K–Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **293** C1489–C1497. (doi:10.1152/ajpcell.00158.2007)
- Lopez LB, Quintas LEM & Noël F** 2002 Influence of development on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **131** 323–333. (doi:10.1016/S1095-6433(01)00482-2)
- Lucas TF, Avellar MC & Porto CS** 2004 Effects of carbachol on rat Sertoli cell proliferation and muscarinic acetylcholine receptors regulation: an *in vitro* study. *Life Sciences* **75** 1761–1773. (doi:10.1016/j.lfs.2004.05.006)
- Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS & Lazari MF** 2008a 17 $\beta$ -Estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* **78** 101–114. (doi:10.1095/biolreprod.107.063909)
- Lucas TF, Siu ER, Royer C, Trindade ES, Nader HB, Lazari MF & Porto CS** 2008b Muscarinic acetylcholine receptors: relevance to infertility and male contraception. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* **8** 42–50. (doi:10.2174/187152208783790769)
- Lucas TF, Royer C, Siu ER, Lazari MF & Porto CS** 2010 Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* **83** 307–317. (doi:10.1095/biolreprod.110.084160)
- Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF & Porto CS** 2011 17 $\beta$ -Estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis* **1** 318–324. (doi:10.4161/spmg.1.4.18903)
- Manunta P, Ferrandi M, Bianchi G & Hamlyn JM** 2009 Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease. *Journal of Hypertension* **27** 9–18. (doi:10.1097/HJH.0b013e32831cf2c6)
- Mendoza MC, Er EE & Blenis J** 2011 The Ras-ERK and PI3K–mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences* **36** 320–328. (doi:10.1016/j.tibs.2011.03.006)
- Mohammadi K, Liu L, Tian J, Kometiani P, Xie Z & Askari A** 2003 The positive inotropic effects of ouabain on the isolated heart is accompanied by the activation of signal pathways that link Na/K-ATPase to ERK1/2. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **41** 609–614. (doi:10.1097/00005344-200304000-00014)
- Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A & Sutherland RL** 2011 Cyclin D as therapeutic target in cancer. *Nature Reviews. Cancer* **11** 558–572. (doi:10.1038/nrc3090)
- Nesher M, Dvela M, Igbokwe VU, Rosen H & Lichtstein D** 2009 Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **297** H2026–H2034. (doi:10.1152/ajpheart.00734.2009)
- Nguyen A-NT, Wallace DP & Blanco G** 2007 Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *Journal of the American Society of Nephrology* **18** 46–57. (doi:10.1681/ASN.2006010086)
- Oliveira P, Sousa M, Barros A, Moura T & Rebelo da Costa A** 2009 Intracellular pH regulation in human Sertoli cells: role of membrane transporters. *Reproduction* **137** 353–359. (doi:10.1530/REP-08-0363)
- Pierre SV & Xie Z** 2006 The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell Biochemistry and Biophysics* **46** 303–316. (doi:10.1385/CBB:46:3:303)
- Pierre SV, Sottejeau Y, Gourbeau JM, Sánchez G, Shidyak A & Blanco G** 2008 Isoform specificity of Na-K-ATPase-mediated ouabain signaling. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **294** F859–F866. (doi:10.1152/ajprenal.00089.2007)
- Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, Stanton PG, McLachlan RI & Robertson DM** 2003 Differential regulation of rat testicular 5 $\alpha$ -reductase type 1 and 2 isoforms by testosterone and FSH. *Journal of Endocrinology* **176** 393–403. (doi:10.1677/joe.0.1760393)
- Quintas LEM, Lafayette SSL, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A & Noël F** 2002 Role of noradrenaline on the expression of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 2 isoform and the contractility of cultured rat vas deferens. *Biochemical Pharmacology* **64** 1431–1437. (doi:10.1016/S0006-2952(02)01359-X)
- Quintas LEM, Pierre SV, Liu L, Bai Y, Liu X & Xie ZJ** 2010 Alterations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase function in caveolin-1 knockout cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49** 525–531. (doi:10.1016/j.yjmcc.2010.04.015)
- Rato L, Socorro S, Cavaco JEB & Oliveira PF** 2010 Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *Journal of Membrane Biology* **236** 215–224. (doi:10.1007/s00232-010-9294-x)
- Rifka SM, Pita JC Jr & Loriaux DL** 1976 Mechanism of interaction of digitalis with estradiol binding sites in rat uteri. *Endocrinology* **99** 1091–1096. (doi:10.1210/endo-99-4-1091)
- Royer C, Lucas TF, Lazari MF & Porto CS** 2012 17 $\beta$ -Estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* **86** 1–13. (doi:10.1095/biolreprod.111.096891)
- Schussheim DH & Schussheim AE** 1998 Is digoxin a designer oestrogen? *Lancet* **351** 1734. (doi:10.1016/S0140-6736(05)77771-0)
- Scobey M, Bertera S, Somers J, Watkins S, Zeleznik A & Walker W** 2001 Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CREB) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology* **142** 948–954. (doi:10.1210/en.142.2.948)
- Tian J, Li X, Liang M, Liu L, Xie JX, Ye Q, Kometiani P, Tillekeratne M, Jin R & Xie Z** 2009 Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth. *Journal of Biological Chemistry* **284** 14921–14929. (doi:10.1074/jbc.M808355200)
- Touza NA, Pôças ES, Quintas LEM, Cunha-Filho G, Santos ML & Noël F** 2011 Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotoxic steroids on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in human kidney membrane preparation. *Life Sciences* **88** 39–42. (doi:10.1016/j.lfs.2010.10.027)
- Vadazs A, Jakobi P, Stoler J, Makler A & Krivoy N** 1992 Endogenous digoxin-like immunoreactivity measured in seminal fluid from a normal male population. *Gynecologic and Obstetric Investigation* **33** 236–238. (doi:10.1159/000294891)
- Wagoner K, Sanchez G, Nguyen AN, Enders GC & Blanco G** 2005 Different expression and activity of the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 4 isoforms of the Na,K-ATPase during rat male germ cell ontogeny. *Reproduction* **130** 627–641. (doi:10.1530/rep.1.00806)
- Walker WH, Fucci L & Habener JF** 1995 Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells. *Endocrinology* **136** 3534–3545. (doi:10.1210/en.136.8.3534)
- Witzel II, Koh LF & Perkins ND** 2010 Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochemical Society Transactions* **38** 217–222. (doi:10.1042/BST0380217)
- Woo AL, James PF & Lingrel JB** 2000 Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **275** 20693–20699. (doi:10.1074/jbc.M002323200)

---

Received 18 June 2012

First decision 15 July 2012

Revised manuscript received 4 September 2012

Accepted 28 September 2012