AMANDA GALVÃO DA PAIXÃO

EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PROTEÍNA PTEN SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO EM CÉLULAS GLIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

> São Paulo 2018

AMANDA GALVÃO DA PAIXÃO

EFEITOS DA INIBIÇÃO DA PROTEÍNA PTEN SOBRE A NEUROINFLAMAÇÃO EM CÉLULAS GLIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Versão Corrigida.

São Paulo 2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Galvão da Paixão, Amanda Efeitos da inibição da proteína PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais / Amanda Galvão da Paixão; orientadora Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe. -- São Paulo, 2018. 80 p.
Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
1. PTEN. 2. Neuroinflamação. 3. Células gliais. I. Mitiko Kawamoto Iwashe, Elisa , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Amanda Galvão da Paixão

Título da Dissertação: Efeitos da inibição da proteína PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais

Orientador: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a, considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Presidente:	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	



Cidade Universitária "Armando de Sailes Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 801/2016 referente ao projeto intitulado: "Avaliação dos efeitos da compartimentalização da PTEN em células de gliobastoma humano (U87MG) submetidas a estímulo inflamatório" sob a responsabilidade de Amanda Galvão da Paixão e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Elisa Mitiko Kawamoto, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela CEUA -Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPSH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 18 de março de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. Paolo M. A. Zanotto

Coordenador CEPSH ICB/USP



Universidade de São Paulo Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos da inibição farmacológica da proteína PTEN sobre sua compartimentalização (núcleo/citoplasma) em células gliais frente à neuroinflamação", protocolada sob o CEUA nº 9099090318, sob a responsabilidade de **Elisa Mitiko Kawamoto** *e equipe; Amanda Galvão Paixão* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 02/05/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the effects of pharmacological inhibition of PTEN on its compartmentalization (nucleus/cytoplasm) in glial cells against the neuroinflammation", utilizing 100 Heterogenics rats (100 males), protocol number CEUA 9099090318, under the responsibility of **Elisa Mitiko Kawamoto** and team; Amanda Galvão Paixão - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/02/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses

Depto/Setor: Farmacologia

Origem:	Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso:	0 a 7 dias
Linhagem:	Wistar		N amostral:	100

São Paulo, 28 de maio de 2018

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) Dr. Alexandre Ceroni Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III / Cidade Universitária, Butantă - CEP 05508-000 - São Paulo/SP - tel: 55 (11) 3091-7733 HorĂirio de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 16h : e-mail: cep@icb.usp.br CEUA N 9099090318

Aos meus pais, Marineide e Edimilson.

AGRADECIMENTOS

À Marineide, minha mãe, minha motivação maior e meu exemplo de força e caráter – seu amor e apoio incondicionais me encorajam a perseverar e me relembram constantemente que não há dificuldade tão grande que não se possa superar. Ao Edimilson, meu pai, aquele que nunca poupou esforços para me oferecer o seu melhor, para impulsionar minhas escolhas profissionais e torná-las sustentáveis.

Ao Davi, meu porto seguro e melhor amigo, por me aconselhar e encorajar. Com palavras de sabedoria, me amparou quando mais precisei. Com seu amor, me fortaleceu. Com sua companhia, deu leveza e alegria a minha caminhada.

Aos meus sogros. A Vânia, por todo o amor, carinho e cuidado – sempre que precisei, fui amparada e cuidada por você. Ao Geraldo, por todo o zelo e pelas conversas esclarecedoras sobre a vida – suas sábias palavras me acompanharam durante esta caminhada. Sobretudo, agradeço pela amizade, por me acolherem como sua filha e por dividirem comigo tantos momentos de sua vida.

À Ariany, minha irmã e exemplo de abnegação, por constantemente me trazer à memória o imensurável valor da dedicação àqueles que amo. À Bruna, ao Bruno, à Sara e ao Filipe, meus cunhados e irmãos de coração, por me adotarem como irmã, por sempre acreditarem em mim e pelos incontáveis momentos compartilhados, os quais sempre vêm à memória repletos de alegria e gratidão.

Ao Arthur, meu sobrinho, por me ensinar que ser trivial é, na verdade, ser extraordinário e que a verdadeira alegria repousa na inocência e no amor.

À minha amiga e irmã Elizabeth, pelas conversas construtivas, risadas e amparo compartilhados. Sobretudo, por seus ensinamentos estimulantes e desafiadores.

À Profa. Ângela, por despertar minha paixão pela docência com sua dedicação e exemplo sem iguais.

À Elisa Kawamoto, minha orientadora, cuja colaboração, incentivo, ensinamentos – da bancada às análises e discussões – e oportunidade confiada a mim foram fundamentais para que este trabalho se tornasse uma realidade.

Ao Cristoforo Scavone, meu co-orientador, cuja empolgação torna o ambiente profissional mais acolhedor, e a ciência, uma paixão.

À Larissa Lima, pela imensa empatia e paciência, e pelo amparo técnico e motivacional incomparáveis. À Diana Andreotti, por toda a assistência, proatividade e paciência, e por dividir comigo tantas risadas e ideias inovadoras.

À Jacqueline Alves, pela parceria e conselhos encorajadores, pelo amparo e acolhimento. A amizade mais verdadeira nasce em meio à crise – quando não há perspectiva de se receber nada em troca, e mesmo assim, se oferece tudo que lhe é possível. À Natália Mello, por compartilhar tantos momentos – leves e loucos – de diversão, reflexão, acontecimentos do dia-a-dia e, eventualmente, treinos de karatê e corridas – os mais ilustres. À Ana Maria Orellana, pelos ensinamentos, discussões e auxílio indispensáveis. Ao Caio Mazucanti, pelo aprendizado proporcionado e pela empolgação que muito me estimulou. À Paula Kinoshita, pela serenidade em ouvir e aconselhar, e por fazer dos momentos mais divertidos, os mais memoráveis com as melhores trilhas sonoras.

A todos os meus parceiros de laboratório, João Victor Costa, Geovanni Moraes, Marina Cararo, Andrea Vasconcelos, Vinicius Nakao, Beatriz Sakashita, Amanda Matumoto e Paloma Mello, por transformarem o ambiente profissional em um local imensamente agradável e colaborativo, e por compartilharem comigo tantos momentos do dia-a-dia – fossem cômicos ou trágicos, na companhia de vocês havia leveza em cada um deles.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, Camila, Miriam, Rosa e, especialmente, à Mônica pela imensa paciência e proatividade.

Ao Prof. Dr. Emer Ferro, à Dra. Rosângela Eichler, ao Prof. Dr. Luiz Roberto Britto e ao Dr. Adilson Alves, que, com prontidão, me cederam seu tempo e equipamentos, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo #2016/07376-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo essencial apoio financeiro.

"Se as coisas são inatingíveis... ora! Não é motivo para não querê-las... Que tristes os caminhos, se não fora A presença distante das estrelas!"

(QUINTANA, 1951, p. 213)

RESUMO

Paixão, AG. **Efeitos da inibição da proteína PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais**. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Outrora proposta exclusivamente como fosfatase citoplasmática, hoje sabe-se que as funções da PTEN vão além de sua atividade de fosfatase e podem depender de sua localização na célula. Evidências crescentes apontam para o potencial papel da PTEN sobre a inflamação. Este trabalho objetivou investigar os efeitos modulatórios da PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais. Células gliais primárias de rato foram co-tratadas com BpV(pic) e LPS por períodos de 4h e 24h. Células U87MG foram desafiadas com LPS e transfectadas com os plasmídeos para localização subcelular da PTEN. Os efeitos foram avaliados por ensaios de viabilidade celular, Western Blotting, imunofluorescência, gRT-PCR, ELISA e Multiplex. A eficiência de inibição da PTEN pelo BpV(pic) foi confirmada pela maior fosforilação da AKT. Em 24h de co-tratamento com BpV(pic), houve redução da resposta ao LPS para as citocinas IL-1 β e TNF- α tanto a nível de RNAm quanto proteico, bem como indução da enzima Arginase-1 e atenuação da expressão do receptor CD206. Ainda em 24h, houve indução da expressão das enzimas antioxidantes Sod2 e Gsr nas células co-tratadas com BpV(pic) e LPS. Em 4h de cotratamento, a inibição da PTEN por si só induziu a secreção da citocina IL-6. Tanto o BpV(pic) exclusivamente quanto o co-tratamento com LPS não interferiu com a sinalização de IL-10 nem com os níveis de NO. Interessantemente, o desafio com LPS em células U87MG não induziu resposta via translocação de p65, mas reduziu a viabilidade celular em altas concentrações (100 µg/mL). A transfecção das células com plasmídeos para localização subcelular da PTEN sugere que a linhagem U87MG parece não ser facilmente transfectável pelos métodos avaliados. A inibição farmacológica da PTEN mostrou-se um interessante alvo à reversão da resposta glial ao LPS. A continuidade deste estudo com outros esquemas de tratamento com BpV(pic) e utilizando-se um modelo de células PTEN^{null} mais facilmente transfectável pode levar a uma melhor interpretação dos dados obtidos até o momento.

Palavras-chave: PTEN. Neuroinflamação. Células gliais.

ABSTRACT

Paixão, AG. Effects of PTEN inhibition over neuroinflammation in glial cells. 2018. 87 f. Master's thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Formerly exclusively proposed as cytoplasmic phosphatase, it is now clear that PTEN function is beyond its phosphatase activity and it may be cell compartment-dependent. Growing evidences point to the modulatory potential of PTEN over inflammation. This study aimed to investigate the modulatory effects of PTEN over neuroinflammation in glial cells. Primary rat glial cells received BpV(pic) and LPS co-treatment for periods of 4h and 24h. U87MG cells were challenged with LPS and transfected with plasmids for PTEN subcellular localization. The effects were analyzed by cellular viability, Western Blotting, immunofluorescence, gPCR, ELISA and Multiplex assays. The inhibition eficiency of PTEN by BpV(pic) was confirmed by increased AKT phosphorylation. Twenty-four hours post co-treatment, a reduced glial response to LPS was observed to IL-1β and TNF-α cytokines both at mRNA and protein levels as well as induction of enzyme Arginase-1 and attenuated expression of CD206 receptor. In addition, at the time of 24h, an induction of the antioxidant enzymes SOD2 e GSR was observed in co-treated cells. At 4h of cotreatment, PTEN inhibition alone induces IL-6 secretion. Both BpV(pic) alone and LPS co-treatment did not interfere on IL-10 signalization and in NO levels neither. Interestingly, LPS challenged U87MG cells did not respond by p65 translocation, but it reduced cellular viability in high concentrations (100 µg/mL). Cell transfection with plasmids for PTEN subcellular localization suggests that U87MG lineage are not easily transfectable by protocols tested in this study. Pharmacologic PTEN inhibition proved to be an interesting target to LPS glial response attenuation. Complementary analysis by other BpV(pic)-treatment regimens and using a model of PTEN^{null} cells more easily transfectable may take to a better understading of the data we got so far.

Key-words: PTEN. Neuroinflammation. Glial cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AP-1	Proteína ativadora 1
Arg-1	Arginase 1
BCL-2	Linfoma de células B 2
BCL-XL	Linfoma de células B extra grande
BGP	Proteína óssea G1a
BpV(pic)	Dipotássio bisperoxovanadio (pic)
BSA	Albumina do soro bovino
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CD206	<i>Cluster</i> de diferenciação 206
cDNA	DNA complementar
CGP	Células gliais primárias
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase 2
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ligado ao AMP
D.O.	Densidade Óptica
DAMPs	Padrão molecular associado ao dano tecidual
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietil dicarbonato
DMEM	Meio Eagle Dulbeco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dnase	Desoxirribonuclease
DTT	DL-Ditiotreitol
E.P.M.	Erro padrão da média
ECL	Quimioluminescência aumentada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido Tetracético Etilenoglicol
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EROs	Espécies reativas de oxigênio

FOXO	Forkhead box
G	Força centrífuga relativa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPx	Glutationa peroxidase
GSR	Glutationa redutase
H₃PO4	Ácido fosfórico
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HPRT-1	Hipoxantina fosforobosil transferase 1
IBA-1	Fator inflamatório do aloenxerto 1
IFN-γ	Interferon-y
IL-10	Interleucina-10
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
KC	Queratinócito quimioatraente
KCI	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
LB	Luria Bertani
LCC	Lesão induzida por constrição crônica
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAMs	Membranas associadas à mitocôndria
MCL-1	Proteína de diferenciação de células de leucemia mielóide induzida
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NAD+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NAHCO₃	Bicarbonato de sódio
NED	N-(1-naftil)etilenodiamina
NES-Pten	Sequência de exclusão nuclear da PTEN
NK-ĸB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NLS-Pten	Sequência de localização nuclear da PTEN
NO	Óxido nítrico
NO ₂ -	Nitrito
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
NP-40	Nonidet 40
NRF2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
PAMPs	Padrão molecular associado ao patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDK	Proteína quinase dependente de fosfoinositol
PDK1	Quinase dependente de fosfoinositídeo
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIP ₂	Fosfatidilinotisol-4,5-bisfosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PMSF	Inibidor de protease
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PTEN	Fosfatase e tensina homóloga deletada no cromossomo dez
PTEN-L	PTEN-Long
PTK	Receptor tirosina quinase
q.s.p.	quantidade suficiente para
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa
S473	Serina 473
S6	Proteína ribossomal S6
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino

SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Fator transdutor de sinais e ativador de transcrição 2
T308	Treonina 308
ТА	Temperatura ambiente
TBS	Tampão Tris-Salina
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TORC1	Alvo do complexo de rapamicina 1
TORC2	Alvo do complexo de rapamicina 2
Tris-HCI	Cloridrato de Tris
TTBS	Tampão Tris-salina com Tween-20
VV	Vetor vazio
WT-Pten	Sequência selvagem da PTEN

1.1. Neuroinflamação. 11 1.2. PTEN: sinalização, função e localização subcelular 2 1.3. PTEN e inflamação. 2 2. OBJETIVOS. 2 2. Objetivo Geral 2 2. Objetivo Específico. 2 3. MATERIAIS E MÉTODOS 2 3.1. Documentação Requerida 2 3.2. Cultivo de células 2 3.2.1. U87MG 2 3.3.1. LPS de Escherichia coli 2 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 2 3.4. Ensaio de viabilidade celular por MTT 2 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 3
1.2. PTEN: sinalização, função e localização subcelular 2 1.3. PTEN e inflamação 2 2. OBJETIVOS 2 2.1. Objetivo Geral 2 2.2. Objetivo Específico 2 3. MATERIAIS E MÉTODOS 2 3.1. Documentação Requerida 2 3.2. Cultivo de células 2 3.2. Cultivo de células 2 3.2.1. U87MG 2 3.3. Tratamentos 2 3.3.1. LPS de Escherichia coli 2 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 2 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 2 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 3
1.3. PTEN e inflamação 22 2. OBJETIVOS 23 2.1. Objetivo Geral 24 2.2. Objetivo Específico 24 2.3. MATERIAIS E MÉTODOS 26 3.1. Documentação Requerida 26 3.2. Cultivo de células 26 3.2. Cultivo de células 26 3.2.1. U87MG 26 3.3. Tratamentos 26 3.3.1. LPS de Escherichia coli 26 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 26 3.4. Ensaios de viabilidade celular por MTT 26 3.4.1. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 36
2. OBJETIVOS 24 2.1. Objetivo Geral 24 2.2. Objetivo Específico 24 3. MATERIAIS E MÉTODOS 26 3.1. Documentação Requerida 26 3.2. Cultivo de células 26 3.2.1. U87MG 26 3.2.2. Células gliais primárias 26 3.3.1. LPS de Escherichia coli 26 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 26 3.4. Ensaios de viabilidade celular por MTT 29 3.4.1. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 36
2.1. Objetivo Geral 21 2.2. Objetivo Específico 21 3. MATERIAIS E MÉTODOS 20 3.1. Documentação Requerida 20 3.2. Cultivo de células 20 3.2. Cultivo de células 20 3.2.1. U87MG 20 3.2.2. Células gliais primárias 21 3.3. Tratamentos 21 3.3.1. LPS de Escherichia coli 21 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 22 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade 21 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 31
2.2. Objetivo Específico. 21 3. MATERIAIS E MÉTODOS 20 3.1. Documentação Requerida 20 3.2. Cultivo de células 20 3.2. Cultivo de células 20 3.2.1. U87MG 20 3.2.2. Células gliais primárias 20 3.3. Tratamentos 21 3.3.1. LPS de Escherichia coli 21 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 22 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 21 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 22 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 30
3. MATERIAIS E MÉTODOS 26 3.1. Documentação Requerida 26 3.2. Cultivo de células 26 3.2. Cultivo de células 26 3.2.1. U87MG 26 3.2.2. Células gliais primárias 27 3.3. Tratamentos 26 3.3.1. LPS de Escherichia coli 28 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 28 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 29 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 29 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 30
3.1. Documentação Requerida 20 3.2. Cultivo de células 20 3.2.1. U87MG 20 3.2.2. Células gliais primárias 20 3.3. Tratamentos 20 3.3.1. LPS de Escherichia coli 20 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 20 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 20 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 20 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 30
3.2. Cultivo de células 20 3.2.1. U87MG 20 3.2.2. Células gliais primárias 21 3.3. Tratamentos 22 3.3.1. LPS de Escherichia coli 22 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 22 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 22 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 23 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 30
3.2.1. U87MG 26 3.2.2. Células gliais primárias 27 3.3. Tratamentos 28 3.3.1. LPS de Escherichia coli 28 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 28 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 29 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 29 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 30
3.2.2. Células gliais primárias 27 3.3. Tratamentos 28 3.3.1. LPS de Escherichia coli 28 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 28 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 29 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 29 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 30
3.3. Tratamentos 23 3.3.1. LPS de Escherichia coli 24 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic)) 24 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 24 3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT 25 3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase 36
 3.3.1. LPS de Escherichia coli
 3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic))
 3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade
3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT293.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase30
3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase
3.5. Purificação dos plasmídeos
3.6. Transfecção com DNA plasmidial
3.6.1. FuGENE Transfection Reagent
3.6.2. Lipofectamina 3000
3.6.3. Método Cálcio-Fosfato
3.7. Ensaios Bioquímicos e Moleculares
3.7.1. Imunofluorescência
3.7.2. Extração de proteínas totais
3.7.3. Extração de proteínas citosólicas e nucleares40
3.7.4. Determinação da concentração de proteínas4 ⁴
3.7.5. Western Blotting
3.7.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)42
3.7.7. Ensaio Imunológico de Multiplex42
3.7.8. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real43
3.8. Análise dos resultados
4.1. Células gliais primárias (CGP)
4.1.1. Caracterização da cultura de CGP4

SUMÁRIO

4.1.2. Tratamento com LPS é tóxico às CGP de forma concentração- e tempo- dependente
4.1.3. Tratamento com BpV(pic) não interfere com a viabilidade de CGP 47
4.1.4. Tratamento com BpV(pic) induz a ativação da AKT de forma transiente.49
4.1.5. A inibição da PTEN altera a expressão de RNAm de genes associados à resposta inflamatória em CGP desafiadas com LPS
4.1.6. A inibição da PTEN altera o perfil de citocinas inflamatórias
4.1.7. A inibição da PTEN altera a expressão de RNAm de genes associados à defesa antioxidante em CGP
4.1.8. A inibição da PTEN não interfere com os níveis de NO em CGP desafiadas com LPS
4.1.9. Tratamento com BpV(pic) não interfere com a compartimentalização subcelular da PTEN
4.2. Células U87MG 62
4.2.1. Estímulo com LPS altera a viabilidade de células U87MG de forma concentração- e tempo-dependente
4.2.2. O NF- κB é constitutivamente ativado em células U87MG 63
5. DISCUSSÃO
5.1. Eficiência do BpV(pic): sinalização da AKT65
5.2. Perfil inflamatório e oxidativo
5.3. Compartimentalização e inibição de atividade da PTEN
5.4. Perfil inflamatório de células U87MG70
6. CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS73
APÊNDICE

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neuroinflamação

Outrora tido como imunologicamente isolado, hoje se sabe que o sistema nervoso central (SNC) possui competência imune para responder contra potenciais invasores e danos em seu microambiente, os quais podem suscitar uma resposta inflamatória (revisado em CARSON et al., 2006). A resposta inflamatória do SNC – nomeadamente, a neuroinflamação – requer a mobilização de células gliais, neurônios e células não-neurais para incitar complexas vias de sinalização a nível celular e molecular em resposta às perturbações no sistema. As células da glia (micróglias, astrócitos, oligodendrócitos e células precursoras de oligodendrócitos), especialmente as micróglias e os astrócitos, são as células melhor equipadas para responder a essas perturbações (revisado em JÄKEL; DIMOU, 2017; revisado em SOFRONIEW, 2015a).

Apesar da importância das células gliais na neuroinflamação, a participação de cada tipo celular e sua respectiva ação regulatória sobre esta resposta pode ser díspar. Os oligodendrócitos, por exemplo, são descritos, primariamente, como as células gliais produtoras e mantenedoras da bainha de mielina presente nos axônios dos neurônios. Embora a desregulação de funções dos oligodendrócitos também esteja associada a doenças inflamatórias crônicas (MICHALSKI; KOTHARY, 2015; WATZLAWIK; WARRINGTON; RODRIGUEZ, 2010), os astrócitos e as micróglias são as células-chave da resposta inflamatória cerebral. É importante ressaltar, contudo, que a plasticidade funcional dessas células vai muito além da inflamação (revisado em SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Astrócitos e micróglias inspecionam e são altamente sensíveis a perturbações em seu microambiente, onde atuam no controle da resposta imune no SNC, na remoção de restos celulares e na homeostase tecidual, desempenhando um papel crucial à defesa e ao reparo tecidual frente à neuroinflamação (revisado em SOFRONIEW, 2015b; revisado em KIELIAN, 2014). Tanto astrócitos quanto micróglias podem se tornar reativos para responder a essas perturbações e, em conjunto com neurônios e células não-neurais, ativam mecanismos celulares e moleculares com potencial pró- ou anti-inflamatório dependendo do estímulo de ativação (revisado em FARINA; ALOISI; MEINL, 2007). No caso da micróglia, em condições saudáveis, esta célula permanece em estado de repouso, assumindo uma morfologia ramificada. A micróglia pode ser ativada por estímulos pró-inflamatórios como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs) e, em resposta a estes estímulos, assume uma morfologia do tipo ameboide, a qual facilita seu deslocamento através do tecido (TORRES-PLATAS et al., 2014)

Uma vez ativada, a microglia pode responder diferencialmente dependendo de seu espectro de ativação. Ao se ligarem a receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs), diversos PAMPs e DAMPs podem levar à ativação microglial (revisado em LEHNARDT, 2010). Como parte integrante da parede celular de bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) é um PAMP crucial à sobrevivência deste patógeno e um potente estímulo à ativação do espectro microglial do tipo M1, suscitando um padrão de expressão gênica para elementos, cuja desregulação torna-os tóxicos às células, como síntese e liberação de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias - fator de necrose tumoral (TNF)-a e interleucina (IL)-1β, por exemplo -, indução de enzimas, como óxido nítrico sintase (NOSi) e ciclooxigenase (COX)-2, além de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (revisado em CARNIGLIA et al., 2017; CHEN et al., 2012; revisado em ROJO et al., 2014), tais eventos são consideravelmente modulados pela estimulação do fator de transcrição nuclear (NF)-kB (revisado em SHABAB et al., 2017). O NF-KB é composto pelas subunidades p65 (ou ReIA), ReIB, c-Rel, p50 e p52, as quais podem interagir formando homodímeros e heterodímeros aptos a estimular a expressão gênica diferencialmente dependendo da associação entre as subunidades. A ativação deste fator de transcrição pode decorrer da interação entre os dímeros p50/p65, por exemplo (revisado em GILMORE, 2006; revisado em GLEZER et al., 2000; SCHMITZ; BAEUERLE, 1991).

Enquanto a ativação microglial prolongada e a consequente liberação excessiva de elementos pró-inflamatórios podem ser tóxicas aos neurônios, a atividade microglial, por outro lado, também pode levar à resolução da resposta inflamatória via espectro de ativação do tipo M2 (revisado em HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014). Este fenótipo de ativação microglial pode estimular a expressão gênica para codificar a secreção de citocinas anti-inflamatórias - IL-4 e IL-10 -, receptores de superfície, como o *cluster* de diferenciação (CD)206, enzimas como a arginase (arg)-1 e proteínas de defesa antioxidante, como superóxido dismutase (SOD) e

glutationa redutase (GSR) (revisado em CARNIGLIA et al., 2017; CHHOR et al., 2013; revisado em ROJO et al., 2014).

1.2. PTEN: sinalização, função e localização subcelular

A ampla associação da perda de função e mutação no gene PTEN (Fosfatase e tensina homóloga deletada no cromossomo dez) à tumorigênese confirma sua relevância para a manutenção da condição celular sadia (revisado em SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012). Como fosfatase bi-funcional, a PTEN é apta à remoção de fosfatos tanto de substratos protéicos quanto lipídicos - polipeptídeos e fosfoinositídeos, respectivamente. Ao desfosforilar o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) em fosfatidilinotisol-4,5-bisfosfato (PIP₂), a PTEN antagoniza a ação de vias posteriores a ela, as quais incluem a proteína quinase B (AKT), o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e a quinase da proteína ribossomal S6 (S6K) (AKT/mTOR/S6K) e, assim, regula um vasto conjunto de processos vitais, ao qual estão incluídos processos como metabolismo energético, sobrevivência, proliferação, síntese proteica, ciclo e crescimento celular, cuja ruptura está intimamente associada ao desenvolvimento de tumores (Figura 1) (revisado em CHEN; GUO, 2017; revisado em HOPKINS et al., 2014)

Outrora proposta exclusivamente como fosfatase citoplasmática, hoje se sabe que o conjunto de funções da PTEN vai além de sua atividade de fosfatase, e, eventualmente, dependente de sua localização entre os diferentes compartimentos celulares. Evidências crescentes sustentam a ideia de que a PTEN seja capaz de se distribuir através da célula e de translocar de um compartimento celular a outro (revisado em BASSI; STAMBOLIC, 2013). De fato, a PTEN pode se localizar no núcleo, no citoplasma, na membrana plasmática, em organelas citoplasmáticas e pode ser secretada pelas células em sua forma alongada – PTEN-*Long* (PTEN-L), a qual, devido a sua permeabilidade membranar, pode inserir-se na célula e interagir com outras células, nas quais modula a ativação da PI3K (revisado em BONONI; PINTON, 2015; HOPKINS et al., 2013)

Durante a apoptose regulada por Ca²⁺, um aumento da localização da PTEN no retículo endoplasmático (RE) é observável, sugerindo que a PTEN modula a liberação do íon nesta organela celular (BONONI et al., 2013). Na mitocôndria, a PTEN-L mostrou-se essencial à preservação da função e estrutura mitocondriais (revisado em BONONI; PINTON, 2015; LIANG et al., 2014).

Interessantemente, um estudo conduzido em células U87MG (PTEN^{null}) revelou que a PTEN pode se comportar diferentemente no citosol e no núcleo. A inserção de PTEN em células PTEN^{null} removeu os níveis de PIP₃ da membrana plasmática, contudo, o mesmo efeito não foi observado quanto aos níveis nucleares, mesmo após transfecção exclusivamente nuclear da PTEN na célula (LINDSAY et al., 2006). Ademais, a PTEN nuclear desempenha um importante papel em processos associados à estabilidade do genoma, atuando no reparo de DNA, na integridade cromossomal, senescência e ciclo celular, bem como é capaz de regular diversos outros processos via interação proteína-proteína, como, por exemplo, o crescimento celular e a transcrição gênica via interação com o fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta AMP (CREB) (revisado em CHEN; GUO, 2017; BASSI et al., 2013; GU et al., 2011).



Figura 1 – Via de sinalização PI3K/AKT/PTEN com seus principais elementos.

Receptores do tipo tirosina quinase, como o receptor de insulina, uma vez ativados levam à fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e consequentemente da PI3K, ativando-a. Como quinase, a PI3K converte o PIP₂ em PIP₃, propiciando o acoplamento da

quinase dependente de fosfoinositídeo (PDK) à AKT, a qual é fosforilada, ativando elementos posteriores da via, como o complexo mTORC1 e a S6 quinase (S6K). Esta, por sua vez, leva à fosforilação de seu substrato, a S6. Além disso, a S6K participa de um mecanismo de retroalimentação negativo à fosforilação do IRS e consequentemente reduz a sinalização da via PI3K/AKT. A PTEN, como fosfatase, converte o substrato PIP₃ em PIP₂, inibindo a via da AKT. Fonte: Adaptado de COSTA, 2017.

1.3. PTEN e inflamação

Sabe-se que as funções da PTEN estão além da supressão tumoral e proteção do genoma, sendo ainda mais amplas. Nos últimos anos, têm crescido o conjunto de evidências que apontam para um potencial papel modulatório da PTEN sobre a inflamação.

Evidências sugerem que citocinas inflamatórias, como o fator de transformação do crescimento (TGF)- β e o TNF- α , regulam a expressão desta fosfatase (revisado em CHEN; GUO, 2017). Enquanto a deleção do TNF- α é capaz de induzir a expressão da PTEN (DA COSTA et al., 2016), níveis mais elevados de TGF- β podem reprimir sua atividade de fosfatase ao estimular a fosforilação da PTEN – o que leva à inativação da proteína (AOYAMA et al., 2013; YANG et al., 2015)

Quanto à neuroinflamação, HUANG et al. 2015 exploraram o potencial papel modulatório da PTEN sobre a dor neuropática, a qual está intrinsecamente associada à neuroinflamação. Ratos com lesão induzida por constrição crônica (LCC), cujo aumento de expressão da PTEN foi induzido por injeção adenoviral, apresentaram redução da inflamação intra-articular e central, com redução da fosforilação de mTOR (p-mTOR), da liberação de TNF-a e, consequentemente, da sensibilização nociceptiva (HUANG et al., 2015). Em contrapartida, em estudo conduzido por WANG *et al.* 2014 observou-se que camundongos com deleção da PTEN modulada pelo promotor de insulina-2 de rato (*Rip-Cre*) exibem polarização macrofágica predominantemente M2 (WANG et al., 2014).

Desta forma, embora o conjunto de descobertas relacionadas à PTEN esteja distribuído em vasta literatura científica ao longo das últimas décadas, as descobertas atuais ainda são limitadas e apontam para um papel dual da PTEN frente ao processo inflamatório. Assim, o presente estudo buscou responder à seguinte pergunta: quais os possíveis efeitos da PTEN sobre a neuroinflamação em

células gliais? Este trabalho se baseou na hipótese de que a resposta ao LPS e a localização subcelular da PTEN possam estar modificadas em células gliais cuja PTEN esteja inibida, de modo que a célula deficiente em PTEN seja capaz de expressar um padrão gênico e proteico diferencial comparado às células com a PTEN funcional, com consequente desregulação de citocinas inflamatórias, enzimas antioxidantes, genes associados à inflamação e translocação citoplasma-núcleo da PTEN, assim, a sinalização e a compartimentalização da PTEN seriam essenciais à resposta inflamatória no SNC. Por fim, este trabalho encaminha respostas que podem aprofundar a compreensão dos efeitos da PTEN sobre a neuroinflamação, as doenças associadas à deleção e mutação da PTEN, as doenças neurodegenerativas e, agregado a estudos futuros, pode contribuir ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as condições supracitadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral avaliar os possíveis efeitos da inibição da PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais.

2.2. Objetivo Específico

a. Investigar os efeitos da inibição de atividade da PTEN sobre sua compartimentalização em células gliais primárias e a potencial modulação destes efeitos sobre a neuroinflamação induzida pelo LPS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Documentação Requerida

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, estando inscrito sob número 801/2016. Também, o presente projeto está de acordo com o Princípio Ético em Pesquisa Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). O protocolo experimental seguiu todas as exigências descritas pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

3.2. Cultivo de células

3.2.1. U87MG

As células da linhagem U87MG (PTEN^{null}) são células gliais neoplásicas derivadas de glioma humano, as quais apresentam perda de heterozigose no braço cromossômico 10q do gene da PTEN (CLARK et al., 2010), são responsivas ao desafio com LPS (BRAGANHOL et al., 2015) e apresentam expressão ubíqua do TLR4 (Figura 2), do qual o LPS é um agonista clássico. Assim, estas células foram escolhidas como ferramenta para investigar a resposta de células PTEN^{null} ao LPS, bem como seu potencial de transfecção com plasmídeos para localização subcelular da PTEN.



Figura 2 - Perfil de expressão da PTEN e do TLR4 em células U87MG.

Imunorreatividade ao anticorpo (A) anti-PTEN (fluorescência verde ausente) e ao marcador nuclear DAPI com imagem sobreposta de (B) PTEN e DAPI. As fotomicrografias são representativas de cinco experimentos independentes. Imunorreatividade ao anticorpo (C) anti-TLR4 (fluorescência verde) e ao marcador nuclear DAPI (fluorescência roxa) com imagem sobreposta de **(D)** TLR4 e DAPI. As fotomicrografias são representativas das triplicatas de um experimento, tendo sido analisados cinco campos por poço. Todas as fotomicrografias foram adquiridas em aumento de 20x. Escala 50 µM.

As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em garrafas T75 na concentração inicial de 5 x 10^5 células/mL em *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com alta concentração de glicose (4,5 g/L) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), glutamina (2 mM), penicilina (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e de NaHCO₃ (1,5 g/L) em estufa a 37° C com atmosfera úmida e 5% CO₂. Para realizar a passagem e o plaqueamento das células, estas foram tratadas com solução de tripsina/EDTA ao atingirem a confluência de 70-80%. Em seguida, as células foram mantidas em cultivo nas condições preditas em garrafas T75 (5 x 10^5 células/mL) ou em placas de 24 poços (5 x 10^4 células/mL) para a passagem ou para o plaqueamento, respectivamente. As células foram utilizadas até a décima passagem.

3.2.2. Células gliais primárias

O protocolo de extração e cultivo de células gliais primárias (CGP) foi adaptado de Mecha et al. (2011). Para a obtenção das CGP foram utilizados ratos Wistar neonatos provenientes do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). As células foram obtidas do córtex cerebral de neonatos com 0-2 dias de idade. Após a eutanásia do animal, a qual foi habitualmente realizada no período da manhã, o cérebro foi transferido a uma placa Petri contendo Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS), prosseguindo-se com a remoção da meninge. Em seguida, o córtex cerebral foi extraído e transferido a um tubo tipo Falcon contendo 10 mL de DMEM gelado isento de SFB. As estruturas coletadas foram lavadas 1x com DMEM gelado isento de SFB e, posteriormente, dissociadas em DMEM gelado enriquecido com 20% de SFB com o auxílio de uma pipeta. O tecido dissociado foi centrifugado a 168 g por 10 min a 4º C seguido pelo descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em 2 mL/córtex de DMEM enriquecido com 20% de SFB. Foram distribuídos 300 µL do conteúdo em garrafas T75 contendo 12 mL de DMEM enriquecido com 20% de SFB, as quais foram mantidas em estufa a 37º C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. No dia seguinte à extração das células, o meio das garrafas foi substituído por DMEM novo a fim de remover o máximo de células mortas e restos celulares possíveis. Por fim, as células foram mantidas em cultivo por 10-15 dias sem trocas

de meio durante o período. Para os experimentos posteriores, as células foram cultivadas em placas de 6 ou 24 poços nas concentrações de 1 x 10⁶ e 1 x 10⁵ células/mL, respectivamente.

3.3. Tratamentos

3.3.1. LPS de Escherichia coli

Previamente ao tratamento, a solução de LPS de *E. coli* (1 mg/mL de LPS dissolvido em solução NaCl 0,9%) foi dissolvida em vórtex vigorosamente por cerca de 30 segundos. Para a padronização, foram utilizadas as seguintes concentrações da solução de LPS em µg/mL: 0,01; 0,1; 1;10 e 100. Para dar início ao tratamento, tanto células U87MG quanto CGP foram cultivadas por cerca de 48h em placas de 24 poços em DMEM enriquecido com 10% SFB. Em seguida, as células confluentes (70-80%) foram lavadas 1x com DMEM sem SFB e, posteriormente, estimuladas com 1 mL de meio de cultivo isento de SFB contendo LPS em diferentes concentrações. Para o controle, foi utilizado 1 mL de DMEM sem SBF contendo solução de NaCl 0,9%. O desafio das células com LPS foi realizado durante 4h e 24h em estufa a 37° C com atmosfera úmida e 5% de CO2. Após o período de tratamento, prosseguiu-se com os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade, bioquímicos e moleculares mencionados a seguir.

3.3.2. Dipotássio bisperoxovanadio (pic) (BpV(pic))

O tratamento com o inibidor da PTEN (BpV(pic)) foi adaptado de Lai, Dalton e Knoell (2007). A solução de BpV(pic) foi preparada na concentração de 10 mM de BpV(pic) dissolvido em solução de NaCl 0,9% e foi agitada vigorosamente. Inicialmente, foram utilizadas as seguintes concentrações da solução de BpV(pic) em µM para padronização: 0,01; 0,1; 1 e 10. Previamente ao tratamento, CGP foram cultivadas por cerca de 48h em placas de 6 ou 24 poços em DMEM enriquecido com 10% SFB. Ao atingirem uma confluência de 80-90%, as células foram lavadas 1x com DMEM isento de SFB e, posteriormente, adicionou-se às células 1 mL de DMEM isento de SFB contendo solução de BpV(pic). As células-controle receberam 1 mL de DMEM isento de SFB contendo solução de BpV(pic). As células-controle receberam 6 cora durante 0,5h e 24h em estufa a 37° C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Por fim, foram realizados ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade, bioquímicos e moleculares.

CÉLULAS	FONTE	CATÁLOGO
U87MG	BCRJ	0241
REAGENTES	FONTE	CATÁLOGO
BpV(pic)	Sigma-Aldrich	SM0885
Cytotox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega	G1780
DMEM	Vitrocell	00025
ELISA IL-10	R&D Systems	DY522-15
ELISA TNF-α	R&D Systems	DY210-05
E.Z.N.A. Total RNA Kit I	Ômega	R6834-01
Fugene 6 Transfection Reagent	Promega	E2691
HBSS	Gibco	14175-095
Immuno-Mount	Thermo Scientific	9990402
Immobilon Western	Millipore	WBKLS0500
ImProm-II Reverse Transcription System	Promega	A3800
Lipofectamina 3000	Thermo Scientific	L30000-015
LPS (E. coli)	Sigma-Aldrich	L2630
Milliplex	Merk Millipore	RECYTMAG-65K
MTT	Sigma-Aldrich	M2128
OptiMEM	Gibco	31985062
Penicilina/Estreptomicina	Gibco	15140-122
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	5000006
Qiagen Plasmid Kits	Qiagen	12162
SBF	Gibco	12657-029
Tripsina/EDTA	Vitrocell	002500

Quadro 1 - Lista de reagentes: células, químicos e kits.

3.4. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade

3.4.1. Ensaio de viabilidade celular por MTT

O ensaio para aferir a viabilidade das células foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983). Para avaliar a resposta celular ao MTT após o estímulo com LPS (U87MG e CGP) e o tratamento com BpV(pic) (CGP), as células foram tratadas com os compostos conforme previamente descrito nos itens 3.3.1. e 3.3.2. desta seção. Ao final do período de incubação dos tratamentos, o meio de cultivo foi completamente substituído por 100 µL de solução concentrada de MTT (5 mg de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) dissolvido em 1 mL de Tampão Fosfato-Salino (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM e água destilada) diluída em DMEM fresco isento de SFB. Após 4h de incubação com a solução de MTT em DMEM em estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO₂, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizando-se com a pipeta até a completa dissolução das células. Por fim, a absorbância foi aferida em comprimento de onda de 570 nm em espectofotômetro (Epoch, BioTek e *software* Gen5).

3.4.2. Ensaio de citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A citotoxidade aos tratamentos com LPS e BpV(pic) foi aferida pela mensuração da liberação de LDH. Este ensaio consiste na detecção da LDH liberada no sobrenadante por células danificadas (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983). Para tanto, foi utilizado o *kit Cytotox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, seguindo-se as recomendações do fabricante (Promega). Ao término dos tratamentos com LPS e BpV(pic) conforme descrito nos itens 3.3.1. e 3.3.2. dessa seção, foram transferidos 50 µL do sobrenadante das células CGP tratadas a uma placa de 96 poços e, posteriormente, foram adicionados 50 µL da mistura de reação (diaforase/NAD+) ao sobrenadante, o qual foi incubado por 30 min a temperatura ambiente (TA). A seguir, foram adicionados 50 µL da *Stop Solution*, a qual foi incubada por 1h a TA. Por fim, a absorbância foi aferida em comprimento de onda de 490 nm em espectofotômetro (Epoch, BioTek e *software* Gen5).

3.5. Purificação dos plasmídeos

A purificação dos plasmídeos foi realizada seguindo-se as recomendações do fabricante *Qiagen Plasmid Kits* (Qiagen). As bactérias transformadas com os plasmídeos de interesse VV (vetor vazio), NLS-*Pten* (sequência de localização nuclear), NES-*Pten* (sequência de exclusão nuclear) e WT-*Pten (Pten* selvagem) foram fornecidas pela Dra. Simonetta Camandola do Laboratório de Neurociências do *National Institutes of Health* (NIH, Baltimore, EUA). As bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) *overnight*. A cultura de bactérias resultante foi centrifugada a 1.700 x g por 40 min a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi removido e o *pellet* remanescente foi ressuspendido em 10 mL de tampão de lise.

Posteriormente, foram adicionados 10 mL de tampão alcalino e a solução foi vigorosamente agitada por inversão dos tubos e incubada por 5 min a TA. Na sequência, foram adicionados 10 mL do tampão de neutralização e novamente as células foram agitadas por inversão dos tubos e incubadas em gelo por mais 20 min. As células foram centrifugadas a 1.700 x g por 40 min a 4 °C e o sobrenadante contendo DNA plasmidial foi removido. Repetiu-se a etapa de centrifugação. Em seguida, à coluna contendo filtros com resina, foram adicionados 10 mL de tampão de lavagem com alto teor de sais. Após a filtragem, o DNA foi lavado 2x com 10 mL de tampão de lavagem com baixo teor de sais e em seguida eluído em 15 mL de tampão de eluição. Ao DNA eluído, foram adicionados 10,5 mL de isopropanol a TA para a remoção dos sais. A solução resultante foi homogeneizada e centrifugada a 15.000 x g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o DNA foi lavado em 5 mL de etanol 70%, e centrifugado a 15.000 x g por 10 min. Novamente, o sobrenadante foi removido e o *pellet* remanescente ressuspendido em 100 µL de água livre de DNase. Por fim, a concentração de DNA foi quantificada em NanoDop 2000 UV-Vis Spectophotometer (Thermo Scientific).

3.6. Transfecção com DNA plasmidial

Para o teste da transfecção de células U87MG com os plasmídeos VV, WT-*Pten*, NLS-*Pten* e NES-*Pten*, as células foram cultivadas em placas de 24 poços DMEM enriquecido com 10% de SFB e livre de antibiótico. Quarenta e oito horas após o plaqueamento, prosseguiu-se com as transfecções com os diferentes reagentes e protocolos descritos a seguir.

3.6.1. FuGENE Transfection Reagent

A transfecção com o *FuGENE 6 Transfection Reagent* foi realizada conforme as recomendações do fabricante (Promega), com adaptações. Foram adicionados às células 100 µL de OptiMEM (Meio Reduzido de Soro) contendo a proporção de 3:2 ou 3:3 de *FuGENE 6 Transfection Reagent*:DNA plasmidial (Vetor Vazio (VV), Selvagem (WT)-*Pten*, Sequência de localização nuclear (NLS)-*Pten* e Sequência de exclusão nuclear (NES)-*Pten*), sendo que a concentração final de plasmídeos na solução foi de 5 µg/µL (VV, WT-*Pten* e NES-*Pten*) e 10 µg/µL (NLS-*Pten*). As células transfectadas foram incubadas por 24h, prosseguindo-se com a fixação com PFA 4% para o ensaio de imunofluorescência. Por este ensaio, confirmou-se a ausência de expressão da PTEN nas células controle (não transfectadas) (APÊNDICE A) e nas células transfectadas com o plasmídeo VV (Figura 3), o qual não carrega sequência para localização subcelular da PTEN na célula. Entre as poucas células transfectadas com os plasmídeos WT-*Pten* e NES-*Pten*, observa-se uma marcação puntiforme para a PTEN, a qual se mostra mais acentuada e em torno do núcleo das células transfectadas com o plasmídeo NES-*Pten*, conforme esperado para o padrão de expressão deste plasmídeo. Entre as células transfectadas com o plasmídeo. Entre as células transfectadas com o plasmídeo NES-*Pten*, a co-localização com o marcador DAPI é visível nas fotomicrografias, indicando aumento de expressão da PTEN no núcleo das células. A maior taxa de transfecção para este plasmídeo, deve-se, provavelmente, a maior proporção *FuGENE*:DNA plasmidial, equivalente a 3:3 neste experimento. Não foi possível obter uma taxa de transfecção satisfatória com o método acima descrito.

3.6.2. Lipofectamina 3000

A transfecção foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Scientific) com algumas modificações. Em um tubo tipo eppendorf, foram diluídos 4 µL da solução P300 e 2 µg de DNA plasmidial (VV, WT-Pten, NLS-Pten e NES-Pten) em 50 µL de OptiMEM. Em outro tubo, foram diluídos em 3 µL de Lipofectamina 3000 em 50 µL de OptiMEM. Em seguida, o conteúdo dos tubos foi misturado na proporção de 1:1 de complexo DNA-lipídeo e incubado por 15 min a TA. Ao terminar o período de incubação, as células foram lavadas 1x com DMEM isento de SFB e 100 µL da mistura foram adicionados às células. Após 1h, 2h e 4h o meio foi completamente substituído por DMEM enriquecido com 10% de SFB ou, após os mesmos períodos citados, foram adicionados 900 µL de DMEM suplementado com 10% SFB às células contendo o complexo de DNA-lipídeo, para prevenir o dano celular causado pela presença do reagente no meio de cultivo. As células foram mantidas nessa condição por 48h. É possível notar pela confluência das células (80-90%) que essa abordagem, de fato, preveniu a morte celular (Figura 4, APÊNDICE B-C). Ainda, nota-se a ausência de expressão da PTEN nas células controle (não transfectadas) (APÊNDICE A) e nas células transfectadas com VV. A quantificação revela que a porcentagem de células transfectadas é muito baixa (≥1%), sendo que cerca de 1% das células analisadas passaram a expressar a PTEN após a transfecção. Não foram observadas diferenças na taxa de transfecção

entre os diferentes tempos testados (1h, 2h e 4h).

Alternativamente, as células foram incubadas com a solução Lipofectamina-DNA e após 4h de incubação foram adicionados 900 µL de DMEM acrescido de 10% de SFB, sem remoção prévia da solução. As células permaneceram nesta condição por 72h até a fixação com PFA 4% para o ensaio de imunofluorescência. Ao verificar a imunorreatividade das células à PTEN após a transfecção, observou-se que, aparentemente, uma quantidade maior de células foi transfectada com os plasmídeos em relação ao protocolo anterior, contudo, pelo padrão de imunoreatividade ao DAPI, é notável que a não remoção da Lipofectamina do meio de cultivo, de fato, pode ter ocasionado danos às células (Figura 5). A imunorreatividade das células ao anticorpo anti-FLAG, o *tag* repórter dos plasmídeos, indica baixa imunorreatividade à proteína.

3.6.3. Método Cálcio-Fosfato

Devido às taxas de transfecção insatisfatórias obtidas com os reagentes FuGENE e Lipofectamina 3000, prosseguiu-se com a transfecção pelo método Ca²⁺-Fosfato, cujo protocolo foi adaptado de Jiang e Chen (2006). Em um tubo tipo eppendorf, foram diluídos 3,1 µL de CaCl₂ 2 M e 3 µg de DNA plasmidial (VV, WT-Pten, NLS-Pten e NES-Pten) em água q.s.p. 25 µL. Em outro tubo, foram adicionados 25 µL de 2x HBSS. A seguir, o conteúdo dos tubos foi misturado gota a gota e gentilmente agitado. Posteriormente, o complexo DNA-solução Ca²⁺-Fosfato foi incubado por 20 min sem agitação. As células foram lavadas 1x com DMEM isento de SFB e, em seguida, 50 µL da solução foram adicionados às células gota a gota. As células foram incubadas na solução por 3h em estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO2. Após este período, foram adicionados 950 µL de DMEM suplementado com 10% de SFB às células, as quais foram novamente incubadas, totalizando 24h de transfecção. Após 3h e 24h, as células foram fotografadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão)) com sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C. A análise do perfil morfológico das células após a transfecção indica que houve morte celular após adição da solução de Ca²⁺-Fosfato com e sem plasmídeos (Figura 6). Com base na análise, o método Ca²⁺-Fosfato, conforme o protocolo descrito acima, apresentou-se tóxico às células U87MG, inviabilizado o ensaio de imunofluorescência para determinar a eficiência de transfecção.



Figura 3 - Padrão de imunorreatividade à PTEN em células U87MG transfectadas com os plasmídeos VV, WT-*Pten*, NLS-*Pten* e NES-*Pten*.

Imunorreatividade ao anticorpo anti-PTEN (fluorescência verde) em células transfectadas com os plasmídeos (A) VV, (C) WT-*Pten*, (E) NES-*Pten* e (G) NLS-*Pten* e ao marcador nuclear DAPI (fluorescência azul). Respectivas imagens sobrepostas de (B, D, F, H) PTEN e DAPI com setas indicando as células transfectadas. Fotomicrografias em aumento de 20x. As imagens são representativas de três experimentos independentes. Escala: 50 µM

Figura 4 - Imunorreatividade à PTEN em células U87MG transfectadas com os plasmídeos VV, WT-*Pten*, NLS-*Pten* e NES-*Pten* com remoção da Lipofectamina 3000 após 2h.



Quantificação de células PTEN+ após a transfecção. (B) Fotomicrografias representativas das células após a transfecção. Imunorreatividade ao anticorpo anti-PTEN (fluorescência verde) em células trasfectadas com os plasmídeos (a) VV, (c) WT-*Pten*, (e) NLS-*Pten* e (f) NES-*Pten*. Respectivas imagens sobrepostas de (b, d, f, h) PTEN e DAPI (fluorescência azul) e PTEN. Fotomicrografias em aumento de 20x. As imagens são representativas de um experimento realizado em duplicata. Escala: 50µm.
Figura 5 - Imunorreatividade à PTEN e ao *tag* repórter dos plasmídeos VV, WT-*Pten*, NLS-*Pten* e NES-*Pten* em células U87MG após transfecção de células U87MG com Lipofectamina 3000 por 72h.



Imunoreatividade à PTEN e à FLAG (*tag* repórter), respectivamente, em células U87MG trasfectadas com os plasmídeos VV (**A**, **B**), WT-Pten (**C**, **D**), NLS-Pten (**E**, **F**) e NES-Pten (**G**, **H**). Imagens sobrepostas de DAPI (fluorescência azul), PTEN (fluorescência verde) e FLAG (fluorescência vermelha) (**E**, **F**, **G**, **H**, **J**). Fotomicrografias em aumento de 20x. As imagens são representativas de um experimento realizado em duplicata. Escala: 50µm.



Figura 6 - Perfil morfológico e morte de células U87MG após a transfecção pelo método Ca²⁺-Fosfato.

(A, B) Células U87MG antes da transfecção. (C,D) Células não trasfectadas. Células transfectadas com os plasmídeos (E, F) VV, (G, H) WT-*Pten*, (I, J) NLS-*Pten* e (K, L) NES-*Pten*. As células foram monitoradas 3h e 24h após receberem a solução de transfecção. As fotomicrografias mostram a modificação na morfologia e a morte celular após a transfecção com Ca²⁺-Fosfato nos períodos indicados. As imagens são representativas de três experimentos independentes para cada tempo testado. Fotomicrografias em aumento de 20x. Escala: 50μM.

É provável que fatores como pH instável no meio de cultivo, concentração de CO₂ oscilatória da estufa, acúmulo excessivo de partículas de Ca²⁺-Fosfato no meio intracelular e tempo de incubação inadequado sejam possíveis explicações para a morte das células e consequente ineficiência da transfecção, já que o método Ca²⁺-Fosfato, por ser menos tóxico às células em comparação a outras formulações, como as lipossomais, por exemplo, é amplamente utilizado para transfecção de células dificilmente transfectáveis e altamente susceptíveis à morte, como os neurônios (JIANG; CHEN, 2006).

3.7. Ensaios Bioquímicos e Moleculares

3.7.1. Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado de acordo com protocolo descrito por Glynn e McAllister (2006), com adaptações. As células foram fixadas com PFA 4% por 10 min a 4º C e lavadas 3x em PBS, e armazenadas a 4º C até o momento de uso. No dia do ensaio de imunofluorescência, as células foram lavadas com solução de glicina 0,1 M em PBS por 5 min sob agitação leve e, em seguida, com PBS 1x. A membrana das células foi permeabilizada com reagente de permeabilização (0,25% Triton-X-100 em PBS) por 5 min e, posteriormente, as células foram lavadas 1x com PBS. Para minimizar ligações inespecíficas, foi adicionada solução de bloqueio (Albumina de soro bovina (BSA) 10% em PBS) às células por 1h. Em seguida, foram adicionados 30 µL de anticorpos primários (anti-PTEN, 1:150), anti-DYKDDDDK (1:1000), anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP, 1:1000), anti-fator inflamatório do aloenxerto 1 (IBA-1, 1:250), anti-PAN-Neuronal (1:1000) e anti-p65 (1:100)) diluídos em BSA 3% às células que foram incubadas overnight. No dia seguinte, as células foram lavadas 3x em BSA 3% por 5 min cada lavagem. Então, foram adicionados 100 µL de anticorpos secundários (Alexa Fluor 488 1:1000, Alexa Fluor 594 1:1000) diluídos em BSA 3% e as células foram incubadas por 1h a TA, protegendo-as da luz. Posteriormente, foram realizadas três lavagens de 5 min cada com PBS 1x e, na sequência, as células foram incubadas com DAPI (1:50.000) diluído em PBS. Após a incubação, as células foram novamente lavadas 2x com PBS por 5 min. As lâminas foram permeabilizadas com Immuno-Mount diluído em PBS na proporção de 1:1 e seladas com esmalte. As células analisadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão) com sistema de captura de imagem Nikon Digital Câmera DXM 1200C.

Quadro 2 - Lista de reagentes: anticorpos para imunofluorescência e *Western Blotting.*

ANTICORPO	FONTE	CATÁLOGO
AKT	Santa Cruz	sc-1619
Alexa Fluor 488 anti-mouse	Life Technologies	A21202
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	Life Technologies	A21206
Alexa Fluor 594 anti-goat	Life Technologies	A11058
Alexa Fluor 594 anti-rabbit	Life Technologies	A21207
Anti-goat	KPL	04-13-06
Anti-rabbit	KPL	04-15-06
Anti-mouse	KPL	04-18-06
DAPI	Life Technologies	D1306
DYDDDDK	Cell Signaling	#8146
GFAP	eBioscience	53-9892-80
IBA-1	Abcam	ab5076
p65	Santa Cruz	sc-372
PAN-Neuronal	Merk Millipore	MAB2300
p-AKT SER473	Cell Signaling	#9271
p-AKT T308	Cell Signaling	#9275
PTEN	Abcam	ab79156
PTEN	Cell Sinaling	#138G6
S6	Cell Signaling	#2217
p-S6	Cell Signaling	#2211
β-actina	Sigma-Aldrich	A1978

3.7.2. Extração de proteínas totais

A extração de proteínas foi baseada no método utilizado em nosso laboratório com algumas modificações (KINOSHITA et al., 2017). As células foram raspadas com espalhador (tipo rodo - *scraper*) em 1 mL de PBS e foram transferidas a um tubo tipo *eppendorf*, centrifugando-o a 2000 x g por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 100 μ L de tampão de lise (Hepes 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, NP-40 0,5% e água deionizada, pH 7,4) gelado contendo inibidores de protease (antipaína 2,5 μ g/ μ L e leupeptina 2,5 μ g/ μ L) e fosfatase (ortovanadato de sódio 3 mM, pirofosfato

de sódio 20 mM, fluoreto de sódio 30 mM e B-GP 5 mM) e, na sequência, o homogenato foi ultrassonicado. O homogenato foi centrifugado a 2000 x g por 5 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante resultante foi transferido a um tubo tipo *eppendorf* e mantido em gelo até a dosagem de proteínas ou armazenado em freezer a -80 °C. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada conforme o item 3.7.4.

3.7.3. Extração de proteínas citosólicas e nucleares

Este protocolo foi baseado no método utilizado em nosso laboratório (KINOSHITA et al., 2017) com adaptações. Após a raspagem das células em 1 mL de PBS gelado, estas foram transferidas a um tubo tipo eppendorf, centrifugando-o a 2000 x g por 10 min a 4 °C. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido em 100 µL de tampão de sacarose (Sacarose 320 mM, Tris-HCI 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM), contendo inibidores de fosfatase (fluoreto de sódio 30 mM, ortovanadato 1 mM e água deionizada) e centrifugado a 1000 x g por 10 min a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão de lise (Hepes 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM e água MilliQ, pH 7,4) gelado contendo inibidores de protease (antipaína 2,5 µg/µL e leupeptina 2,5 µg/µL) e fosfatase (ortovanadato de sódio 3 mM, pirofosfato de sódio 20 mM, fluoreto de sódio 30 mM e B-GP 5 mM) e, na sequência, o homogenato foi centrifugado a 13.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet foi novamente ressuspendido em tampão de lise. As amostras foram incubadas em gelo por 15 min. Em seguida, 3,1 µL de NP-40 0,5% foram adicionados a cada 50 µL de homogenato e as amostras foram vigorosamente agitadas por 10 segundos e centrifugadas a 13.000 x g por 30 s a 4 ºC. O sobrenadante resultante, o qual corresponde à fração citosólica, foi recolhido e transferido a um tubo tipo eppendorf. Após a centrifugação, o pellet resultante foi ressuspendido em 20 µL de tampão de extração (Hepes 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 300 mM, EDTA 0,25 mM, glicerol 25% e água deionizada) gelado contendo inibidores de protease e fosfatase. As amostras foram incubadas em gelo por 20 min sob agitação leve. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante, correspondente à fração nuclear, foi transferido a um tubo tipo eppendorf e mantido em gelo até a dosagem de proteínas ou

armazenado em freezer a -80 °C. A dosagem da concentração de proteínas das amostras foi realizada conforme o item a seguir.

3.7.4. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras foram diluídas na proporção de 1:50 (amostra:água). Foram adicionados às amostras diluídas, 200 µL de *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad), às quais foram incubadas por 10 min. Em seguida, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 595 nm em espectofotômetro (Epoch BioTek). A correlação com a curva-padrão de albumina indicou a quantidade de proteínas contida nas amostras.

3.7.5. Western Blotting

O protocolo de Western Blotting é baseado no método descrito por Laemmli (1970). Ajustou-se a concentração de proteínas totais e citosólicas para 1 µg/µL e nucleares para 0,5 µg/µL com o tampão de amostra (Tris-HCI 0,125 M, SDS 4%, glicerol 20% v/v, DTT 0,2 M, azul de bromofenol 0,02%, pH 6,8). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 97 °C por 5 min sob agitação de 1000 rpm. A amostra foi aplicada ao gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (5:1), SDS 10%) para a separação de proteínas. Foram carregados 10 µL de proteínas totais e 5 µL de proteínas citosólicas e nucleares no gel. Para a corrida eletroforética, o gel foi embebido em tampão de corrida (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), a qual foi realizada a 100 V por 2h. Após a corrida, as proteínas existentes no gel foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose a em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e água bidestilada) a 400 mA por 2h. Na sequência, as membranas foram incubadas por 2h a TA em solução de BSA 5% diluída em TTBS (Tris-base 100 mM, NaCl 0,9%, Tween-20 0,05%) sob agitação lateral para bloquear ligações inespecíficas. Após a etapa de bloqueio, as membranas foram embebidas em solução de BSA 1% em TTBS adicionado do anticorpo primário (anti-AKT total e fosforilada 1:750), anti-S6 total e fosforilada (1:500) e anti-PTEN (1:500)) e incubadas overnight a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3x com TTBS por 5 min sob agitação constante e, em seguida, incubadas em solução de BSA 1% em TTBS contendo o anticorpo secundário correspondente (anti-coelho, anti-camundongo e anti-cabra (1:1000)) por 2h a TA sob agitação leve e constante. A seguir, as membranas foram lavadas 3x com TTBS por 5 min sob agitação. Como controle interno, utilizou-se a β-actina (1:5.000). Para a revelação das membranas, utilizou-se o *kit* de quimioluminescência *Immobilon Western* (Millipore).

3.7.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O kit de imunoensaio para o TNF- α e para a IL-10 foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems). Após o tratamento com LPS realizado conforme descrito no item 3.3.1., o sobrenadante das células foi recolhido para aferir a liberação da citocina. A placa de 96 poços foi previamente incubada com o anticorpo de captura contra TNF-α ou IL-10 overnight a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados em PBS contendo 0,05% de Tween. Em seguida, a placa foi incubada com 100 µL de solução de bloqueio (BSA 1% em PBS) por 1h a TA. Após a etapa de bloqueio, repetiu-se a etapa de lavagem e 100 µL das amostras foram adicionadas aos micropoços e a placa foi incubada por 2h a TA. A seguir, repetiu-se a etapa de lavagem e foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção aos poços e a placa foi incubada por mais 2h a TA. Novamente, os poços foram lavados e a estreptavidina-HRP foi adicionada à placa e mantida durante 30 min a TA, protegendo-a da luz. Repetiu-se a etapa de lavagem e, posteriormente, a placa foi incubada com Substrate Solution durante 20 min, protegendo-a da luz. A reação foi interrompida com a Stop Solution. A absorbância foi aferida em comprimento de onda de 450 nm em espectofotômetro (Epoch BioTek).

3.7.7. Ensaio Imunológico de Multiplex

O imunoensaio de Multiplex foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Merk Millipore) para as seguintes citocinas: IL-1β e IL-6. Após o tratamento com LPS descrito no item 3.3.1., o sobrenadante das células tratadas foi recolhido para prosseguir com o ensaio. Foram adicionados 200 µL/poço do tampão de ensaio e, em seguida, a placa foi selada e agitada por 10 min a TA. Posteriormente, o tampão foi removido e foram adicionados 25 µL/poço da curva-padrão e dos controles positivos e, em seguida, 25 µL do tampão de ensaio aos poços. As amostras diluídas na proporção de 1:1 em DMEM isento de SFB foram adicionadas aos poços. Em seguida, 25 µL/poço da solução contendo *beads* magnéticas foram incorporados à microplaca. A placa foi selada e incubada sob

agitação e protegendo-a da luz por 2h a TA. Posteriormente, o conteúdo da placa foi removido e os poços foram lavados. O anticorpo de detecção foi adicionado aos poços no volume de 25 µL/poço e a placa foi selada e incubada sob agitação por 1h. Na sequência, a solução de estreptavidina-ficoeritrina foi adicionada e a placa foi novamente selada e incubada sob agitação por 30 min a TA. Repetiu-se a etapa de lavagem. As *beads* foram ressuspendidas em 125 µL de *Sheath Fluid* sob agitação da placa por 5 min. A Intensidade Média de Fluorescência (IMF) foi aferida em equipamento Luminex® 200TM, utilizando-se o software xPONENT.

3.7.8. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

O RNA total das células foi isolado e purificado com o *E.Z.N.A. Total RNA Kit I*, de acordo com as recomendações do fabricante (Ômega). O RNA foi quantificado e 1 μg foi tratado com DNAse I e submetido à transcrição reversa utilizando o oligo dT, o *random primer* e a transcriptase reversa com o *ImProm-II Reverse Transcription System* de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). A expressão dos genes de interesse (Quadro 3) foi mensurada pela técnica quantitativa de RT-PCR, utilizando o ensaio de expressão gênica da sonda TaqMan. Como controle, foi utilizada a sonda TaqMan para o gene *hprt1 (hypoxanthine phosphorybosil transferase 1*). A reação de qRT-PCR foi realizada em termociclador. Cada reação em duplicata continha 4 μL de cDNA, 6,25 μL do *TaqMan Fast Advanced Master Mix*, 0,625 μL da sonda TaqMan e 1,62 μL de água livre de nuclease, com um volume final de 12,5 μL/poço. O primeiro passo da reação foi a amplificação a 95 °C por 20 s, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 3 s (denaturação) e 60 °C por 30 s.

3.8. Análise dos resultados

a. *Imunofluorescência.* Para avaliar a eficiência da transfecção de células U87MG com os plasmídeos para localização subcelular da PTEN, as imagens obtidas foram analisadas por contagem de células PTEN⁺. Para avaliar da translocação de p65, as imagens foram analisadas por IMF aferida no núcleo das células. Todas as imagens foram analisadas pelo *software ImageJ* (*National Institute of Health*, EUA).

b. *Western Blotting*. Os dados foram analisados por medição da densidade óptica das bandas de proteínas presentes na membrana, utilizando-se o *software ImageJ* (*National Institute of Health*, EUA).

c. *Ensaios de MTT, LDH* e *ELISA*. Os valores de absorbância foram obtidos pelo software *Gen5 Microplate Reader and Imager Software*. Para obter a quantidade de proteínas contida nas amostras, os valores foram correlacionados aos da curva-padrão.

d. Multiplex. A IMF foi obtida pelo software xPONENT.

e. q*RT-PCR*. A quantificação da diferença na amplificação das amostras normalizadas pelo calibrador de referência (*hprt1* - controle endógeno) foi realizada pelo método comparativo do delta-delta-Ct.

d. Análise estatística. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software GraphPad Prism 6 e o teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo que as diferenças foram consideradas significativas para o valor de p<0,05. Os gráficos apresentam-se como a média dos valores obtidos ± o erro padrão da média (±E.P.M.).

PRIMER	FONTE	CATÁLOGO
Arginase-1 (Rn00691090_m1, comprimento do amplicon 76 pb) Applied Biosystems	#4331182, NM_017134.3
Glutationa redutase (Rn01482159_m1, comprimento do amplicon 64 pb)	Applied Biosystems	#4351372, NM_053906.2
<i>II-1β</i> (Rn00580432_m1, comprimento do amplicon 74 pb	Applied Biosystems	#4331182, NM_031512.2
CD206 (Rn01487342_m1, comprimento do amplicon 62 pb	Applied Biosystems	# 4331182, NM_ 001106123.2
Hprt (Rn01527840_m1, comprimento do amplicon 64 pb) Applied Biosystems	#4331182, NM_012583.2
Sod-1 (Rn00566938_m1, comprimento do amplicon 62 pb) Applied Biosystems	#4331182, NM_017050.1
Sod-2 (Rn00690588_g1, comprimento do amplicon 64 pb) Applied Biosystems	#4331182, NM_017051.2
<i>Tnf-α</i> (Rn01525859_g1, comprimento do amplicon 92 pb	Applied Biosystems)	#4331182, NM_012675.3

Quadro 3 - Lista de reagentes: oligonucleotídeos iniciadores para qRT-PCR.

4. RESULTADOS

4.1. Células gliais primárias (CGP)

4.1.1. Caracterização da cultura de CGP

Para caracterizar a cultura glial, foi realizado o ensaio de imunofluorescência com marcação para astrócitos (GFAP), microglia (IBA-1) e neurônios (PAN-Neuronal). Conforme esperado, é observável a imunorreatividade para GFAP e IBA-1, mas não para PAN-Neuronal (Figura 7), caracterizando a cultura glial pela presença de astrócitos e microglia, e ausência de neurônios. Ademais, para os controles negativos, a imunofluorescência foi realizada na ausência do anticorpo primário, a fim de verificar a especificidade dos anticorpos secundários. Observou-se ausência de inespecificidade dos anticorpos secundários (dados não mostrados).





Células gliais corticais foram mantidas em cultura por 10-13 dias. Após este período, as células foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células/mL. Quarenta e oito horas após o plaqueamento, foi feita a fixação das células com PFA 4%, seguida de marcação para os anticorpos anti-GFAP, anti-IBA-1, anti-PAN-Neuronal e o marcador nuclear DAPI. (**A**

e **D**) Astrócitos (fluorescência verde, GFAP+); (**B** e **G**) Microglia (fluorescência vermelha, IBA-1⁺); (**E** e **H**) Ausência de neurônios (ausência de imunoreatividade ao PAN-Neuronal); e (**C**, **F** e **I**) Imagens sobrepostas de GFAP+, IBA-1+, PAN-Neuronal e DAPI (fluorescência azul e roxa), nas quais observa-se uma população de células gliais caracterizada pela presença de astrócitos e microglia. As fotomicrografias são representativas de quatro culturas independentes e foram adquiridas em aumento de 20x. Escala 50 μM.

4.1.2. Tratamento com LPS é tóxico às CGP de forma concentração- e tempodependente

O ensaio do MTT consiste em um teste colorimétrico que afere a viabilidade de células metabolicamente ativas. Este ensaio reflete o estado de atividade mitocondrial ao detectar células capazes de reduzir o tetrazólio amarelo em formazan - um cristal violeta - pela ação de desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Semelhantemente, a dosagem de LDH é também um teste colorimétrico, contudo, este, por sua vez, mensura a LDH liberada no meio de cultivo pela lise de células, aferindo a viabilidade celular por citotoxicidade (YSHII, 2011). Para verificar se o estímulo com LPS interfere com a viabilidade de CGP, foi realizado o teste do MTT e a dosagem de LDH após o desafio das células com concentrações crescentes (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL) de LPS por 4h e 24h. Na concentração de 100 µg/mL de LPS durante 24h é possível observar aumento da dosagem de LDH (Figura 9), mas não redução da viabilidade celular pelo MTT (Figura 8), indicando que a administração de 100 µg/mL de LPS por 24h é tóxica às CGP. Com base nestes resultados, a concentração de 1 µg/mL e os tempos de 4h e 24h foram selecionados para os ensaios posteriores.



Figura 8 - Efeito do estímulo com LPS sobre a viabilidade de CGP.

A viabilidade das células foi aferida pela redução do MTT após (A) 4h e (B) 24h de estímulo com LPS (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ g/mL). Os dados normalizados pelo controle (NaCl 0,9%) são representativos de três experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças estatisticamente significativas.



Figura 9 - Efeito do estímulo com LPS sobre a citotoxicidade da cultura glial.

A citotoxicidade foi aferida pela liberação de LDH no sobrenadante das células após **(A)** 4h e **(B)** 24h de estímulo com LPS (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ g/mL). Os dados normalizados pelo controle com máximo de dosagem de LDH (Máx. LDH) são representativos de três experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de /uma via com pós-teste de Tukey. *p<0,05 e **p<0,01.

4.1.3. Tratamento com BpV(pic) não interfere com a viabilidade de CGP

Para inibir a atividade da PTEN, optou-se pelo composto BpV(pic), um

conhecido e potente inibidor da atividade da PTEN (LAI; DALTON; KNOELL, 2007). Inicialmente, verificou-se se o tratamento com BpV(pic) é capaz de interferir com a viabilidade celular. Para tanto, CGP foram tratadas com concentrações crescentes (0,01; 0,1; 1 e 10 μM) de BpV(pic) por 0,5h e 24h. Tanto no ensaio de MTT (Figura 10) como na dosagem de LDH (Figura 11) não foi observada interferência do BpV(pic) na viabilidade das células ou citotoxicidade, respectivamente, em nenhuma das concentrações administradas.





A viabilidade das células foi aferida pela redução do MTT após (A) 0,5h e (B) 24h de tratamento com BpV(pic) (0,01, 0,1, 1 e 10 μ M). Os dados normalizados pelo controle (NaCl 0,9%) são representativos de cinco experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças estatisticamente significativas.



Figura 11 - Efeito do tratamento com BpV(pic) sobre a citotoxicidade da cultura glial.

A citotoxicidade foi aferida pela liberação de LDH no sobrenadante das células após (A) 0,5h e (B) 24h de tratamento com BpV(pic) (0,01, 0,1, 1 e 10 μ M). Os dados normalizados pelo controle com máximo de dosagem da LDH (Máx. LDH) são representativos de quatro experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças estatisticamente significativas.

4.1.4. Tratamento com BpV(pic) induz a ativação da AKT de forma transiente

A PTEN atua como inibidora das vias posteriores à AKT, cuja ativação pode ser um indicativo indireto da inibição da PTEN, além de levar à ativação de fatores subjacentes da via, como a proteína S6, a qual participa dos efeitos gerados pela AKT (BAYASCAS; ALESSI, 2005; HART; VOGT, 2011). É sabido que o BpV(pic) inibe a PTEN com eficiência e especificidade, e que esta inibição resulta em fosforilação da AKT (LAI; DALTON; KNOELL, 2007). Assim, para verificar a efetividade da inibição de atividade da PTEN pelo tratamento com BpV(pic), foram avaliados os níveis de expressão da AKT total e fosforilada nos sítios S473 e T308, e S6 total e fosforilada no resíduo S235/236.

Após o tratamento de CGP com concentrações crescentes do composto (0,01; 0,1; 1 e 10 μ M) durante 0,5h e 24h, verificou-se acentuada ativação da AKT (Figura 12), cujos níveis de fosforilação encontram-se significativamente aumentados nos resíduos S473 (Figura 12A, 12B) e T308 (Figura 12C, 12D) após tratamento com 10 μ M de BpV(pic) e da AKT total com 1 e 10 μ M de BpV(pic) durante 0,5h. Por outro lado, após 24h de administração do BpV(pic), o aumento de

fosforilação da AKT é observado somente no sítio S473 na concentração de 10 μM (Figura 13), provavelmente devido ao mecanismo de retroalimentação negativo fornecido pela S6K, a qual reduz a atividade da PI3K, atenuando a fosforilação da AKT no resíduo T308 (BAYASCAS; ALESSI, 2005; HART; VOGT, 2011).

Figura 12 - Curva dose-resposta do tratamento com BpV(pic) por 0,5h sobre a ativação da AKT total e fosforilação nos resíduos S473 e T308.



Análise (D.O. relativa) de **(A)** p-AKT S473/ β -actina, **(B)** p-AKT S473/AKT total, **(C)** p-AKT T308/ β -actina, **(D)** p-AKT T308/AKT total e **(E)** AKT total/ β -actina com respectivas **(F)** imagens representativas das bandas. Os dados normalizados pelo controle endógeno (β -actina) são representativos de, pelo menos, três experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01 e ##p<0,0001.



Figura 13 - Curva dose-resposta do tratamento com BpV(pic) por 24h sobre a ativação da AKT total e fosforilação nos resíduos S473 e T308.

Análise (D.O. relativa) de **(A)** p-AKT S473/ β -actina, **(B)** p-AKT S473/AKT total, **(C)** p-AKT T308/ β -actina, **(D)** p-AKT T308/AKT total e **(E)** AKT total/ β -actina com respectivas **(F)** imagens representativas das bandas. Os dados normalizados pelo controle endógeno (β -actina) são representativos de, pelo menos, três experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. *p<0,05 e **p<0,01.

Ao avaliar os níveis de expressão de S6, verificou-se que o tratamento com BpV(pic) elevou significativamente os níveis de fosforilação no resíduo S235/236 desta proteína na concentração de 10 µM somente no tempo de 24h (Figura 14 e 15), mas não interferiu com os níveis de expressão de S6 total nem com a razão p-S6 /S6 total em ambos os tempos testados (0,5h e 24h).

Figura 14 - Curva dose-resposta do tratamento com BpV(pic) por 0,5h sobre os níveis de S6 total e fosforilada no resíduo S235/236.



Análise (D.O. relativa) de **(A)** p-S6/ β -actina, **(B)** p-S6/S6 total e **(C)** S6 total/ β -actina, com respectivas **(D)** imagens representativas das bandas. Os dados normalizados pelo controle endógeno (β -actina) são representativos de, pelo menos, sete experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças estatisticamente significativas.

Figura 15 - Curva dose-resposta do tratamento com BpV(pic) por 24h sobre os níveis de S6 total e fosforilada no resíduo S235/236.



Análise (D.O. relativa) de **(A)** p-S6/ β -actina, **(B)** p-S6/S6 total e **(C)** S6 total/ β -actina, com respectivas **(D)** imagens representativas das bandas. Os dados normalizados pelo controle endógeno (β -actina) são representativos de, pelo menos, sete experimentos e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. **p<0,01.

Com base nos resultados obtidos de viabilidade celular, citotoxicidade e sinalização da via AKT/S6 para o tratamento com BpV(pic), para a fase experimental, optou-se pelo seguinte esquema de tratamento: CGP são tratadas com BpV(pic) (10 μ M) por 0,5h e, posteriormente, são desafiadas com LPS (1 μ g/mL) por 4h ou 24h, obedecendo, assim, um esquema de co-tratamento BpV(pic) e LPS.

4.1.5. A inibição da PTEN altera a expressão de RNAm de genes associados à resposta inflamatória em CGP desafiadas com LPS

Para verificar se a inibição de atividade da PTEN é capaz de modificar a resposta de CGP ao LPS, os níveis de RNAm de *Arg-1* foram verificados após o tratamento com BpV(pic) seguido pela administração de 1 µg/mL de LPS por 24h (Figura 16A). A expressão da enzima foi induzida a nível de RNAm em CGP estimuladas com LPS em relação às células controle e tratadas exclusivamente com BpV(pic). Ainda, CGP em co-tratamento apresentaram níveis mais acentuados de expressão de *Arg-1* em relação às células exclusivamente desafiadas com LPS.

Ao avaliar a expressão do receptor CD206, verificou-se uma tênue redução em seus níveis nas células desafiadas exclusivamente com LPS (Figura 16B), corroborando com os resultados de (ZIMMER; RIESE; RÉGNIER-VIGOUROUX, 2003), os quais indicam que, tanto em macrófagos quanto em micróglias, este receptor tende a apresentar expressão reduzida frente a estímulos pró-inflamatórios, como o IFN- γ , e aumento de expressão frente a estímulos anti-inflamatórios, como a IL-4. Paradoxalmente, a expressão de CD206 foi negativamente regulada pelo co-tratamento BpV(pic) e LPS.

Ao avaliar o perfil de expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (Figura 16C) e TNF- α (Figura 16D) a nível de RNAm, observou-se que o LPS, de fato, aumentou os níveis de RNAm destas citocinas em relação ao controle e às células tratadas exclusivamente com BpV(pic). Interessantemente, este aumento foi revertido pelo tratamento com BpV(pic), observando-se significância nos níveis de *II-* 1β e uma tendência à redução nos níveis de *Tnf-\alpha*.

4.1.6. A inibição da PTEN altera o perfil de citocinas inflamatórias

Para verificar se a inibição da PTEN é capaz de alterar a expressão de citocinas inflamatórias a nível proteico, foram realizados os ensaios de ELISA e Multiplex em CGP tratadas com BpV(pic) e LPS por 4h e 24h, a fim de também avaliar a resposta das células mais agudamente. Ao avaliar a expressão da citocina pró-inflamatória TNF-α, observou-se que o LPS aumenta a liberação desta citocina tanto em 4h (Figura 17A) quanto em 24h de estímulo (Figura 17B), conforme esperado. Ainda, a inibição da PTEN em 24h de co-tratamento reverte este aumento de maneira estatisticamente significativa. Quanto à citocina anti-inflamatória IL-10,

houve aumento significativo no grupo de células exclusivamente desafiadas com LPS, bem como no grupo de células co-tratadas com BpV(pic) e LPS no tempo de 24h (Figura 17C, 17D). Não houve efeito significativo nos níveis de IL-10 no tempo de 4h.





Análise dos níveis de RNAm dos genes (A) Arg1, (B) Cd206, (C) *II-1* β e (D) *Tnf-a* por qRT-PCR. Os dados normalizados pelo calibrador de referência (*hprt* – controle endógeno) são representativos das duplicatas de, pelo menos, seis experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, #p<0,001 e ##p<0,0001.



Figura 17 - A inibição de atividade da PTEN altera os níveis de citocinas inflamatórias em CGP.

Detecção dos níveis das citocinas inflamatórias (A) TNF- α após 4h de tratamentos e (B) TNF- α após 24h, (C) IL-10 após 4 h e (D) IL-10 após 24h de tratamento pelo ensaio de ELISA. Pelo ensaio imunológico de Multiplex foram mensuradas as citocinas inflamatórias (E) IL-1 β após 4h de tratamento e (F) IL-1 β após 24h, (G) e (H) IL-6, após 4 e 24h, respectivamente. Dados representativos de, pelo menos, três experimentos independentes e apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. **p<0,01 e ##p<0,0001.

Ademais, pelo ensaio imunológico de Multiplex, observou-se que o LPS por si só induz aumento da liberação da citocina pró-inflamatória IL-1β tanto em 4h (Figura 17E) quanto em 24h de estímulo (Figura 17F), e que esse aumento é significativamente revertido na deficiência de atividade da PTEN em 24h, corroborando com resultados de qRT-PCR para esta citocina. Ainda, quanto à citocina pró-inflamatória IL-6, no tempo de 4h, observou-se que a inibição da PTEN por si só é capaz de elevar os níveis desta citocina (Figura 17G). Interessantemente, na presença do LPS, este aumento é ainda mais acentuado. Em contrapartida, no tempo de 24h, o aumento dos níveis de IL-6 é observado tanto no grupo exclusivamente desafiado com LPS quanto no grupo co-tratado com BpV(pic) e LPS (Figura 17H). A inibição da PTEN, contudo, não exerce influência sobre os níveis de IL-6 no tempo de 24h.

4.1.7. A inibição da PTEN altera a expressão de RNAm de genes associados à defesa antioxidante em CGP

Uma vez que a SOD e a GSR são enzimas-chave à estratégia de defesa antioxidante, avaliou-se também sua modulação frente à inibição da PTEN e à neuroinflamação. Observou-se que a inibição da PTEN por si só induz aumento dos níveis de RNAm de *Sod1* em relação ao grupo desafiado com LPS em 24h (Figura 18A). Ainda, a inibição da PTEN em células desafiadas com LPS eleva os níveis de *Sod2* (Figura 18B) e *Gsr* (Figura 13C), indicando que há participação da PTEN no controle da sinalização antioxidante em CGP. **Figura 18 -** A inibição de atividade da PTEN altera a expressão de RNAm de genes antioxidantes em CGP estimuladas com LPS.



Análise dos níveis de RNAm dos genes (A) Sod1, (B) Sod2 e (C) Gsr por qRT-PCR. Os dados normalizados pelo calibrador de referência (*hprt* – controle endógeno) são representativos das duplicatas de, pelo menos, três experimentos independentes e foram apresentados como médias \pm E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, #p<0,001 e ##p<0,0001.

4.1.8. A inibição da PTEN não interfere com os níveis de NO em CGP desafiadas com LPS

O ensaio de Griess é um teste pelo qual afere-se os níveis de nitrito liberado pelas células no meio de cultivo. Níveis de nitrito são, frequentemente, um indicativo indireto da concentração de NO. Após o co-tratamento das células com BpV(pic) e LPS por 24h, verificou-se que o grupo de células exclusivamente desafiadas com LPS, bem como o grupo que recebeu o co-tratamento BpV(pic) e LPS, de fato, apresentaram aumento significativo nos níveis de NO (Figura 19). Este aumento, contudo, não sofreu alteração pela inibição da PTEN.



Figura 19 - A inibição de atividade da PTEN não interfere na liberação de NO em CGP.

A liberação de NO_2^- foi aferida pela concentração deste composto presente no sobrenadante das células. Os dados são representativos de três experimentos e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey e. ##p<0,0001.

4.1.9. Tratamento com BpV(pic) não interfere com a compartimentalização subcelular da PTEN

Para investigar um possível mecanismo pelo qual a inibição da PTEN atenua a resposta inflamatória em células CGP, verificaram-se os níveis de expressão desta fosfatase no núcleo e no citoplasma de CGP por meio do ensaio de *Western Blotting*. Contudo, diferenças estatísticas não foram encontradas entre os grupos avaliados por este ensaio (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - Tratamento com BpV(pic) e LPS por 4h não interfere com a compartimentalização subcelular da PTEN em CGP.



Análise (D.O. relativa) de **(A)** PTEN_{citosol}/ β actina e **(B)** PTEN_{núcleo}/ β -actina com respectivas **(C)** e **(D)** imagens representativas das bandas. Os dados normalizados pelo controle endógeno (β -actina) são representativos de quatro experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças estatisticamente significativas.

Figura 21 - Tratamento com BpV(pic) e LPS por 24h não interfere com a compartimentalização subcelular da PTEN em CGP.



Análise (D.O. relativa) de **(A)** PTEN_{citosol}/ β actina e **(B)** PTEN_{núcleo}/ β -actina com respectivas **(C)** e **(D)** imagens representativas das bandas. Os dados normalizados pelo controle endógeno (β -actina) são representativos de seis experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças estatisticamente significativas.

Apesar de a hipótese sobre a relação atividade-compartimentalização da PTEN não ter sido corroborada no estudo com BpV(pic) pelo método de *Western Blotting*, ensaios adicionais são necessários para melhor avaliar a hipótese e os efeitos observados. Para tanto, foram realizadas análises em outro modelo experimental, a fim de aprofundar os conhecimentos sobre a compartimentalização da PTEN em células gliais, conforme elucidado a seguir.

4.2. Células U87MG

4.2.1. Estímulo com LPS altera a viabilidade de células U87MG de forma concentração- e tempo-dependente

Para verificar se o estímulo com LPS é capaz de alterar a viabilidade de células U87MG, o LPS foi administrado às células em concentrações crescentes (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL) e a viabilidade celular mensurada 4h e 24h após o estímulo. É possível observar que há redução da viabilidade quando são administrados 100 µg/mL LPS por 24h (Figura 22). Quanto à citotoxicidade, verificou-se aumento na dosagem de LDH na concentração de 100 µg/mL de LPS tanto em 4h quanto em 24h, bem como na concentração de 10 µg/mL em relação às concentrações de 0,01, 0,1 e 1 µg/mL de LPS no tempo de 24h (Figura 23).



Figura 22 - Efeito do estímulo com LPS sobre a viabilidade de células U87MG.

A viabilidade das células foi aferida pela redução do MTT após (A) 4h e (B) 24h de estímulo com LPS (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ g/mL). Os dados normalizados pelo controle (NaCl 0,9%) são representativos de cinco experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. **p<0,01, #p<0,001 e ##p<0,0001.



Figura 23 - Efeito do estímulo com LPS sobre a citotoxicidade na linhagem U87MG.

A citotoxicidade foi aferida pela liberação de LDH no sobrenadante das células após (A) 4h e (B) 24h de estímulo com LPS (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 μ g/mL). Os dados normalizados pelo controle com máximo de dosagem de LDH (Máx. LDH) são representativos de cinco experimentos independentes e foram apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. *p<0,05, **p<0,01 e ##p<0,0001.

4.2.2. O NF- κB é constitutivamente ativado em células U87MG

Inicialmente, para avaliar o efeito do estímulo com LPS sobre a translocação de p65 em células U87MG, o LPS foi administrado às células na concentração de 10 μg/mL por 1h, 2h e 4h. É possível observar que o LPS não induziu aumento da translocação da subunidade p65 para o núcleo em células tratadas em relação às controles em nenhum dos tempos testados (Figura 24), demonstrando que células U87MG parecem não respondem ao LPS via translocação de p65, uma vez que a via do NF-κB é constitutivamente ativada nestas células (GARKAVTSEV et al., 2004), corroborando com resultados prévios disponíveis na literatura.



Figura 25 – Efeito na translocação de p65 da subunidade do NF-KB em resposta ao estímulo com LPS em células U87MG.

Imunorreatividade ao anticorpo anti-p65 (fluorescência verde) e ao marcador nuclear DAPI (fluorescência vermelha) em células U87MG estimuladas com LPS (10 μ g/mL) por **(A)** 1h, **(B)** 2h e **(C)** 4h com as respectivas (**D**, **E** e **F**) quantificações da intensidade de fluorescência média de p65 nuclear. Fotomicrografias em aumento de 20x. As imagens são representativas das duplicatas de um experimento, tendo sido analisados, pelo menos, dez campos por poço. Escala: 50 μ m. Dados apresentados como médias ± E.P.M. Teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Os resultados sugerem ausência de diferenças significativas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Eficiência do BpV(pic): sinalização da AKT

Neste estudo, objetivou-se avaliar os efeitos da ausência de PTEN frente à neuroinflamação. Para inibir a atividade da PTEN, optou-se pelo composto BpV(pic). Estudos prévios comprovaram que o BpV(pic) inibe a PTEN com eficiência e especificidade, e que esta inibição resulta em fosforilação da AKT e mínima citotoxicidade (LAI; DALTON; KNOELL, 2007). Estes dados foram corroborados pelo presente estudo, pelo qual observou-se aumento de fosforilação da AKT tanto no resíduo S473 quanto no T308 desta quinase (Figura 12-13), e ausência de citotoxicidade (Figura 11) ou interferência na viabilidade celular (Figura 10) após 24h de tratamento com BpV(pic).

De acordo com Hart e Vogt (2011), a total ativação da AKT requer a fosforilação tanto do resíduo T308 quanto do S473. A ativação de TORC2 é uma etapa precedente à ativação máxima desta quinase, uma vez que fosforila o resíduo S473 da AKT e, consequentemente, propicia o acoplamento PDK-AKT, o qual procede com a fosforilação da AKT no sítio T308. É importante lembrar que as etapas supracitadas não são exclusivas e podem depender do contexto ao qual estão inseridas. Ademais, a ativação de TORC1 e alvos posteriores como S6K, por exemplo, participam de um mecanismo de retroalimentação negativo que modula a fosforilação do sítio T308 ao amenizar a ativação da PI3K, regulando, assim, a ativação da AKT (HART; VOGT, 2011)

No presente estudo, a eficiência da inibição de atividade da PTEN foi evidenciada pelo aumento transiente de fosforilação da AKT. Percebe-se que há fosforilação elevada tanto no resíduo S473 quanto no T308 em 0,5h de tratamento com BpV(pic) na concentração de 10 µM (Figura 12). Em 24h de tratamento, em contrapartida, observa-se aumento de fosforilação somente no resíduo S473 e na concentração maior de 10 µM (Figura 13). Ao avaliar o alvo posterior S6, observou-se que há aumento de sua fosforilação (S235/236) somente em 24h (Figura 14 e 15). Contudo, não houve alteração significativa na razão p-S6/S6 total, indicando que a inibição da PTEN pelo BpV(pic) não atingiu alvos posteriores à AKT neste modelo, como o S6, por exemplo. Portanto, com base nos resultados obtidos, o tratamento com BpV(pic) na concentração de 10 µM mostrou-se eficaz e segura para os ensaios posteriores com foco na inibição da PTEN.

5.2. Perfil inflamatório e oxidativo

É sabido que o LPS interfere com a viabilidade celular em determinadas concentrações (KINOSHITA et al., 2017). Em resposta ao estímulo com LPS, verificou-se que o LPS (100 μ g/mL) é citotóxico em CGP estimuladas por 24h, bem como observou-se que há uma tênue redução de resposta ao MTT, um indicativo de reduzida viabilidade celular (Figura 8-9). Portanto, optou-se pela concentração de 1 μ g/mL para os ensaios.

A arginase é um importante elemento ao ciclo da ureia, no qual atua na conversão de L-arginina em ureia e L-ornitina (DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007). Ao competir com a NOSi pelo substrato L-arginina (mas não se limitando a este mecanismo de ação), a arginase participa de um equilíbrio entre o consumo de L-arginina para a síntese de NO (um importante mediador da inflamação tóxica) ou para a produção de poliaminas e colágeno (importantes na regeneração tecidual) pelas enzimas NOSi e arginase, respectivamente, determinam se a inflamação induzirá toxicidade ou depuração de resíduos e regeneração (revisado em CALDWELL et al., 2015; revisado em DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007). É sabido que no SNC, a arginase desempenha um efeito positivo sobre a neuroproteção e regeneração neural, além de ser um importante marcador do fenótipo microglial do tipo M2 (revisado em CALDWELL et al., 2015), enquanto a NOSi, por meio da produção de NO, contribui à inflamação tóxica e crônica, culminando em neurodegeneração (revisado em CARNIGLIA et al., 2017). Interessantemente, nesta investigação, não se observou efeito da inibição da PTEN sobre os níveis de NO (Figura 19), mas verificou-se que a expressão de RNAm de Arg-1 é induzida quando a atividade da PTEN está deficiente em CGP desafiadas com LPS (Figura 16). Resultados prévios revelam aumento na expressão de Arg-1 em macrófagos com deleção condicionada da PTEN na vigência ou não do tratamento com LPS (SAHIN et al., 2014). Uma possível justificativa para que o aumento de expressão da Arg-1 tenha sido corroborado na vigência do LPS, mas não na ausência do estímulo, em células CGP tratadas exclusivamente com BpV(pic) é que em virtude de a inibição da PTEN ser transiente neste modelo, esta inibição não seja suficiente para a célula orquestrar mecanismos adaptativocompensatórios que propiciem o aumento de expressão da enzima, diferentemente do efeito observado em macrófagos com a deleção condicionada da PTEN, os quais

naturalmente apresentam um perfil imunossuprimido com expressão acentuada de *Arg-*1 (SAHIN et al., 2014).

O CD206, por sua vez, é um PRRs presente em células como macrófagos, astrócitos e microglias, nas quais atua como um importante regulador da resposta imune, além de ser um conhecido marcador do fenótipo de ativação macrofágica do tipo M2 (revisado em CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; ZIMMER; RIESE; RÉGNIER-VIGOUROUX, 2003). Paradoxalmente ao observado pelo perfil de expressão da *Arg-1*, verificou-se que a deficiência de PTEN na presença do estímulo com LPS em CGP atenua significativamente a expressão do receptor CD206 (Figura 16). Este resultado pode ser validado por descobertas que indicam que macrófagos deficientes em PTEN apresentam expressão reduzida de marcadores de polarização macrofágica do tipo M2, como YM1 e FIZZ, bem como aumento da expressão de NOSi e *Arg-1* (SAHIN et al., 2014). Por outro lado, Ma et al. (2017) mostraram em células de Kupffer que a regulação negativa do receptor CD206 se deve não à deficiência, mas ao aumento de expressão da PTEN. Assim, os resultados aparentemente controversos justificam-se pelo conjunto de evidências crescentes que apontam para um papel dual e tecido-específico da PTEN frente à inflamação.

A produção e liberação de citocinas inflamatórias é resultado da resposta glial à inflamação e pode interferir com as funções da PTEN (revisado em CHEN; GUO, 2017). A avaliação do perfil de citocinas revelou acentuados níveis de RNAm de IL-1β e TNF-α em resposta ao LPS (Figura 16) - um potente estímulo à secreção e produção de citocinas inflamatórias. Interessantemente, a resposta induzida pelo LPS foi significativamente revertida na vigência do BpV(pic), tanto para a expressão de RNAm quanto para a expressão proteica da citocina IL-1β (Figura 16-17). Também, verificou-se que a inibição transiente da PTEN induz a citocina IL-6 (Figura 17). Quanto ao Tnf- α , a nível de RNAm, observa-se uma tendência do tratamento com BpV(pic) em reverter parcialmente a resposta induzida pelo LPS (Figura 17). Por outro lado, a secreção de TNF-α na vigência do co-tratamento BpV(pic)-LPS em 24h, mas não em 4h, de fato, mostra uma redução na resposta de CGP ao lipopolissacarídeo para esta citocina (Figura 17). Estes resultados corroboram com evidências que indicam que citocinas inflamatórias, como TGF- β e TNF- α , podem modular os níveis de PTEN (AOYAMA et al., 2013; DA COSTA et al., 2016). Em estudos prévios, a deleção miócito-específica da PTEN elevou os níveis basais da citocina IL-10 e reduziu de TNF-a, bem como, a mutação heterozigota desta fosfatase também interferiu com a secreção destas citocinas após a indução de infarto do miocárdio, reduzindo os níveis de TNF-α e induzindo IL-10 (PARAJULI et al., 2012). Interessantemente, a deficiência de PTEN em macrófagos de camundongos infectados com Streptococcus pneumoniae induziu a secreção da citocina IL-10 e reduziu os níveis TNF- α , e nitrito (SCHABBAUER et al., 2010). Ademais, o silenciamento da PTEN in vivo e a co-deleção Pten/p53 induzem a citocina IL-6 (NOWAK et al., 2015; SISTI et al., 2018). Pelo presente estudo, foi demonstrado que a inibição de atividade da PTEN pelo BpV(pic) induz os níveis da citocina IL-6 agudamente e o co-tratamento BpV(pic)-LPS reverte os níveis da citocina TNF-α induzidos pelo lipopolissacarídeo, mas não interfere com os níveis de IL-10 e nem de nitrito. Em conjunto com os dados da literatura, o presente estudo sugere que há participação da atividade da PTEN na sinalização de citocinas inflamatórias, neste caso TNF- α e IL-1 β . É provável que não tenham sido observadas diferenças nos níveis de IL-10 e nitrito devido: a) à inibição transiente de atividade da PTEN neste modelo, diferentemente dos modelos em que há mutação ou silenciamento do gene; b) aos tempos avaliados (4h e 24h), que podem não ter atendido aos picos de liberação destes fatores; c) às diferenças de resposta entre os modelos in vivo e in vitro; ou d) efeitos tecido-específicos da PTEN.

Em resposta a estímulos inflamatórios, as células podem responder por vias de estresse oxidativo, o qual consiste em uma instabilidade entre a produção de ROS e radicais livres, podendo ativar diversos fatores como NF-κB, proteína ativadora (AP)-1 e fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF-2), que podem induzir a ativação de genes associados à síntese de citocinas e moléculas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, por exemplo (revisado em REUTER et al., 2010). Ao induzir a transcrição de fatores associados à via inflamatória, o estresse oxidativo pode conduzir ao dano celular e ao desenvolvimento de doenças crônicas (HUSSAIN et al., 2016). Enzimas antioxidantes como as SODs, a GSR, glutationa peroxidase (GPx) e catalases protegem o organismo contra os efeitos nocivos desencadeados pelo estresse oxidativo (revisado em REUTER et al., 2010). Resultados aqui apresentados sugerem que a inibição de atividade da PTEN por si só tende a aumentar a transcrição de *Sod1* em relação à redução induzida em resposta ao LPS, esta

redução, no entanto, não é revertida pela inibição da PTEN (Figura 18). Quanto à *Sod2*, verificou-se que a expressão desta enzima é induzida somente no cotratamento BpV(pic) e LPS (Figura 18). Estes resultados corroboram com as descobertas de Liu et al. (2017) que revelam que o peptídeo β -amiloide (A β) em células neurais reduz a atividade de SOD, mas que este efeito é revertido pelo tratamento com BpV(pic). Por fim, os níveis de *Gsr* revelaram aumento desta glutationa na deficiência de PTEN e que este efeito persiste em células co-tratadas com LPS, indicando que a inibição da PTEN reverte a redução nos níveis de *Gsr* em resposta ao LPS (Figura 18). Estes resultados apontam para a participação da PTEN na via de sinalização antioxidante em CGP.

5.3. Compartimentalização e inibição de atividade da PTEN

Estudos apontam para um grupo de mutações da PTEN que mantém sua atividade de fosfatase. Na tentativa de investigar como essas mutações poderiam contribuir para a patogênese tumoral, Nguyen et al. (2014) descobriram que células HEK293T transfectadas com construtos enzimaticamente competentes falham em recrutar a PTEN para a membrana plasmática, onde atua como fosfatase lipídica. Com base em estudos como este, questionou-se se a inibição da atividade da PTEN exerce efeitos sobre a sua compartimentalização subcelular (núcleo/citosol) na presença ou ausência da inflamação induzida pelo LPS. Contudo, não foi observado efeito do tratamento com BpV(pic) ou do estímulo com LPS sobre a localização subcelular da PTEN pelo ensaio de *Western Blotting* (Figuras 20-21). Assim, ensaios adicionais são necessários para melhor avaliar a hipótese e os efeitos observados.



Figura 26 – Esquematização dos efeitos da inibição da PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais.

(A) Células gliais tratadas com BpV(pic) apresentam aumento da fosforilação da AKT nos resíduos S473 e T308, culminando na ativação desta quinase, que constitui um indicativo indireto da efetividade da inibição da PTEN pelo BpV(pic). (B) A inibição da PTEN, na vigência do LPS leva a um aumento na expressão das enzimas ARG-1, SOD2 e GSR, e da citocina inflamatória IL-6, bem como redução dos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α , e do receptor CD206. Também, há aumento de expressão das enzimas antioxidantes SOD2 e GSR. Por fim, a inibição da PTEN por si só eleva os níveis da citocina IL-6.

5.4. Perfil inflamatório de células U87MG

A ativação dos TLRs, incluindo o TLR4, do qual o LPS é um agonista clássico, estimulam a via do NF- κ B que, posteriormente promove a liberação de diversas citocinas inflamatórias (revisado em KAWASAKI; KAWAI, 2014). Estudos prévios, de fato, correlacionam a liberação de citocinas IL-8 e da proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 como resposta ao estímulo com LPS em células U87MG (BRAGANHOL et al., 2015). No presente estudo, a resposta da linhagem U87MG ao tratamento com LPS foi observada pela redução da viabilidade (Figura 22) das células e pelo aumento da citotoxicidade (Figura 23), mas não pela avaliação de vias pró-inflamatórias que envolvem a sinalização via TLR4 e ativação do NF- κ B, como a liberação de TNF- α (dados não mostrados), a qual apresentou-se ausente 4h e 24h após o estímulo com LPS, e a translocação de p65 para o núcleo na presença do LPS (Figura 25). Estes dados corroboram com a literatura quanto à

resistência de células U87MG à citotoxicidade induzida pelo TNF- α (SHARMA, TEWARI, HOSSAIN, 2008) e à ativação constitutiva da via do NF- κ B (GARKAVTSEV et al., 2004).

A ausência de ativação das vias inflamatórias avaliadas em resposta ao estímulo com LPS nos fez questionar se, de fato, as células U87MG responderam ao tratamento com LPS por vias inflamatórias, ou se a citotoxicidade evidenciada pelos ensaios de LDH (Figura 23) é meramente derivada da ativação de vias de morte celular em concentrações altas de LPS (100 µg/mL). Ademais, os resultados aqui apresentados vão de encontro aos de Hwang et al. (2009) que mostraram que células derivadas de glioma, nomeadamente as linhagens C6, U373MG e U87MG, quando diretamente tratadas com LPS não apresentam redução da viabilidade na concentração de 0,1 µg/mL. Ademais, no mesmo estudo, células da linhagem microglial BV2 foram previamente tratadas com LPS (0,1 µg/mL) ou IFN-y (20 U/mL) por 24h. Em seguida, o meio de cultura condicionado (MCC) obtido do tratamento dessas células foi adicionado às células C6, U373MG e U87MG e mantido por 72h. Posteriormente, a análise de viabilidade evidenciou uma redução expressiva da viabilidade celular tanto após adição do MCC preparado com LPS quanto com IFN-y, tendo sido observada também a condensação de cromatina no núcleo celular, um indicativo de morte celular (HWANG et al., 2009). Outras evidências indicam que o estímulo com LPS induz apoptose na linhagem U373MG diferenciada em células tipo macrófago via ativação de caspase-3 e que o pré-tratamento com o anticorpo anti-TLR4, parcialmente, inibiu a ativação de caspase-3 e apoptose (SUZUKI et al., 2004), demonstrando a participação da sinalização do TLR4 na apoptose. Esses dados corroboram com os resultados de viabilidade celular e citotoxicidade obtidos pelos ensaios do MTT e LDH, e indicam que a citotoxicidade do LPS (100 µg/mL em 24h), de fato, pode ser devida à ativação de vias de morte celular.
6. CONCLUSÃO

Nesta investigação, evidenciou-se que a inibição da PTEN reduz a resposta de células gliais primárias ao LPS para as citocinas IL-1β e TNF-α, bem como induz a expressão da enzima Arginase-1, das enzimas Sod2 e glutationa redutase. Interessantemente, a inibição da PTEN induz a secreção da citocina IL-6.

O conjunto de descobertas deste estudo elucida o potencial papel modulatório da PTEN sobre a neuroinflamação e a defesa antioxidante em células gliais e, em conjunto com trabalhos da literatura, reforçam a ideia de que a PTEN exerce um papel dual e tecido-específico frente à inflamação. A inibição farmacológica da PTEN – BpV(pic) – mostrou-se um interessante alvo à reversão das respostas induzidas pelo LPS em células gliais.

Interessantemente, células U87MG parecem não responder ao LPS via translocação de p65 e secreção de TNF-α, mas respondem com redução da viabilidade celular e citotoxicidade em altas concentrações de LPS, indicando que as células, aparentemente, respondem por vias de morte celular. A transfecção das células com plasmídeos para localização subcelular da PTEN revelou que a linhagem U87MG não constitui um modelo facilmente transfectável com os plasmídeos e protocolos utilizados.

Por fim, pelo modelo aqui explorado, pode-se inferir que a PTEN tem um papel modulatório sobre o processo inflamatório no SNC e que, possivelmente, essa modulação se deva aos diferentes efeitos promovidos por sua compartimentalização subcelular. Assim, a continuidade dos estudos sobre a compartimentalização da PTEN pela avaliação por outros métodos, de outras vias de sinalização e outros esquemas de inibição da PTEN, bem como a utilização de um modelo de células PTEN^{null} mais satisfatório pode ser de grande validade para melhor interpretar os resultados obtidos até o momento e revelar possíveis efeitos da localização subcelular da PTEN frente à neuroinflamação.

REFERÊNCIAS*

AOYAMA, D. et al. Involvement of TGF β -Induced Phosphorylation of the PTEN C-Terminus on TGF β -Induced Acquisition of Malignant Phenotypes in Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81133, 22 nov. 2013.

BASSI, C. et al. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. **Science**, 2013.

BASSI, C.; STAMBOLIC, V. PTEN, here, there, everywhere. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 12, p. 1595–1596, 11 dez. 2013.

BAYASCAS, J. R.; ALESSI, D. R. Regulation of Akt/PKB Ser473 Phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 18, n. 2, p. 143–145, abr. 2005.

BONONI, A. et al. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca2+ signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 12, p. 1631–1643, 28 dez. 2013.

BONONI, A.; PINTON, P. Study of PTEN subcellular localization. **Methods**, v. 77, p. 92–103, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976b.

BRAGANHOL, E. et al. Nucleotide receptors control IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 secretions as well as proliferation in human glioma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 1, p. 120–130, jan. 2015.

COSTA, João Victor Cabral. Efeitos modulatórios da PTEN sobre a cognição e a plasticidade sináptica em camundongos submetidos a intervenções nãofarmacológicas: a dieta intermitente e o exercício físico. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/D.42.2017.tde-24112017-142910. Acesso em: 2018-08-30.

CALDWELL, R. B. et al. Arginase: an old enzyme with new tricks. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 395–405, jun. 2015.

CARNIGLIA, L. et al. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–23, 2017.

CARSON, M. J. et al. CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 48–65, out. 2006.

CHEN, L.; GUO, D. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 7, p. 581–589, 26 jul. 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

^{*} De acordo com:

CHEN, Z. et al. Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Neuroprotection against Experimental Brain Injury Is Independent of Hematogenous TLR4. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 34, p. 11706–11715, 22 ago. 2012.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 98, 2014.

CHHOR, V. et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 32, p. 70–85, ago. 2013.

CLARK, M. J. et al. U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 1, p. e1000832, 29 jan. 2010.

DA COSTA, R. M. et al. TNF-α induces vascular insulin resistance via positive modulation of PTEN and decreased Akt/eNOS/NO signaling in high fat diet-fed mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, p. 119, 25 dez. 2016.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. ARGINASE: A CRITICAL REGULATOR OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND VASCULAR FUNCTION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 9, p. 906–911, set. 2007.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 3, p. 138–145, mar. 2007.

GARKAVTSEV, I. et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. **Nature**, v. 428, n. 6980, p. 328–332, 18 mar. 2004.

GILMORE, T. D. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680–6684, 30 out. 2006.

GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 26–30, mar. 2000.

GLYNN, M. W.; MCALLISTER, A. K. Immunocytochemistry and quantification of protein colocalization in cultured neurons. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1287–1296, 2006.

GU, T. et al. CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. **Cancer Research**, 2011.

HART, J. R.; VOGT, P. K. Phosphorylation of AKT: a Mutational Analysis. **Oncotarget**, v. 2, n. 6, 4 jun. 2011.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463–477, 1 jul. 2014.

HOPKINS, B. D. et al. A Secreted PTEN Phosphatase That Enters Cells to Alter Signaling and Survival. **Science**, v. 341, n. 6144, p. 399–402, 26 jul. 2013.

HOPKINS, B. D. et al. PTEN function: the long and the short of it. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 183–190, abr. 2014.

HUANG, S.-Y. et al. Involvement of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in rodent model of neuropathic pain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 59, 26 dez. 2015.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

HWANG, S.-Y. et al. Induction of glioma apoptosis by microglia-secreted molecules: The role of nitric oxide and cathepsin B. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 11, p. 1656–1668, nov. 2009.

JÄKEL, S.; DIMOU, L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 13 fev. 2017.

JIANG, M.; CHEN, G. High Ca2+-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 695–700, jul. 2006.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Frontiers in Immunology, v. 5, 25 set. 2014.

KIELIAN, T. Neuroinflammation: good, bad, or indifferent? **Journal of Neurochemistry**, v. 130, n. 1, p. 1–3, jul. 2014.

KINOSHITA, P. F. et al. Alpha 2 Na+,K+-ATPase silencing induces loss of inflammatory response and ouabain protection in glial cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4894, 7 dez. 2017.

KNAFO, S. et al. PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 443–453, 18 mar. 2016.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 64, n. 3, p. 313–320, nov. 1983.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LAI, J. P.; DALTON, J. T.; KNOELL, D. L. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 8, p. 1172–1184, 2007.

LEHNARDT, S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. **Glia**, v. 58, n. 3, p. NA-NA, 2009.

LIANG, H. et al. PTENα, a PTEN Isoform Translated through Alternative Initiation, Regulates Mitochondrial Function and Energy Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 836–848, maio 2014.

LINDSAY, Y. et al. Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 24, p. 5160–5168, 15 dez. 2006.

LIU, X.-Y. et al. The PTEN inhibitor bpV(pic) promotes neuroprotection against

amyloid β-peptide (25-35)-induced oxidative stress and neurotoxicity. **Neurological Research**, v. 39, n. 8, p. 758–765, 3 ago. 2017.

MA, W.-T. et al. Modulation of liver regeneration via myeloid PTEN deficiency. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 5, p. e2827, 25 maio 2017.

MECHA, M. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. **Protocol Exchange**, 2011.

MICHALSKI, J.-P.; KOTHARY, R. Oligodendrocytes in a Nutshell. Frontiers in Cellular Neuroscience, v. 9, 1 set. 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

NGUYEN, H. N. et al. Mechanism of human PTEN localization revealed by heterologous expression in Dictyostelium. **Oncogene**, v. 33, n. 50, p. 5688–5696, 2 dez. 2014.

NOWAK, D. G. et al. MYC Drives Pten/Trp53-Deficient Proliferation and Metastasis due to IL6 Secretion and AKT Suppression via PHLPP2. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 6, p. 636–651, 1 jun. 2015.

PARAJULI, N. et al. Phosphatase PTEN is critically involved in post-myocardial infarction remodeling through the Akt/interleukin-10 signaling pathway. **Basic Research in Cardiology**, v. 107, n. 2, p. 248, 2 mar. 2012.

QUINTANA, M. Espelho mágico. 1. ed. Porto Alegre: Editora Globo, 1951.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, dez. 2010.

ROJO, A. I. et al. Redox Control of Microglial Function: Molecular Mechanisms and Functional Significance. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 12, p. 1766–1801, 20 out. 2014.

SAHIN, E. et al. Macrophage PTEN Regulates Expression and Secretion of Arginase I Modulating Innate and Adaptive Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1717–1727, 15 ago. 2014.

SCHABBAUER, G. et al. Myeloid PTEN Promotes Inflammation but Impairs Bactericidal Activities during Murine Pneumococcal Pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 468–476, 1 jul. 2010.

SCHMITZ, M. L.; BAEUERLE, P. A. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 12, p. 3805–3817, dez. 1991.

SHABAB, T. et al. Neuroinflammation pathways: a general review. International Journal of Neuroscience, v. 127, n. 7, p. 624–633, 3 jul. 2017.

SHARMA, V. et al. Ebselen sensitizes glioblastoma cells to Tumor Necrosis Factor (TNF α)-induced apoptosis through two distinct pathways involving NF- κ B downregulation and Fas-mediated formation of death inducing signaling complex. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 9, p. 2204–2212, 1 nov. 2008.

SISTI, F. et al. Nuclear PTEN enhances the maturation of a microRNA regulon to limit MyD88-dependent susceptibility to sepsis. **Science signaling**, v. 11, n. 528, 1 maio 2018.

SOFRONIEW, M. V. Astrogliosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, p. a020420, fev. 2015a.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 249–263, 1 maio 2015b.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathologica, v. 119, n. 1, p. 7–35, 10 jan. 2010.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 283–296, 4 maio 2012.

SUZUKI, T. et al. Mechanisms Involved in Apoptosis of Human Macrophages Induced by Lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans in the Presence of Cycloheximide. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1856–1865, 1 abr. 2004.

TORRES-PLATAS, S. G. et al. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 12, 2014.

WANG, L. et al. Pten deletion in RIP-Cre neurons protects against type 2 diabetes by activating the anti-inflammatory reflex. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 484–492, 20 maio 2014.

WATZLAWIK, J.; WARRINGTON, A. E.; RODRIGUEZ, M. Importance of oligodendrocyte protection, BBB breakdown and inflammation for remyelination. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, n. 3, p. 441–457, 9 mar. 2010.

YANG, Z. et al. Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by *Helicobacter pylori* promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, 13 out. 2015.

YSHII, Lidia Mitiko. Efeitos da alfa-sinucleína na modulação da atividade do fator de transcrição nuclear kB em células SH-SY5Y. 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Pau

ZIMMER, H.; RIESE, S.; RÉGNIER-VIGOUROUX, A. Functional characterization of mannose receptor expressed by immunocompetent mouse microglia. **Glia**, v. 42, n. 1, p. 89–100, 1 abr. 2003.



APÊNDICE A – Células U87MG controle (não transfectadas, Lipofectamina 3000).

APÊNDICE B – Células U87MG transfectadas com os plasmídeos VV, WT-*Pten*, NLS-*Pten* e NES-*Pten* com remoção da Lipofectamina após 1h.



APÊNDICE C – Células U87MG transfectadas com os plasmídeos VV, WT-*Pten*, NLS-*Pten* e NES-*Pten* com remoção da Lipofectamina após 4h.

