

MARINA SAADE

**Efeitos da proteína GPNMB na modulação de
processos inflamatórios causados pelo LPS em
células da microglia e astrócitos de ratos**

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
2021

MARINA SAADE

**Efeitos da proteína GPNMB na modulação de
processos inflamatórios causados pelo LPS em
células da microglia e astrócitos de ratos**

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
Orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone
Co-orientadora: Dra. Paula Fernanda
Kinoshita

Versão Original

São Paulo
2021

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)

Saade, Marina

Efeitos da proteína GPNMB na modulação de processos inflamatórios causados pelo LPS em células da microglia e astrócitos de ratos / Marina Saade; orientador Cristoforo Scavone; coorientadora Paula Fernanda Kinoshita. -- São Paulo, 2021.

99 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. GPNMB. 2. Neuroinflamação. 3. Glia. 4. LPS. I. Scavone, Cristoforo, orientador. II. Kinoshita, Paula Fernanda, coorientador. III. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador(a):

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, 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:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da proteína GPNMB na modulação de processos inflamatórios causados pelo LPS em células da glia de ratos", protocolada sob o CEUA nº 9550151018, sob a responsabilidade de **Cristoforo Scavone e equipe; Diana Zukas Andreotti Viana; Paula Fernanda Kinoshita; Cristoforo Scavone; Larissa de Sá Lima; Marina Saade; Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 03/12/2018.

We certify that the proposal "Effects of GPNMB protein on the modulation of inflammatory processes caused by LPS in rat glial cells", utilizing 50 Heterogenics rats (50 males), protocol number CEUA 9550151018, under the responsibility of **Cristoforo Scavone and team; Diana Zukas Andreotti Viana; Paula Fernanda Kinoshita; Cristoforo Scavone; Larissa de Sá Lima; Marina Saade; Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe** - 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 12/03/2018.

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

Vigência da Proposta: **31 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: [60 a 90 dias](#)

Linhagem: [Wistar](#)

N amostral: [50](#)

São Paulo, 18 de março de 2019



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-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

São Paulo, 29 de maio de 2019
CEUA N 9550151018

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Cristoforo Scavone
Área: Farmacologia

Título da proposta: "Efeitos da proteína GPNMB na modulação de processos inflamatórios causados pelo LPS em células da glia de ratos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000145)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 28/maio/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O rendimento da cultura de células com o uso de animais adultos tem um rendimento baixo para a execução dos protocolos utilizados no projeto. Declaramos que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na referida licença. Colocamos a seguir as informações sobre os animais solicitados para realização da proposta: Rattus norvegicus Wistar macho 0 a 4 dias 1º ano: 100".

Comentário da CEUA: "".



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)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Ana Paula Cavalheiro Gonçalves Saade e Cleber Ivan Saade, por terem me apoiado em todos os aspectos para que a realização desta etapa fosse concluída. Obrigada por sempre acreditarem em mim e pela liberdade de escolha do caminho que eu quis seguir, mesmo que isso signifique a nossa distância física.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Cristoforo Scavone e Dr^a. Paula Fernanda Kinoshita, por todo o suporte acadêmico, discussões e ideias que surgiram durante o período do meu mestrado. Cresci como cientista neste período e muito disso se deve a vocês.

Ao meu namorado, Pedro Otávio Penteado Dias Cordeiro, por ter sido o meu maior parceiro nesses últimos anos. Obrigada por sempre estar do meu lado, deixando a vida melhor em um momento tão delicado.

Aos meus amigos de bancada, Natacha Medeiros de Souza Port's, Paloma Segura de Mello, Giovanna Araujo de Souza, Amanda Midori Matumoto, Geovanni de Moraes Lima, Gabriela Spina Nagy e Maria Luiza Correia Silva, por todas as conversas e momentos descontraídos que fizeram a difícil tarefa de concluir um mestrado (ainda mais durante uma pandemia), mais leve.

Aos demais colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Larissa de Sá Lima, Diana Andreotti, Ana Maria Marques Orellana, Jessika Cristina Bridi, Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe e Vinicius Watanabe Nakao, pelo apoio técnico e científico e pela convivência.

Aos demais amigos e familiares que estão ao meu lado me apoiando. Em especial, às minhas amigas cientistas Isabella Gizzi Jiacomini e Fernanda Rezende Pabst que, além da amizade de anos, me auxiliaram também neste projeto ao compartilharem seus conhecimentos quando eu precisei de ajuda.

Aos professores e funcionários do departamento, em especial à Prof. Dr^a. Carolina Demarchi Munhoz, por ter cedido o espaço do seu laboratório para que eu

pudesse realizar a pesquisa com as células de linhagem. Também à secretária do departamento Mônica Nunes que sempre foi muito solícita com todas as dúvidas que tive desde a inscrição para o processo seletivo da pós graduação até hoje.

Por fim, gostaria de agradecer ao Nilton Barreto dos Santos (*in memoriam*), por ter me recebido tão bem no laboratório da Prof. Dr^a. Carolina Demarchi Munhoz e por ter sido minha banca de qualificação deste mestrado. Agradeço por ter tido a oportunidade de conviver e aprender com você.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo apoio financeiro, essencial para realização dessa pesquisa. Processo nº 2018/07896-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

Saade, M. Efeitos da proteína GPNMB na modulação de processos inflamatórios causados pelo LPS em células da microglia e astrócitos de ratos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

A GPNMB é uma glicoproteína endógena transmembrana que pode ser clivada pela ADAM10 e seu fragmento extracelular interage com uma proteína transmembrana chamada Na^+/K^+ -ATPase (NKA). A NKA, que é conhecida pelo seu papel essencial no controle eletrolítico e na sobrevivência celular, também possui papel sinalizador em vias que influenciam os processos inflamatórios. A inflamação aguda é um processo de defesa celular. Porém, quando a inflamação não é controlada, pode desencadear diversos processos celulares que podem ser nocivos ao organismo. A maioria dos estudos apontam que a GPNMB possui um papel anti-inflamatório, tanto em células do sistema periférico quanto em células do sistema nervoso central (SNC). No SNC, os processos inflamatórios são mediados majoritariamente por células da glia, principalmente pela microglia. Desta forma, este projeto teve como objetivo avaliar o papel da GPNMB na neuroinflamação causada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em culturas de células primárias de glia e em células de linhagem de microglia. Esse estudo ajuda a elucidar os efeitos da GPNMB como um possível novo alvo terapêutico para as doenças neurodegenerativas, visto que a neuroinflamação é uma característica destas doenças. Por não modular a viabilidade celular, foi escolhida a concentração de 25ng/mL de GPNMB para células de cultura primária, e de 2,5µg/mL para as células de linhagem, enquanto a concentração escolhida de LPS foi de 1µg/mL para todos os tipos celulares. O tratamento com GPNMB por 30 minutos não foi capaz de ativar as vias da ERK e Akt. A administração de GPNMB juntamente com o LPS por 30 minutos parece não afetar o nível de RNAm das citocinas *TNF- α* e *IL-10*, porém afeta a transcrição de *IL-1 β* . Entretanto, o pré-tratamento de GPNMB seguido por um desafio com LPS não modula a transcrição de nenhuma das citocinas estudadas nas concentrações escolhidas. Esses dados corroboram estudos anteriores que apontam um papel anti-inflamatório para a GPNMB, sugerindo que esse papel se estenda também a células de cultivo primário.

Palavras-chave: GPNMB. Neuroinflamação. Glia. LPS.

ABSTRACT

Saade, M. Effects of GPNMB in the modulation of neuroinflammation induced by LPS in microglia and astrocytes. [dissertation (Master thesis in Pharmacology)] - Instituto de Ciências Biomédicas , Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

GPNMB is an endogenous transmembrane glycoprotein that can be cleaved by ADAM10, and its extracellular fragment can interact with a transmembrane protein called Na⁺/K⁺-ATPase (NKA). NKA, which is known for its essential role in electrolytic control and cell survival, also has a signaling role in several pathways that influence inflammatory processes. Acute inflammation is a cellular defense process. However, when inflammation is not controlled, several other cellular processes are triggered, which can be harmful to the organism. Most studies indicate that GPNMB has an anti-inflammatory role, both in the periphery and in the central nervous system (CNS). In the CNS inflammatory processes are mainly mediated by glial cells, predominantly by microglia. Thus, this project aimed to evaluate the role of GPNMB in neuroinflammation triggered by lipopolysaccharide (LPS) in primary cultures of glial cells and in a microglia cell line. This study contributes to elucidate the effects of GPNMB as a possible new therapeutic target for neurodegenerative diseases, since neuroinflammation is a pattern found in these diseases. Since GPNMB did not modulate cell viability, the concentration of 25ng/mL of GPNMB was chosen for primary culture cells, and 2.5µg/mL for line cells, while the chosen LPS concentration was 1µg/mL for all cell types. Treatment of GPNMB for 30 minutes was unable to activate the ERK and Akt pathways. The administration of GPNMB with LPS for 30 minutes does not seem to affect the mRNA levels of the cytokines *TNF-α* and *IL-10*, but it does affect the transcription of *IL-1β*. However, the pretreatment of GPNMB followed by a LPS challenge does not modulate the transcription of any of the cytokines studied in the chosen concentrations. These data corroborate previous studies that point to an anti-inflammatory role for GPNMB, suggesting that this role also extends to primary cultured cells.

Key-words: GPNMB. Neuroinflammation. Glia. LPS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 GPNMB	14
1.2 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	20
1.3 Neuroinflamação e o LPS	24
2 OBJETIVO	28
2.1 Objetivos específicos	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Cultura primária de células da microglia e astrócitos - adultos	29
3.3 Cultura primária de células de glia mista, microglia e astrócitos - neonatos	31
3.4 Linhagem celular	32
3.5 Ensaio de viabilidade celular	33
3.6 Imunofluorescência	34
3.7 Ensaio ELISA	35
3.8 Extração de proteínas citosólicas e nucleares	36
3.9 Dosagem de proteínas	36
3.10 Western Blotting	37
3.11 Extração de RNA	38
3.12 Transformação de RNA em cDNA	40
3.13 PCR	40
3.14 Análise de resultados	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Viabilidade das células de cultura primária de microglia e astrócitos - adultos	44
4.2 Caracterização das Culturas Celulares Primárias	45
4.3 Ensaio de viabilidade	49
4.3.1 Curva de viabilidade celular do LPS	49
4.3.2 Curva de viabilidade celular do GPNMB	52
4.3.3 Curva de viabilidade celular do co-tratamento de LPS e GPNMB	54
4.3.4 Curva de viabilidade celular do tratamento de GPNMB+LPS (pré-tratamento)	58
4.3.5 Curva de viabilidade celular do co-tratamento de ouabaína+GPNMB	62
4.4 Avaliação do efeito da GPNMB nas vias da ERK e Akt e seu impacto no NF-κB	65
4.4.1 Avaliação da ativação da via da ERK e da Akt e efeitos da GPNMB em células da linhagem BV-2	65
4.4.2 Avaliação da ativação da via da ERK e da Akt e efeitos da GPNMB em células de cultura primária de glia	67
4.5 Avaliação dos níveis de RNAm de citocinas pró- e anti-inflamatórias tratadas com GPNMB e LPS	69
4.5.1 Expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em células da linhagem BV-2	69

<u>4.5.2 Expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em células primárias de glia (co-tratamento)</u>	<u>71</u>
<u>4.5.3 Expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em células primárias de glia (pré-tratamento)</u>	<u>73</u>
4.6 Análise dos níveis de TNF-α liberado no meio	75
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 GPNMB

A GPNMB, traduzida do inglês “glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B”, é uma proteína transmembrana unipasso do tipo 1, também conhecida como osteoactivina (OA), ligante de integrina célula dendrítica-heparina (DC-HIL) e fator de crescimento hematopoiético induzível tipo-neuroquinina 1 (HGFIN). A GPNMB é amplamente expressa de forma constitutiva em diversos tecidos no corpo humano, como na pele, no tecido adiposo e no sistema nervoso central (SNC), sendo que no SNC ela é majoritariamente encontrada nas células da microglia (Huang et al., 2012). Além de ser amplamente expressa em seres humanos, a GPNMB também é encontrada constitutivamente com grande homologia em outros seres vivos, incluindo murinos (Huang et al., 2012).

A GPNMB possui várias funções conhecidas, o que justifica os diversos nomes que são atribuídos a ela. Esta proteína atua na diferenciação e funcionamento de osteoclastos e osteoblastos (Abdelmagrid et al., 2008; Ripoll et al., 2008), ativação dos fibroblastos, regulação da degeneração e regeneração da matriz extracelular muscular do músculo esquelético (Furochi et al., 2007), maturação das células do sistema linfático e hematopoiético (Bandari et al., 2003) e diminuição da ativação dos linfócitos T (Chung et al., 2007). Pesquisas indicam que os níveis de GPNMB são alterados em diversos tipos de cânceres, como câncer de mama (Rose & Siegel, 2007), glioblastoma multiforme (Kuan et al., 2006), melanoma (Okamoto et al., 2005), câncer hepático (Onaga et al., 2003), entre outros. Apesar de amplamente estudado, o papel da GPNMB no câncer é controverso. Esta proteína foi isolada pela primeira vez em 1995 por Weterman e colaboradores, que a descreveram como presente em tumores com baixo poder metastático e que a transferência de cDNA parcial da GPNMB para tumores de alto poder metastático resultou na diminuição do crescimento tumoral e poder de metástase (Weterman et al., 1995). Pesquisas seguintes apontam que a GPNMB está associada à invasão e metástase de células tumorais (Rich et al., 2003), progressão de células tumorais (Ono et al., 2016a), possui ação angiogênica (Rose et

al., 2010), consequentemente relacionando a GPNMB com o aumento da agressividade e letalidade da doença.

A GPNMB é codificada pelo gene localizado no locus 7p15 e pode ser encontrada em duas isoformas, resultantes de splicing alternativo: uma de 572 e outra com 560 aminoácidos (van der Lienden et al., 2018). Após sua síntese, a GPNMB é direcionada à membrana celular, sendo uma proteína transmembrana. A parte extracelular da GPNMB pode ser clivada pela metaloproteinase ADAM10, liberando seu domínio extracelular ativo e solúvel (Rose et al., 2010) que interage com diversas moléculas, como a Na^+ , K^+ -ATPase (NKA), CD44, Receptor de Fator de Crescimento Epidermal (EGFR), e Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGFR) (Taya & Hammes, 2018), integrinas, heparina e Syndecan-4 (Shikano et al., 2001; Maric et al., 2013). O domínio extracelular da GPNMB possui 12 sítios de glicosilação e é composto por um domínio PKD, que está envolvido em interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato, um domínio de repetição rico em prolina (PRD), cuja interação com certos domínios está envolvido com má formação celular e formação de tumores, e um domínio RGD que está associado com adesão celular e motilidade (Abdelmagrid et al., 2008) (Figura 1). A interação entre GPNMB e a NKA ativa as vias fosfoinositídeo3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt) e a via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos MEK/ERK (Ono et al, 2016b).

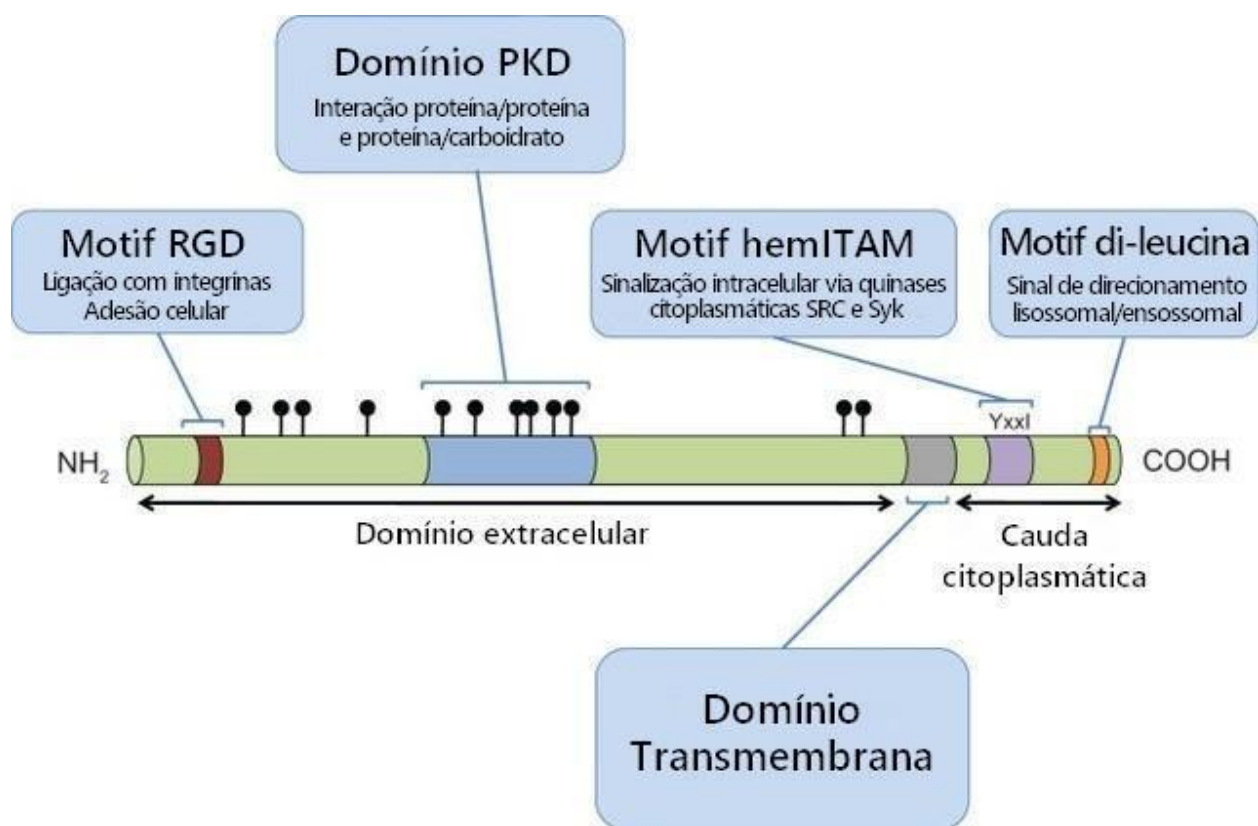


Figura 1. Representação da glicoproteína GPNMB. Figura mostrando os sítios de glicosilação, domínios, motifs e terminais da glicoproteína GPNMB. Traduzido de Maric et al, 2013.

O fragmento extracelular da GPNMB aumenta a fosforilação da ERK, que, quando ativada, migra para o núcleo e é responsável por regular diversos fatores de transcrição relacionados com o metabolismo, proliferação, diferenciação e apoptose (Guo et al., 2020). Uma das consequências da ativação da ERK pela GPNMB é o aumento da expressão da metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3) (Furochi et al., 2007). A MMP-3 regula o equilíbrio entre degeneração e regeneração da matriz extracelular e também está envolvida com a inflamação. Há indícios de que os efeitos pró-inflamatórios do lipopolissacarídeo (LPS) é dependente de MMP-3, estando presente na microglia ativada (Woo et al., 2008). Também foi mostrado que o aumento de MMP-3 mediado por LPS é dependente de GPNMB em linhagem celular de microglia BV-2 (Shi et al., 2014). Nesse estudo, os níveis de GPNMB são aumentados com a administração de LPS *in vitro* e a supressão de MMP-3 ou GPNMB levou a uma diminuição dos níveis do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β), Óxido Nítrico-Sintase induzida (iNOS) e Óxido Nítrico (NO) (Shi et al., 2014).

Esse artigo mostra que a GPNMB está envolvida em mecanismos de neuroinflamação induzidos por LPS, sugerindo que esta glicoproteína está envolvida na resposta inflamatória mediada por microglia, porém são necessários mais estudos para comprovar se esse efeito é visto em outros modelos, visto que os experimentos foram feitos apenas em linhagem celular.

Outros estudos também verificaram os efeitos da administração *in vitro* e *in vivo* de LPS e a expressão de GPNMB. Dentre os estudos *in vitro*, a relação entre a administração de LPS e os níveis de GPNMB parecem ser controversos. No estudo mencionado no parágrafo anterior, houve um aumento dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de *Gpnmb* após o tratamento de 6 horas com LPS nas concentrações de 10ng/mL ou 100ng/mL, que continuou elevado após 12 e 24 horas no grupo tratado com 100ng/mL de LPS (Shi et al., 2014). Além dos níveis de RNAm, os níveis proteicos de GPNMB também aumentaram após 12 horas do tratamento com LPS nas concentrações de 10ng/mL ou 100ng/mL (Shi et al., 2014). Entretanto, outro estudo não observou uma alteração significativa nos níveis de RNAm de *Gpnmb* após 24 horas de tratamento com LPS na concentração de 100ng/mL (Hüttenrauch et al., 2018).

Em estudos *in vivo*, a injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS em ratos levou a um aumento dos níveis de GPNMB no SNC, principalmente em células da microglia e macrófagos infiltrados na área postrema (Huang et al., 2012). A área postrema é importante na interface entre o sistema imune e o SNC (Goehler et al., 2006). O aumento dos níveis de GPNMB na microglia após injeção sistêmica de LPS também ocorre em camundongos (Cho et al., 2019). Esses estudos sugerem uma interação *in vitro* e *in vivo* entre a processos inflamatórios e a presença da GPNMB no SNC.

Além das evidências que apontam um aumento da GPNMB após um estímulo pró-inflamatório, a GPNMB também parece estar aumentada em doenças neurodegenerativas. Estudos mostraram um aumento nos níveis de GPNMB *in vitro*, em modelos murinos associados a processos degenerativos e em pacientes. A GPNMB parece estar mais expressa na doença de Alzheimer (Hüttenrauch et al., 2018), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (Tanaka et al., 2012; Ono et al., 2016b) e Doença de Parkinson (Moloney et al., 2018). Além disso, o tratamento *in vitro* com

β -Amilóide (A β), um peptídeo que se agrega e acumula na doença de Alzheimer, levou ao aumento dos níveis de RNAm de *Gpnmb*, sendo que o aumento dos níveis de GPNMB ocorre principalmente nas células da microglia próximas aos agregados de A β (Hüttenrauch et al., 2018). Em pacientes, existe evidência de que há um aumento nos níveis de GPNMB na doença de Alzheimer (Hüttenrauch et al., 2018) e na forma esporádica da ELA (Tanaka et al., 2012) tanto em tecido *post-mortem* quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR). Pacientes acometidos pela doença de Parkinson apresentam o aumento da expressão de GPNMB na substância negra, que é a estrutura cerebral mais afetada por esta doença (Neal et al., 2018). Pelo aparente aumento dos níveis de GPNMB nas doenças neurodegenerativas em geral, foi proposto que o aumento da expressão de GPNMB, juntamente com outros genes, pode ser considerado um marcador de microglia associada à doença (DAM) (Hüttenrauch et al., 2018, Krasemann et al., 2017).

Apesar da relação entre o aumento dos níveis de GPNMB e doenças neurodegenerativas, existem poucos estudos procurando entender a influência da GPNMB nestas doenças. Há um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) conhecido por aumentar os riscos do desenvolvimento da doença de Parkinson que está localizado no gene da GPNMB. Esse SNP é chamado rs199347 e resulta no aumento da expressão de GPNMB (Murthy et al., 2017). Entretanto, foi visto que a GPNMB tem potencial neuroprotetor ao diminuir a resposta inflamatória em astrócitos via receptor CD44 em um modelo murino de doença de Parkinson, no qual a substância negra dos animais foi lesada com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (Neal et al., 2018). Portanto, ainda são necessários mais estudos na área para entender se a GPNMB possui um papel de risco ou protetor na doença de Parkinson e em outras doenças neurodegenerativas.

Existem estudos que verificaram que a GPNMB possui uma influência na ELA, doença caracterizada pela progressiva paralisia muscular (Tanaka et al, 2012) e por mutações no gene da SOD1. Mutações no gene da SOD1 estão diretamente ligadas ao surgimento de ELA familiar, e há indícios de que mutações na SOD1 também estão relacionadas à ELA esporádica (Rotunno & Bosco, 2013). Tanaka e colaboradores identificaram que os níveis de RNAm da *Gpnmb* estão aumentados em um modelo

animal de ELA induzido pela mutação na SOD1 e que a diminuição dos níveis de RNAm de *Gpnmb* por RNA de interferência (siRNA) levou ao aumento da vulnerabilidade de neurônios motores à morte celular (Tanaka et al, 2012). Além disso, o fragmento extracelular da GPNMB apresentou papel antioxidante ao reverter a ação neurotóxica da SOD1^{G93A} (Tanaka et al., 2012). Em outro estudo, foi mostrado que camundongos transgênicos superexpressando SOD1^{G93A} e GPNMB tiveram um fenótipo de ELA menos severo comparado aos animais SOD1^{G93A} (Nagahara et al., 2015). Esses dados sugerem um papel neuroprotetor da GPNMB.

No mesmo modelo murino de ELA por mutação da SOD1 foi observado que a GPNMB pode ativar sinais de sobrevivência via PI3K/Akt e MEK/ERK, impedindo a morte celular neuronal causada por apoptose (Ono et al., 2016b). Há indícios de que a via PI3K/Akt pode ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) via Policistina 1 (PDK1). O NF-κB é responsável por regular a transcrição de diversos genes envolvidos na inflamação e sobrevivência celular, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e de regulação do ciclo celular, sendo que a sua ativação é dependente da translocação de suas subunidades para o núcleo (Liu et al., 2017). A PDK1 é uma enzima que está envolvida na via PI3K/Akt que fosforila diretamente o Inibidor do Fator Nuclear kappa B Quinase Subunidade beta (IKKβ), liberando o NF-κB, o que permite a translocação do mesmo para o núcleo e consequentemente ligação com o DNA. Essas interações entre o sistema PI3K/Akt e IKK/NF-κB são importantes no mecanismo inflamatório e na defesa do organismo.

O papel protetor da GPNMB também foi mostrado no caso de isquemia-reperfusão (IRI) cerebral, no a extensão de dano isquêmico foi menor em modelos animais que superexpressam GPNMB ou tratados com GPNMB recombinante (fração extracelular livre da GPNMB) (Noda et al., 2017). Além disso, a IRI parece ser uma condição que aumenta os níveis de GPNMB (Noda et al., 2017; Michalinos et al., 2020). É importante ressaltar que há o componente neuroinflamatório tanto em doenças neurodegenerativas quanto na IRI (Wu et al., 2020). Por fim, também foi visto que a GPNMB é altamente expressa em macrófagos do tipo M2 (Yu et al., 2016; Zhou et al., 2017), que são macrófagos em um estado anti-inflamatório e resolutivo (Hu et al., 2015). Além disso, a GPNMB promove a polarização do tipo M2 em macrófagos (Zhou

et al., 2017). A partir desses estudos, a importância da GPNMB na neuroinflamação começa a ser explorada, abrindo caminhos para novos experimentos na área.

1.2 Na⁺, K⁺-ATPase

A proteína transmembrana NKA é responsável pela troca 3 íons de sódio (Na⁺) intracelular por 2 íons de potássio (K⁺) extracelular com o uso da energia proveniente da hidrólise de adenosina 5'-trifosfato (ATP) em adenosina 5'-difosfato (ADP). Devido a essa troca de íons, a NKA é essencial para a manutenção do potencial de membrana e restabelecer o equilíbrio iônico da célula após um potencial de ação.

A NKA é composta por um heterodímero de subunidades α , β e FXYP. A subunidade α é caracterizada pela sua função catalítica e contém os sítios de ligação para ATP, Na⁺, K⁺ e outros reguladores de função da NKA, como a ouabaína (Morth et al., 2007). A subunidade α é responsável pela hidrólise de ATP e translocação dos íons sódio e potássio. Existem quatro tipos de subunidade α da NKA que são diferentemente distribuídas nos tecidos: a subunidade α_1 é expressa constitutivamente em todas as células do corpo; a subunidade α_2 está presente em astrócitos, adipócitos e no tecido muscular; a subunidade α_3 é encontrada em neurônios; a subunidade α_4 é encontrada nos espermatozoides (Kinoshita et al., 2016). A subunidade β possui função chaperona e possui influência na afinidade por íons Na⁺ nos diferentes subtipos de NKA (Geering, 2008). A FXYP compreende uma família de proteínas de membrana que atuam como subunidades auxiliares e regulam a atividade da NKA de uma forma tecido e isoforma-específica (Geering, 2006).

Além do potencial eletrolítico desta proteína, também há indícios de que a NKA tenha potencial sinalizador (Xie, 2003). Estudos mostram que a NKA é capaz de ativar vias de quinases e fatores de crescimento, produzir espécies reativas de oxigênio, entre outros (Xie & Askari, 2002). Além disso, foi mostrado que a ouabaína, um glicosídeo cardiotônico, interage com a NKA, bloqueando o transporte ativo de Na⁺ (em altas concentrações) e ativando outras vias de sinalização (em baixas concentrações). O nosso laboratório mostrou que a ouabaína possui um efeito anti-inflamatório à ação do LPS no hipocampo de ratos (Kinoshita et al., 2014) e nossos colaboradores

observaram que a ouabaína atenua a ação antioxidativa do LPS no cerebelo de ratos (Garcia et al., 2018). Além da ação anti-inflamatória, a ouabaína na concentração de 10nM também parece favorecer a plasticidade sináptica e formação de memórias em ratos adultos (Orellana et al., 2018).

Ao se ligar a NKA, a ouabaína leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B nos rins (Aizman & Aperia, 2003), em cultura celular de cerebelo (de Sá Lima et al., 2013), e no hipocampo de ratos *in vivo* (Orellana et al., 2018), mas reduz sua ativação em macrófagos em estudos *in vivo* (Mascarenhas et al., 2014). A relação entre a ouabaína a inflamação parece ser dose-dependente, sendo que baixas concentrações parecem promover uma resposta anti-inflamatória e anti-apoptótica (Kinoshita et al., 2017; de Vasconcelos et al., 2011) e altas concentrações promovem a inibição da NKA, o que resulta em uma resposta pró-inflamatória descontrolada e morte celular (Kobayashi et al., 2017). Em células da glia, a interação entre a NKA e a ouabaína (na concentração de 10 μ M) levou à diminuição da ativação do NF- κ B induzida pelo LPS (Kinoshita et al., 2017). Apesar do efeito protetor da ouabaína ter sido demonstrado, ainda não há um consenso se ouabaína é uma molécula encontrada de forma endógena (Hamlyn & Blaustein, 2016), o que levanta questões sobre sua forma de utilização, se a própria ouabaína precisa ser administrada ou se outros fatores podem modular sua expressão.

Há evidências de que fatores associados à inflamação e envelhecimento diminuem a atividade da NKA (Arnaiz & Ordieres, 2014; Orellana et al., 2016; Kawamoto et al., 2008a; Maurya & Prakash, 2013; Scavone et al., 2005), que parece ter relação com o aumento de radicais livres e estresse oxidativo durante o envelhecimento. Como esperado, os níveis de atividade da NKA no cérebro de pacientes que sofrem da doença de Alzheimer são reduzidos em comparação com indivíduos da mesma idade (Hattori et al., 1998). A diminuição da atividade da NKA leva ao acúmulo de Na⁺ intracelular, aumentando o influxo de Ca⁺² (Mark et al., 1995), causando distúrbios no controle iônico dos neurônios, levando à neurotoxicidade e apoptose. Uma possibilidade de mecanismo para a diminuição da atividade da NKA é a interação entre os esferóides do peptídeo A β e a subunidade α 3 da NKA, sendo que essa interação leva a níveis elevados de Ca⁺² no neurônio pré-sináptico, causando hiper ativação neuronal e consequente morte neuronal (Ohnishi et al., 2015). Esses

dados indicam que há uma relação entre a NKA e morte neuronal encontrada nas doenças neurodegenerativas (Kinoshita et al., 2016; Orellana et al., 2015, 2016).

Como mencionado anteriormente, um estudo mostrou a interação entre GPNMB e NKA, e essa interação se dá pelas subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 3$ (Ono et al, 2016b). A maioria dos estudos que mostram a interação entre a GPNMB e doenças neurodegenerativas ou inflamação ainda não exploraram o mecanismo envolvido. Como há diversas evidências que sugerem uma provável relação entre NKA, neuroinflamação e envelhecimento, assim como uma relação da GPNMB com a NKA, neuroinflamação e doenças neurodegenerativas, é possível que o mecanismo de ação da GPNMB, poderia estar associado, em parte, à via de sinalização pela NKA, que atuaria na modulação dos genes associados a estes processos (Figura 2).

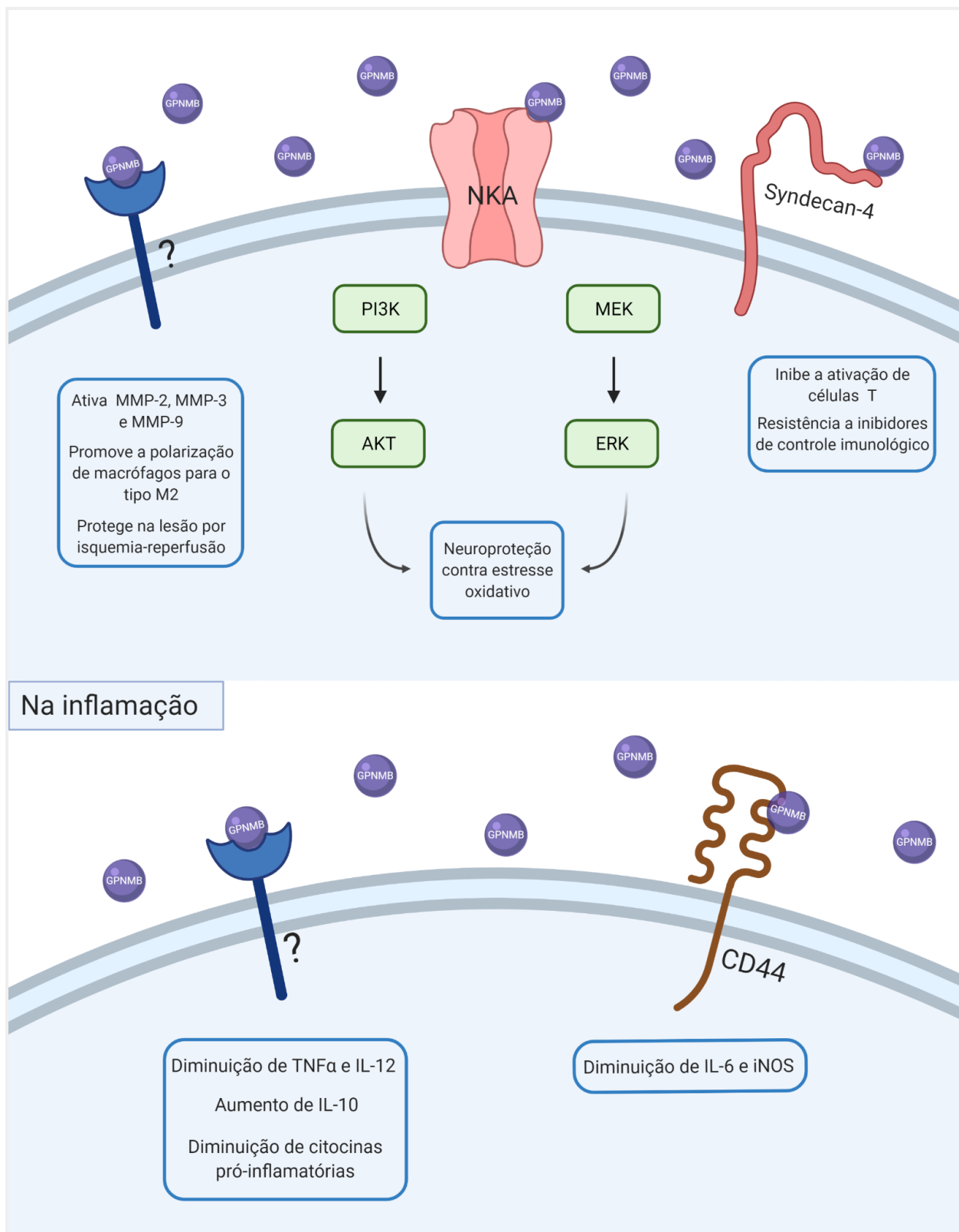


Figura 2. Esquema da sinalização intracelular desencadeada pela GPNMB em condições fisiológicas e inflamatórias. Após a clivagem pela ADAM10, a fração extracelular solúvel da GPNMB pode interagir com diversos receptores e outras moléculas, algumas ainda não conhecidas, e ativar uma resposta que leva a mudanças na expressão de outras moléculas. Traduzido de Saade et al., 2021.

1.3 Neuroinflamação e o LPS

A neuroinflamação é um processo associado à perda de estrutura e função neuronal e está também associada à incidência dos níveis de neurodegeneração e ao envelhecimento (Hof & Mobbs, 2000). A inflamação no SNC é mediada por células da glia, em especial por células da microglia. Células da microglia e astrócitos são chamadas de células de imunidade inata do SNC e interagem entre si para a proteção dos neurônios (Ransohoff & Brown, 2012). Os astrócitos possuem funções relacionadas à barreira hemato-encefálica, auxiliando na defesa e na homeostase do SNC (Verkhatsky & Nedergaard, 2018), enquanto a microglia é chamada de macrófago residente do SNC, é sensível a pequenas mudanças no ambiente e realiza funções relacionadas à fagocitose, liberação de citocinas e reparo tecidual (Graeber et al., 2011). Existem evidências de que há um aumento de um fenótipo morfológicamente ativo da microglia em pacientes de doenças neurodegenerativas (Perry et al., 2010; Krasemann et al., 2017), porém, a função da microglia e como sua ativação ocorre ainda não é completamente elucidada neste contexto. Uma hipótese estudada é a de que a microglia e a inflamação contribuem para a progressão e resolução da patogênese, porém quando a ativação da microglia se torna crônica e descontrolada, ela se torna disfuncional e reflete o quadro de degeneração neuronal.

Existem diversos fatores que podem desencadear uma resposta inflamatória, sendo que a administração de LPS é um modelo muito utilizado para estudar a inflamação aguda. O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que induz um quadro pró-inflamatório nos organismos. Uma vez dentro do organismo, o LPS se liga a uma proteína de fase aguda do hospedeiro, o LBP (proteína ligadora de LPS), que é produzida no fígado. A partir desta interação, é formado um complexo LPS:LBP, promovendo a transferência do LPS para a proteína de membrana periférica CD14, presente na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Płóciennikowska et al., 2015). O novo complexo formado, chamado de LPS:CD14, ativa a sinalização do receptor semelhante ao Toll-4 (TLR-4), o qual é complexado à proteína mielóide de diferenciação-2 (MD-2). No meio intracelular ocorre uma série de reações em cascata, iniciando-se pelo recrutamento de dois pares de proteínas adaptativas TIRAP/MyD88 e TRAM/TRIF. Essa cascata de

sinalização resulta na ativação do fator de transcrição NF- κ B (Figura 3). A via da Akt também parece estar envolvida na ativação do NF- κ B por ativar a translocação da subunidade p65 (Tanaka et al., 2005).

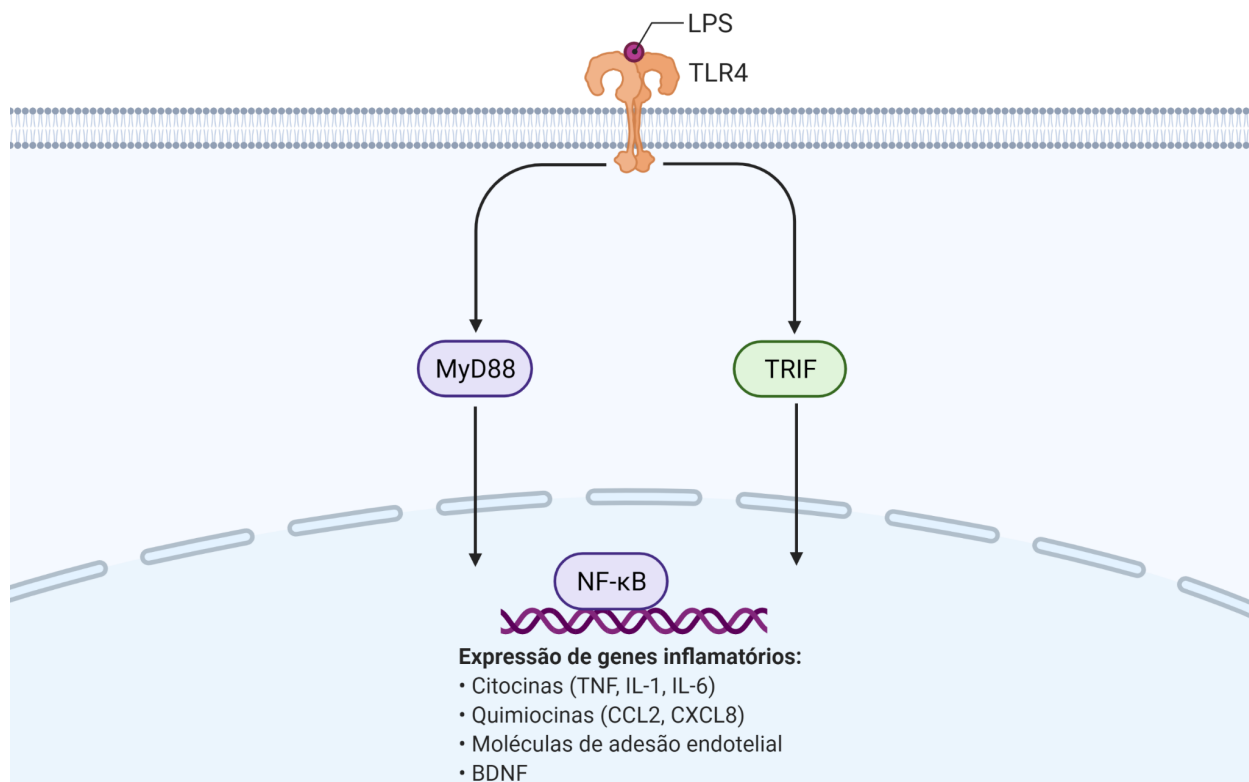


Figura 3. Mecanismo de ação do LPS via sinalização do TLR. A ligação do LPS no TLR ativa as proteínas MyD88 e TRIF, que resultam na ativação do NF- κ B. O NF- κ B, por sua vez, favorece a transcrição de genes envolvidos com o processo inflamatório e adaptativo. Esta figura foi adaptada e traduzida de BioRender.com.

O NF- κ B é um dímero (homo ou heterodímero) formado pelas subunidades da família Rel, sendo as mais conhecidas a p65 e p50. Diferentes combinações destas subunidades podem resultar em um NF- κ B transcricionalmente ativo (p50/p65, p65/p65) ou inativo (p50/p50) (Ghosh et al., 1998). O NF- κ B transcricionalmente ativo faz aumentar a produção de diversas citocinas, incluindo a IL-1 β , TNF- α e interleucina 6 (IL-6), além de quimiocinas, moléculas de adesão endotelial e o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). É importante ressaltar que a relação entre doenças neurodegenerativas e neuroinflamação também é evidenciada pelo aumento de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β em ambos cenários (Smith et al., 2012).

Essa ativação de citocinas promovida pelo NF- κ B leva à polarização de macrófagos e microglia para o fenotipo M1 (Liu et al., 2017). A polarização do tipo M1 é caracterizada pelo caráter pró-inflamatório, com a transcrição de citocinas como IL-1 β e TNF- α . Em contraste, a polarização M2 de macrófagos/microglia está relacionada com a resolução da inflamação e com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Martinez & Gordon, 2014). No SNC, há evidências que sugerem uma função dual para o NF- κ B nas doenças neurodegenerativas que depende do tipo celular: a ativação do NF- κ B nos neurônios promove a sobrevivência, enquanto a ativação na glia e nas células imunes medeiam processos inflamatórios patológicos (Camandola & Mattson, 2007).

A administração intracerebral de LPS é capaz de ativar microglia *in vivo* e *in vitro* e induzir neurodegeneração (Gao et al., 2002). Nosso grupo realizou estudos para avaliar a influência da injeção sistêmica de LPS e seus efeitos na neuroinflamação aguda. O grupo mostrou que a injeção i.p. de LPS em ratos causa o aumento do NF- κ B ativo (subunidades p50/p65 e p65/p65) no hipocampo e córtex frontal de maneira aguda: após 1-2 horas ocorre os maiores níveis, e após 4-6 horas, o NF- κ B ativo volta aos níveis basais (Glezer et al., 2003; Munhoz et al., 2010). Em cultura celular, nosso grupo observou que o tratamento com LPS na concentração de 1 μ g/mL é capaz de translocar a unidade p65 do NF- κ B para o núcleo e ativar o NF- κ B tanto 1 hora ou 6 horas após o tratamento (Kinoshita et al., 2017). Outro fator que ativa o NF- κ B no cérebro é o estímulo com A β (Kawamoto et al., 2008b), o que evidencia a relação entre moléculas presentes em doenças neurodegenerativas e fatores inflamatórios.

A ação do LPS em desencadear a neuroinflamação se dá tanto de forma direta (via intraventricular ou *in vitro*) quanto sistêmica (i.p.) (Rivest et al., 2000). Como mencionado anteriormente, a injeção i.p. de LPS foi capaz de induzir o aumento dos níveis de GPNMB na microglia de camundongos (Cho et al., 2019) e ratos (Huang et al., 2012), o que sugere um aumento dos níveis de GPNMB na neuroinflamação. Mesmo após relatada a interação entre a administração do LPS e a indução dos níveis da GPNMB, os mecanismos celulares que favorecem esse fenômeno ainda não foram estudados.

Apesar da relação entre doenças neurodegenerativas e a neuroinflamação, a administração de fármacos estritamente anti-inflamatórios não são capazes de reverter os danos que essas doenças causam previamente, mas podem desacelerar a sua progressão (Glass et al., 2010). Além disso, a administração crônica de fármacos anti-inflamatórios, causa outras sérias consequências ao organismo. A GPNMB, por ser uma proteína endógena com potencial anti-inflamatório, surge como uma alternativa para reduzir agentes inflamatórios que contribuem para a neurotoxicidade, podendo assim ter relevância clínica em todas as doenças neurodegenerativas e outros distúrbios que possuem o fator neuroinflamatório.

2 OBJETIVO

Avaliar o papel da glicoproteína GPNMB na sinalização inflamatória desencadeada pelo LPS em células da glia.

2.1 Objetivos específicos

1. Preparar culturas celulares de microglia e astrócitos isolados;
2. Determinar a viabilidade celular e concentrações de LPS e GPNMB que não induzem morte celular para serem utilizadas nos tratamentos por liberação de LDH e ensaio de MTT;
3. Examinar mudanças induzidas pelo tratamento com GPNMB recombinante na ativação das vias da ERK, Akt e na translocação do NF- κ B em células da glia;
4. Examinar mudanças induzidas pelo tratamento com GPNMB recombinante na expressão de proteínas pró ou anti-inflamatórias em células da glia, na presença ou ausência de LPS;
5. Avaliar se o efeito causado pelo tratamento com GPNMB em linhagem celular se reproduz em células de cultura primária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para as culturas primárias de animais adultos, foram utilizados ratos machos de 60 dias da linhagem Wistar. Para as culturas primárias de ratos neonatos, foram utilizados ratos da linhagem Wistar de ambos os sexos, com idade entre 0 a 3 dias de vida. Ambos ratos adultos e neonatos foram provenientes do Biotério de Produção de Ratos SPF do Instituto de Ciências Biomédicas - Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo, os animais adultos foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia - Unidade 1 e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (9550151018) e normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Durante o período de permanência no biotério, os animais tiveram acesso livre à água e comida (ração para roedores – Nuvilab CR1®), a temperatura foi mantida constante entre $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas entre 7:00-19:00h). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno (16cm de altura, 30cm de largura e 38cm de comprimento) com a base coberta com maravalha.

3.2 Cultura primária de células da microglia e astrócitos - adultos

Ratos adultos foram perfundidos com solução salina 0,9% e o encéfalo foi retirado. O cerebelo foi descartado e o restante do encéfalo foi cortado em pequenos pedaços e transferido para um tubo contendo HBSS (Solução de sais balanceada de Hanks) e em seguida foi acrescido de 975 μL do enzyme mix 1 do Neural Dissociation Kit (Miltenyi Biotec). O tecido foi então homogeneizado com uma pipeta de 1mL e incubado por 15 minutos a 37°C sob rotação constante. Após rotação, foi adicionado 15 μL do enzyme mix 2 do Neural Dissociation Kit e o tecido foi novamente homogeneizado com uma pipeta de 1mL e incubado por 20 minutos a 37°C sob rotação constante. Foi acrescentado 5mL de HBSS ao tubo e o tecido foi fragmentado por ação mecânica com o auxílio de um homogeneizador Dounce no gelo, sendo feitas 20 passagens. O homogeneizado foi colocado no fluxo laminar e filtrado em um cell

strainer de 70 μ m, depois centrifugado por 5 minutos a 4°C a 400g (“*no break*”).

Após centrifugação, foi acrescentado ao tecido 8mL de 35% Percoll (2,8mL Percoll isotônico e 5,2mL HBSS). Depois, foi acrescentado lenta e cuidadosamente 2mL de HBSS para formar uma fase transparente acima do Percoll. Centrifugado por 45 minutos 4°C a 800g (no break). O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuscitado em 5mL de HBSS, então a suspensão foi centrifugada por 5 minutos 4°C 400g. O sobrenadante foi retirado e ao fim desta etapa, temos um pellet de células individuais provenientes do SNC, que foi ressuscitado em 80 μ L de tampão de separação que consiste em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7.2, com 0.5% albumina sérica bovina (BSA), e foi acrescentado ao tubo 10 μ L de Microbeads anti-CD11b (para isolamento da microglia) ou Microbeads anti-ASCA-2 (para isolamento de astrócitos) (Miltenyi Biotec).

A solução células-beads foi incubada por 15 minutos a 4°C. Após incubação, foi acrescentado 500 μ L do tampão de separação às células. Enquanto isso, as colunas magnéticas MS (Miltenyi Biotec) foram preparadas e lavadas com 500 μ L do tampão de separação. A solução tampão-células-beads foi colocada na coluna para separação magnética. No efluente estão as células que não foram retidas na coluna. Após a separação magnética, a coluna separada dos ímãs, foi adicionado 1mL de tampão de separação e ocorreu a separação das células e dos beads com o auxílio de um êmbolo. O tubo contendo as células selecionadas foi centrifugado a 400g, 4°C, por 5 minutos para coletar o pellet das células no fundo do tubo. As células foram ressuscitadas em 1mL de meio de cultivo, contadas e plaqueadas em placas de acordo com o tipo de ensaio que foi feito posteriormente e mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ por aproximadamente 14 dias. O meio de cultivo utilizado foi o DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), acrescido de 2mM de glutamina, 20mM glicose, 2mM HEPES, 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina e estreptomicina (100 U/mL). A troca do meio foi feita duas vezes por semana. As culturas resultantes foram de microglia isolada ou astrócitos isolados.

3.3 Cultura primária de células de glia mista, microglia e astrócitos - neonatos

O protocolo foi realizado conforme descrito por Grabert e colaboradores (Grabert et al., 2018). Ratos neonatos de até 3 dias de vida foram decapitados (eutanásia). A cabeça foi rapidamente banhada em etanol 70% para auxiliar na assepsia do tecido. O cérebro foi retirado e mantido em solução de HBSS para a dissecação do córtex. As meninges foram retiradas com o auxílio de pinças sob lupa cirúrgica (Stemi 2000, Zeiss) e então os córtices foram transferidos para um tubo contendo meio DMEM acrescido com 1% de penicilina/estreptomicina.

O tubo contendo os córtices foi levado ao fluxo laminar onde foi acrescido de 3mL de solução de tripsina-EDTA (0,5g de tripsina/L, 0,2g de EDTA 4Na 2H₂O/L, GIBCO). O tecido foi levemente homogeneizado com auxílio de uma pipeta Pasteur e mantido por 10 minutos em incubadora a 37°C. Para parar a ação da tripsina, foi acrescido ao tubo 5mL de meio de cultivo DMEM descrito anteriormente. O tecido foi dissociado de forma mecânica, utilizando uma pipeta Pasteur. O homogeneizado foi centrifugado em temperatura ambiente, por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o pellet contendo as células foi ressuscitado em 1mL de meio de cultivo e vertido sobre um cell strainer de 70µm. As células foram contadas e plaqueadas em concentração equivalente a 10⁶ células em garrafas de cultivo de 75cm², acrescidos de 10mL meio de cultivo, mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ por aproximadamente 14 dias, quando alcançam confluência total.

Para a cultura de glia mista, após as células alcançarem confluência total, o meio de cultivo foi retirado e a garrafa foi lavada 2 vezes com HBSS. Então, foi acrescentado 2,5mL de tripsina 0.5% durante 20 minutos para que as células fossem retiradas da garrafa. Para parar a reação de tripsinização, foi acrescentado meio com soro à garrafa e a solução contendo as células foi transferida a um tubo de 15mL. O tubo foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em meio de cultivo. As células foram, então, contadas e plaqueadas para experimentos (10⁶ células/poço em placas de 6 poços para Western Blotting ou PCR, 2x10⁴ células/poço em placas de

24 poços para imunohistoquímica, 10^4 células/poço em placas de 96 poços para MTT/LDH).

Para as culturas de microglia e astrócitos primários isolados, após 14 dias de cultivo, foi feita a separação de microglia e astrócitos por agitação (Mecha et al., 2011). Os frascos de cultivo foram agitados por 3 horas, 230 rpm para que as células da microglia se soltassem do fundo da garrafa. O sobrenadante foi retirado, centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm. O pellet contendo as células de microglia foi ressuscitado em 1mL de meio de cultivo, as células foram contadas e plaqueadas em concentrações adequadas para cada experimento (5×10^5 células/poço em placas de 6 poços para Western Blotting e PCR, 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços para imunohistoquímica, 10^4 células/poço em placas de 96 poços para MTT/LDH). O meio de cultivo utilizado para a microglia isolada foi o mesmo meio de cultivo utilizado para os outros tipos celulares suplementado com colesterol, CSF-1 e TGF- β 2 (Bohlen et al, 2017).

Após a separação da microglia, foram adicionados 10mL de meio de cultivo às garrafas e elas foram retornadas ao agitador overnight em rotação de 260 rpm. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado, a garrafa foi lavada 3x com HBSS e posteriormente foi colocada tripsina-EDTA. A garrafa foi mantida por 10 minutos na incubadora a 37°C até que os astrócitos se desprendessem do fundo. Foram acrescentados 5mL de meio de cultivo, e então o homogeneizado contendo os astrócitos foi transferido a um tubo de 15mL que foi centrifugado por 10 minutos a 1000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e o pellet contendo os astrócitos foi ressuscitado em 1mL de meio de cultivo. Foi feita a contagem de células, e então as células foram plaqueadas em concentrações adequadas para cada experimento.

3.4 Linhagem celular

A fim de comparar a resposta da GPNMB em células de cultura primária e em linhagem celular, as células BV-2 (linhagem celular de microglia derivada de ratos) foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Isaias Glezer e Prof^a. Dr^a. Alicia Juliana

Kowaltowski. As células foram mantidas no Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação da Prof^a. Dr^a. Carolina Demarchi Munhoz (laboratório de nível de biossegurança 2). As células BV-2 foram mantidas no mesmo meio de cultivo utilizado para as células primárias. Quando as células atingiam confluência maior do que 80%, o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas 2 vezes com HBSS. Então, foi acrescentado 3mL de tripsina 0.5% durante 10 minutos para a retirada da garrafa. Foi acrescentado meio com soro à garrafa e a solução foi transferida a um tubo de 15mL. O tubo foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O pellet de células foi ressuscitado em meio de cultivo, contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer e plaqueadas para experimentos (5×10^5 células/poço em placas de 6 poços para Western Blotting ou PCR, 10^4 células/poço em placas de 96 poços para MTT/LDH) e mantidas em garrafas de 150cm² até um próximo repique. Quando congeladas, as células foram mantidas em criotubos contendo meio de cultivo com 10% de DMSO e armazenadas no nitrogênio líquido.

3.5 Ensaios de viabilidade celular

Para fazer a curva de dose-resposta de LPS (Sigma), foram utilizadas as concentrações de 10µg/mL, 1µg/mL, 100ng/mL e 10ng/mL, e para a curva de GPNMB (R&D) foram utilizadas as concentrações de 2.5µg/mL, 250ng/mL, 25ng/mL e 2.5ng/mL. Para este ensaio, foram plaqueadas 10^4 células de astrócitos e glia mista, 2×10^4 células de microglia e 10^3 células de BV-2 em placas de 96 poços. Após 48 horas, os poços tiveram o meio retirado e substituído por meio sem soro com o respectivo tratamento. No dia seguinte, a viabilidade e taxa de metabolismo celular foram medidas por meio dos ensaios de LDH e MTT.

O kit de detecção Cytotox96 (Promega) mede a quantidade de lactato desidrogenase (LDH) no meio. O ensaio é baseado na conversão do sal cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazólio em formazan, reação que é catalisada pelo LDH liberado. Foram pipetados 50µL do substract mix e 50µL do sobrenadante das culturas em uma placa de 96 poços, seguido de incubação por 30 minutos em abrigo da luz em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com

comprimento de onda de 490nm. A média da triplicata de cada tratamento foi calculada pelo controle positivo (considerado 100% de morte). O controle positivo consiste em células tratadas com 10% de solução de lise por poço durante 45 minutos.

No ensaio de MTT, a atividade metabólica das células é quantificada pela capacidade das células em converter o MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium brometo) em um sal violeta. A morte celular pode ser quantificada indiretamente por esse teste, já que a morte celular está relacionada com a disfunção mitocondrial. Para o teste, o meio de cultura foi retirado e foi aplicada uma solução de 12mM de MTT em meio de cultura sem soro, as quais foram incubadas por 3 horas a 37°C. Após o período de incubação, o meio foi retirado e então foi adicionado DMSO, substância que possui a capacidade de dissolver o sal violeta. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 570nm. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem do controle.

3.6 Imunofluorescência

Para verificar a separação das subpopulações celulares, assim como caracterizar as culturas celulares estudadas, foram feitos ensaios de imunofluorescência. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula na quantidade de 10^4 células/poço. Após 2 dias, as células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos. Depois, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e então foi colocado Triton x-100 0,05% por 5 minutos, para permeabilizar as células. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS novamente e incubados com soro de bloqueio (5% BSA diluído em PBS contendo 0,01% de Triton x-100) durante 1 hora. O soro de bloqueio foi retirado e os anticorpos primários foram adicionados, diluídos em soro de bloqueio de acordo com cada anticorpo, e deixados a 4°C *overnight*. Os anticorpos utilizados foram: Iba-1 (Sigma-Aldrich ou ProteinTech), na concentração de 1:400 e G-FAP (Cell Signaling), na concentração de 1:1000).

No dia seguinte, os anticorpos primários foram retirados e as células foram lavadas 3 vezes com soro de bloqueio. Então, o anticorpo secundário foi adicionado, diluído 1:1000 em PBS com triton x-100 0,01% por 2 horas protegido da luz. Os

anticorpos secundários utilizados foram: Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse IgG (A21202, ThermoFisher Scientific), Alexa Fluor 594 Donkey anti-Rabbit IgG (A21207, ThermoFisher Scientific), Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rat IgG (A21208, ThermoFisher Scientific), Alexa Fluor 488 Donkey anti-Rabbit IgG (A21206, ThermoFisher Scientific) e Alexa Fluor 594 Donkey anti-Mouse IgG (R37115, Invitrogen). Depois, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com DAPI (1:50000) por 10 minutos. O DAPI foi retirado e as células foram lavadas novamente por 2 vezes com PBS. Então, as lamínulas foram colocadas em uma lâmina retangular de vidro com ImmuMount (ThermoFisher Scientific). Após sua secagem, elas foram observadas em microscópio óptico. Foram realizadas duplicatas de cada lâmina por experimento. Foram analisados 3 campos por lâmina por experimento.

3.7 Ensaio ELISA

Os níveis de TNF- α nos meios de cultura dos diferentes tipos celulares foram avaliados pelo kit de ELISA para TNF- α (eBioscience). No dia anterior ao ensaio, foi realizado o “*coating*” da placa, o que consiste em incubar o anticorpo de captura a 4°C. No dia do ensaio, o anticorpo de captura foi retirado, a placa foi lavada 3 vezes com Wash Buffer e bloqueada com o reagente de diluição por 1 hora. A placa foi novamente lavada 3 vezes e 50 μ L das amostras foram adicionadas diluídas em 50 μ L de reagente de diluição, juntamente com a curva-padrão. Após 2 horas de incubação, a placa foi lavada 3 vezes e foi adicionado o anticorpo de detecção por 2 horas em temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi novamente lavada 3 vezes com Wash Buffer.

Foi adicionado Streptavidin-HRP B por 20 minutos em abrigo da luz (o que se manteve até o fim do experimento). A placa foi lavada por mais 3 vezes e então foi adicionado o reagente de cor à placa por 20 minutos. Ao fim, a solução de parada foi adicionada e a densidade óptica do teste foi medida em um espectrofotômetro com comprimentos de onda de 450nm e 570nm. Os valores resultantes da leitura em comprimento de onda de 570nm foram subtraídos daqueles resultantes da leitura em 450nm e a análise do teste foi realizada. As concentrações de citocinas foram determinadas a partir de uma curva-padrão.

3.8 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

As células foram previamente plaqueadas em placas de 6 poços, na concentração de 5×10^5 e mantidas em meio de cultivo até atingirem confluência superior a 70%, e então foram tratadas. Após o tratamento, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado aos poços 1mL de solução de lise (HEPES 10mM, $MgCl_2$ 1,5mM, KCl 10mM, EDTA 0,1mM, PMSF 0,5mM, Leupeptina 2 μ g/mL, Antipaína 2 μ g/mL, Ortovanadato de Sódio 2 μ g/mL, NaF 30mM, B-GP 5mM, Pirofosfato de Sódio 20mM). As células foram descoladas do fundo do poço com o auxílio de um cell scraper. Após a obtenção das células suspensas em tampão de lise, a solução foi transferida a um tubo que foi posteriormente centrifugado a 12.000g por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi ressuspensionado com 400 μ L de tampão de lise. O homogeneizado retornou a centrifuga por mais 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi ressuspensionado com 50 μ L de tampão de lise durante 15 minutos no gelo. Após incubação no gelo, foi adicionado NP40 0,5% às amostras, que foram vigorosamente agitadas por 30 segundos com o auxílio de um vórtex e então centrifugadas a 12.000g por 30 segundos a 4°C. O sobrenadante, que é o extrato citosólico, foi recolhido para dosagem de proteínas e preparo da amostra para o ensaio de Western Blotting.

3.9 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada seguindo o método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando o reagente BioRad Protein Assay (BioRad). A concentração de proteínas presentes na amostra foi comparada a de uma curva padronizada de concentração de albumina (BioRad Protein Assay Standard). A medida de absorvância foi lida no comprimento de onda de 595nm no leitor de microplacas (Asys UVM 340).

3.10 Western Blotting

O protocolo utilizado foi adaptado de Laemmli (1970). As expressões de proteínas avaliadas pelo ensaio de Western Blotting foram: AKT (#4685S, 11E7, Cell Signaling), pAKT (#4060S, D9E, Cell Signaling), ERK (#05-1152, Millipore), pERK (#4695S, 137F5, Cell Signaling), p65 (51-0500, Invitrogen) e α -tubulina (#2125S, 11H10, Cell Signaling).

As amostras foram preparadas e ajustadas para uma mesma concentração, com a adição do volume necessário de extrato citosólico, água milliQ e tampão Laemmli. A solução foi agitada por 5 minutos a 95°C e colocada em gelo logo em seguida. 10 μ g de proteína foram aplicados ao gel de SDS-poliacrilamida 10%, juntamente com um poço de padrão de peso molecular (Sinapse Inc.). O gel foi colocado na cuba de corrida de eletroforese, juntamente com o tampão de corrida (Tris-base 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%). A corrida das proteínas no gel teve a voltagem fixada em 90V e duração de aproximadamente 2 horas. Após a corrida, o gel de poliácridamida foi retirado da cuba de corrida e colocado na cuba de transferência, em contato direto com uma membrana de nitrocelulose (BioRad). Juntamente com o tampão de transferência (Tris-base 25mM, Glicina 192mM, Etanol 20%) gelado, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para a membrana de nitrocelulose uma por aproximadamente 90 minutos com a amperagem fixada em 400mA.

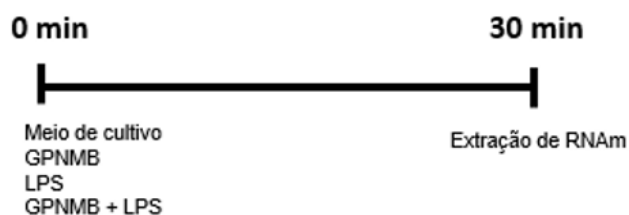
Após a transferência das proteínas, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (Ponceau-S 0,5%, Ácido tricloroacético 5%) sob agitação para verificar a eficácia da transferência, sendo que excesso de corante foi retirado. Então, as membranas foram incubadas durante pelo menos 1 hora com solução de BSA 5%, diluído em TTBS (Tris-base 100mM, NaCl 0,9%, Tween 20 0,05%), para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos. Em sequência, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário desejado diluído em BSA 1% diluído em TTBS a 4°C *overnight*. No dia seguinte, as membranas passaram por 3 lavagens com TTBS com a duração de 5 minutos cada e, em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário correspondente ao primário por 2 horas. Ao fim da incubação, as membranas foram novamente lavadas com TTBS 3 vezes durante 5 minutos por

lavagem. A revelação ocorreu com o auxílio de um reagente quimioluminescente ECL (Millipore) e o fotodocumentador G-Box (Syngene/Synoptics). As quantificações da intensidade das bandas das moléculas de interesse foram normalizadas em relação à α -tubulina a partir do extrato citosólico das células tratadas.

3.11 Extração de RNA

Para a realização do ensaio de RT-PCR, foram realizados dois tipos de tratamentos: o co-tratamento com GPNMB e LPS e o pré-tratamento com GPNMB seguido de um desafio com LPS (Figura 4). No co-tratamento, as células de cultura primária de glia mista e da linhagem BV-2 foram tratadas com GPNMB (na concentração de 2,5 μ g/mL para células da linhagem BV-2 e 25ng/mL para as células de glia mista), LPS (1 μ g/mL) ou o GPNMB e LPS foram administrados concomitantemente, todos os tratamentos duraram 30 minutos. No pré-tratamento, as células primárias de glia mista foram tratadas com GPNMB (25ng/mL) durante 1 hora, LPS (1 μ g/mL) por 30 minutos ou GPNMB durante 30 minutos e, em seguida, desafiadas com LPS por 30 minutos.

Co-tratamento



Pré-tratamento



Figura 4. Representação esquemática do tratamento utilizado para o ensaio de RT-PCR. Linha do tempo de como o co- e pré-tratamento de GPNMB e LPS foram realizados, com o tempo em que cada substância foi administrada.

O RNAm das células foi extraído e isolado com o auxílio de um kit de extração PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific). Quando as células estavam confluentes, o meio de cultivo foi retirado e foi acrescentado a cada poço 600µL de tampão de lise (parte do kit) acrescido de 1% de mercaptoetanol, de acordo com as instruções do kit. O lisado foi posteriormente transferido a um tubo livre de RNase e DNase e agitado com o auxílio de um vórtex. Depois, foi utilizado um rotor elétrico para maior homogeneização das amostras, que foram agitadas por 45 segundos e centrifugadas a 13.000g por 2 minutos em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, foi acrescentado 600µL de etanol 70% a cada tubo contendo o lisado de células. As amostras foram novamente agitadas com o auxílio de um vórtex e 700µL do homogenato foi transferido a tubos contendo uma coluna de sílica. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 segundos a temperatura ambiente, e o restante do homogenato que passou pela coluna foi descartado. Esse passo foi repetido até que toda a amostra fosse processada.

Após toda a amostra ter sido processada, foi acrescentado 700µL de Wash Buffer I ao tubo contendo a coluna de sílica. O tubo foi centrifugado a 12.000g por 15 segundos a temperatura ambiente, e o líquido que passou pela coluna foi descartado. Depois, foi acrescentado 500µL de Wash Buffer II ao tubo contendo a coluna. O tubo foi novamente centrifugado a 12.000g por 15 segundos a temperatura ambiente, e o líquido que passou pela coluna foi descartado. Este passo de adição de Wash Buffer II e centrifugação foi repetido mais uma vez. Depois do segundo descarte do líquido restante da centrifugação, o tubo foi centrifugado a 12.000g por 2 minutos para secar a coluna completamente.

Por fim, foi acrescentado 30µL de água livre de RNase ao tubo contendo a coluna de sílica. O tubo foi mantido por 1 minuto em temperatura ambiente antes de ser centrifugado a 13.000g por 2 minutos em temperatura ambiente. Neste ponto, o RNA foi eluído da coluna. O RNA isolado resultante desta extração foi quantificado e avaliado em parâmetros de pureza no equipamento e software NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific).

3.12 Transformação de RNA em cDNA

A fim de realizarmos RT-PCR para a quantificação da transcrição de moléculas inflamatórias após o tratamento, o RNA de cada amostra foi transformado em DNA complementar (cDNA). Primeiramente, 1µg de RNA foi acrescentado a um tubo, juntamente com água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) (água tratada para inativar a enzima RNase) até completar o volume de 8µL. Juntamente ao RNA e água DEPC, foi acrescentado 1µL de DNase e tampão de DNase contendo MgCl₂ (ThermoFisher Scientific). Essa mistura foi agitada com o auxílio de um vórtex e colocada no termociclador na temperatura de 37°C por 30 minutos.

Após a incubação, 1µL de EDTA 50mM foi adicionado a cada tubo e as amostras retornaram ao termociclador a 65°C por 10 minutos. Depois, 1µL de oligo dT e 1µL de dNTP mix (Invitrogen) foram adicionados às amostras. Os tubos foram agitados com o auxílio de um vórtex e retornaram ao termociclador a 65°C por 5 minutos. Depois de aquecidas, as amostras foram incubadas no gelo por pelo menos 1 minuto.

Um mix contendo 1µL da transcriptase reversa SuperScript™ IV (ThermoFisher Scientific), 4µL de tampão 5x SuperScript™ IV, 1µL de DTT 100mM e 1µL de inibidor de RNase (Life Technologies) foi adicionado a cada tubo. As amostras foram novamente agitadas com o auxílio de um vórtex e retornaram ao termociclador para um ciclo de 55°C por 10 minutos, seguido de um ciclo de 80°C por mais 10 minutos. Neste ponto, o RNA foi convertido em cDNA e as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.13 PCR

Para todos os genes estudados, inicialmente foi feito um mix com todos os componentes das reações. Para o gene GAPDH, o mix consiste em: 15,75µL de água DEPC, 200µM de dNTP, 2,5µL de tampão de reação 10x sem Mg⁺², 200nM de primer sense, 200nM de primer antisense, 1,5mM de MgCl₂ e 1µL de Platinum™ Taq Polimerase (Invitrogen) por tubo para 2µL de cDNA. Para todos os outros genes avaliados (TNF-α, IL-1β e IL-10), o mix consiste em: 8,4µL de água DEPC, 200µM de

dNTP, 1,25 μ L de tampão de reação 10x sem Mg⁺², 200nM de primer sense, 200nM de primer antisense, 2mM de MgCl₂ e 0,1 μ L de Platinum™ Taq Polimerase por tubo para cada 1 μ L de cDNA.

O gene GAPDH foi utilizado como marcador endógeno para amostras de rato (cultura primária) e camundongo (células da linhagem BV-2). A expressão dos genes TNF- α e IL-1 β foram avaliadas como parâmetros pró-inflamatórios. A expressão do gene de IL-10 foi avaliada como parâmetro anti-inflamatório. Os mesmos primers foram utilizados para avaliar a sequência no cDNA de rato e de camundongo para os genes GAPDH, TNF- α e IL-10, porém foram utilizados primers específicos para cada espécie para o gene IL-1 β (tabela 1). As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos antes de passarem por seus ciclos de temperatura correspondentes (tabela 1). Ao final dos ciclos, as amostras ficaram a 72°C durante 10 minutos.

Gene	Sentido	Sequência	Ciclos
GAPDH	sense	5'-GCCAAGTATGATGACATCAAGAAG-3'	30 ciclos 45s a 95°C 45s a 60°C 90s a 72°C
	antisense	5'-TCCAGGGGTTTCTTACTCCTTGGGA-3'	
TNF- α	sense	5'-GTCGTAGCAAACCACCAAGC-3'	35 ciclos 45s a 95°C 45s a 60°C 90s a 72°C
	antisense	5'-GGGGAGAAATCGATGACAGC-3'	
IL-1 β camundongo	sense	5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3'	25 ciclos 45s a 95°C 45s a 60°C 90s a 72°C
	antisense	5'-GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'	
IL-1 β rato	sense	5'-GAGCGGATGAAGGTAAAGCG-3'	25 ciclos 45s a 95°C 45s a 60°C 90s a 72°C
	antisense	5'-GACCCTGCAAGATGCAAGCC-3'	
IL-10	sense	5'-GCAGGACTTTAAGGGTTACTTGG-3	45 ciclos 45s a 95°C 45s a 63°C 90s a 72°C
	antisense	5'-GGGGAGAAATCGATGACAGC-3'	

Tabela 1. Informações sobre os primers para PCR. Primers utilizados para realização de PCR, com suas sequências correspondentes, quantidade de ciclos, temperaturas e tempo de cada temperatura utilizados para a amplificação dos genes.

O resultado da amplificação foi aplicado em um gel de agarose para separação eletroforética. Primeiramente, foi preparado um gel de agarose a 2% diluído em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). As amostras foram preparadas da seguinte maneira: 12 μ L do resultado da reação de PCR, 1,5 μ L de BlueJuice 10x (ThermoFisher Scientific) e 1,5 μ L de GelRed (ThermoFisher Scientific). 7,5 μ L de amostra foi adicionada a cada poço do gel, juntamente com um poço contendo 5 μ L de um marcador de pares de base 100pb (ThermoFisher Scientific). A corrida eletroforética teve voltagem fixada em 100V e duração aproximada de 1 hora. Após a corrida, as bandas foram visualizadas com o auxílio do fotodocumentador G-Box (Syngene/Synoptics).

3.14 Análise de resultados

Os dados decorrentes do ensaio de MTT, LDH e ELISA foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. Os outliers detectados pelo programa estatístico GraphPad Prism 8 foram desconsiderados das análises. Os dados decorrentes do ensaio de Imunofluorescência foram adquiridos pelo software NIS-Elements AR 4.6 (Nikon), quantificados pelo software NIS-Elements AR Analysis 4.6 (Nikon) e pelo programa ImageJ (National Institute of Health, EUA), e analisados por ANOVA de uma via. As imagens resultantes dos ensaios de Western Blotting e PCR foram quantificadas pelo programa ImageJ e analisadas por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls.

Para todas as análises estatísticas, as diferenças consideradas significativas foram valores $p \leq 0,05$. Todos os dados foram analisados no software Prism 8 (GraphPad) e representados como a média dos valores \pm erro padrão da média. Os gráficos foram também montados no software GraphPad Prism 8.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade das células de cultura primária de microglia e astrócitos - adultos

O número de células obtidas pela separação por beads magnéticas foi baixo (cerca de 10^5 células por cérebro adulto). Além disso, as células obtidas não são viáveis, tanto em astrócitos como em microglia, como mostrado pelo teste de viabilidade celular por liberação de LDH (Figura 5). As células do grupo controle possuem morte igual ao grupo controle positivo, mostrando que houve grande morte celular por esse método de separação. Não foi realizada análise estatística dos dados, pois o ensaio foi realizado apenas 2 vezes, mas foi suficiente para mostrar que a extração utilizada não seria adequada para os experimentos que nós planejamos realizar durante o projeto.

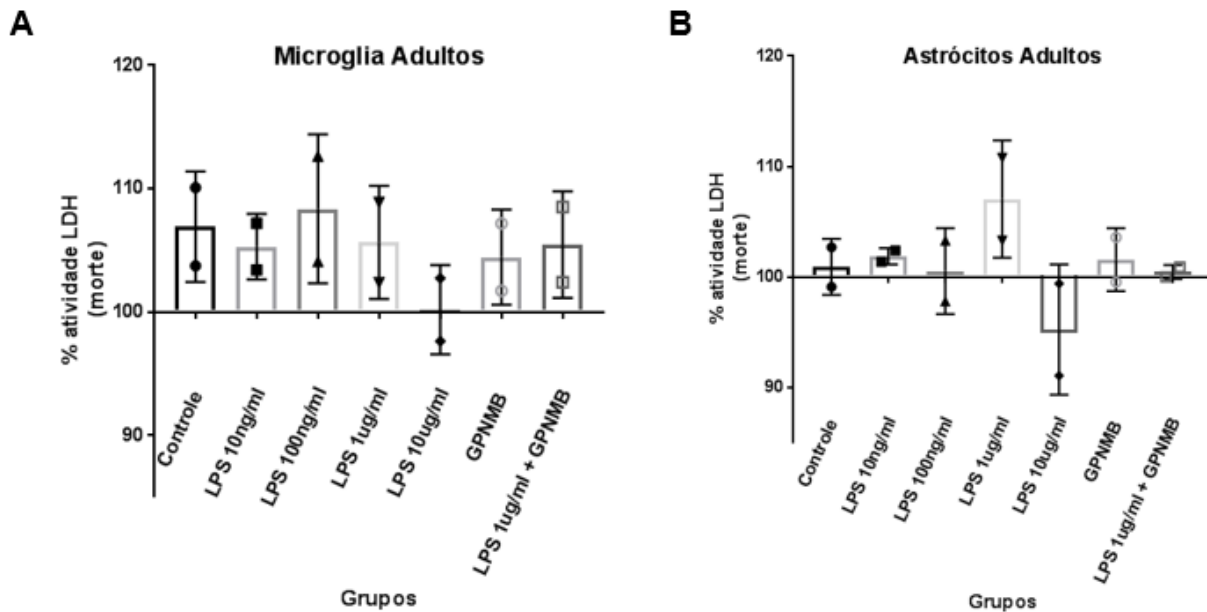


Figura 5. Atividade de LDH em células separadas por MicroBeads. Teste de atividade de LDH em células de microglia (A) e astrócitos (B) de ratos adultos que passaram pelo procedimento de separação por MicroBeads. Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas. Todos os grupos estudados apresentaram morte celular próxima a 100%, incluindo o grupo controle, o que invalida essas células para o uso em experimentos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. $n = 2$

4.2 Caracterização das Culturas Celulares Primárias

Foi realizado o ensaio de imunofluorescência para verificar a identidade celular de cada cultura. Para isso, foram utilizados os anticorpos GFAP, Iba-1 e DAPI, para marcar astrócitos, microglia e núcleo, respectivamente. A cultura de astrócitos se constitui, em média, em 91% de astrócitos, 2% de microglia e 7% de outros tipos celulares não identificados (Figura 6 e 9B). A cultura de microglia se constitui, em média, em 86% de microglia, 3% de astrócitos e 11% de outros tipos celulares não identificados (Figura 7 e 9C). A cultura de glia mista se constitui, em média, em 55% de astrócitos, 40% de microglia e 5% de outros tipos celulares não identificados (Figura 8 e 9A). As células que não foram marcadas por GFAP ou Iba-1 podem ser oligodendrócitos ou outras células presentes no SNC. A quantificação dos resultados das marcações por imunofluorescência estão representados na Figura 9.

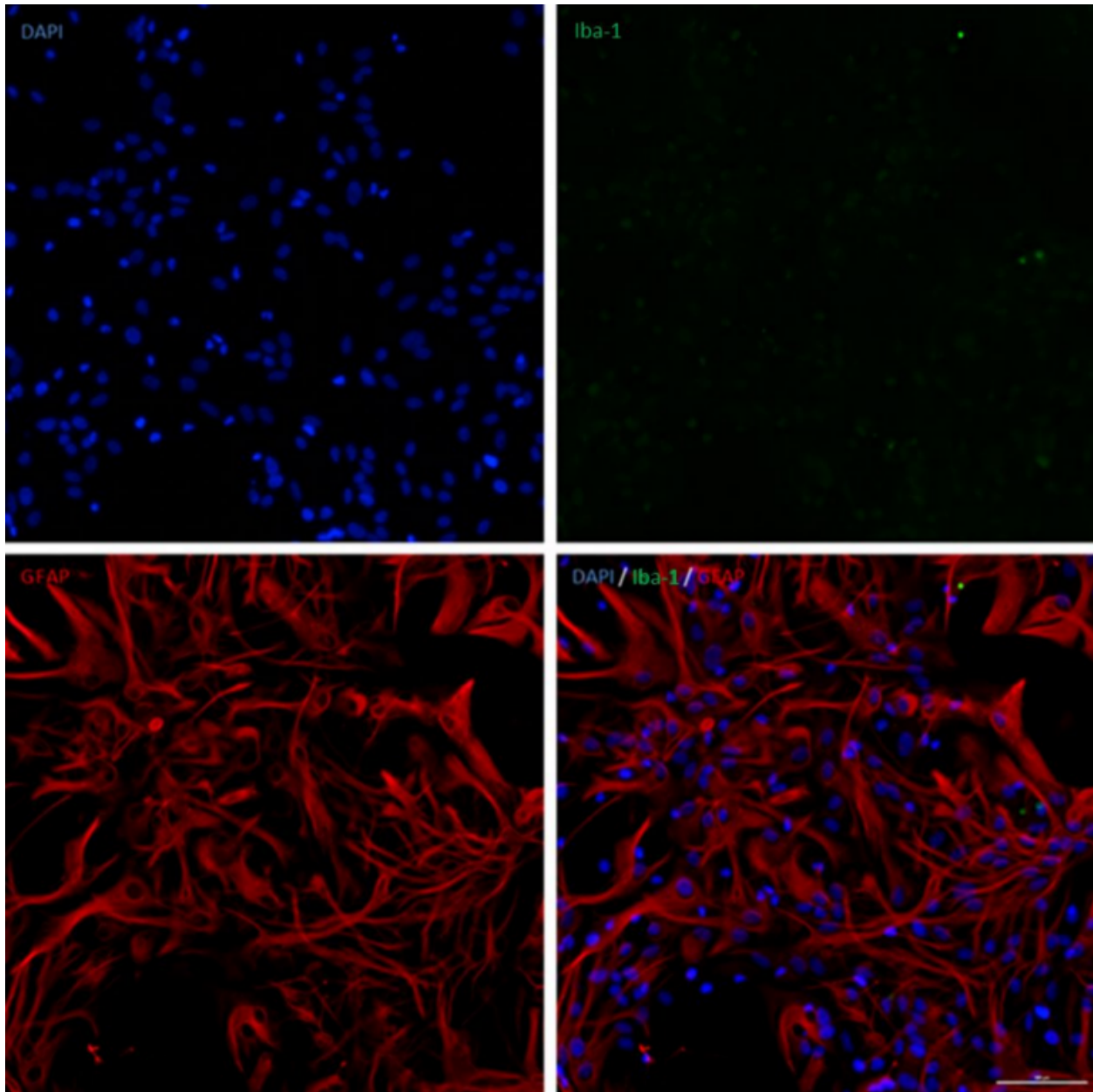


Figura 6. Fotomicrografias de ensaio de imunofluorescência de células primárias de astrócitos. Células primárias provenientes do córtex de ratos neonatos foram cultivadas para a obtenção de células de glia mista e submetidas à separação mecânica. Como resultado, observamos a separação da fração das células de astrócitos. Marcação em azul: DAPI (núcleos); marcação em verde: Iba-1 (microglia); marcação em vermelho: GFAP (astrócitos). A última imagem é resultado da sobreposição das outras 3. O resultado corresponde a 3 experimentos independentes. Escala: 1cm = 500µm

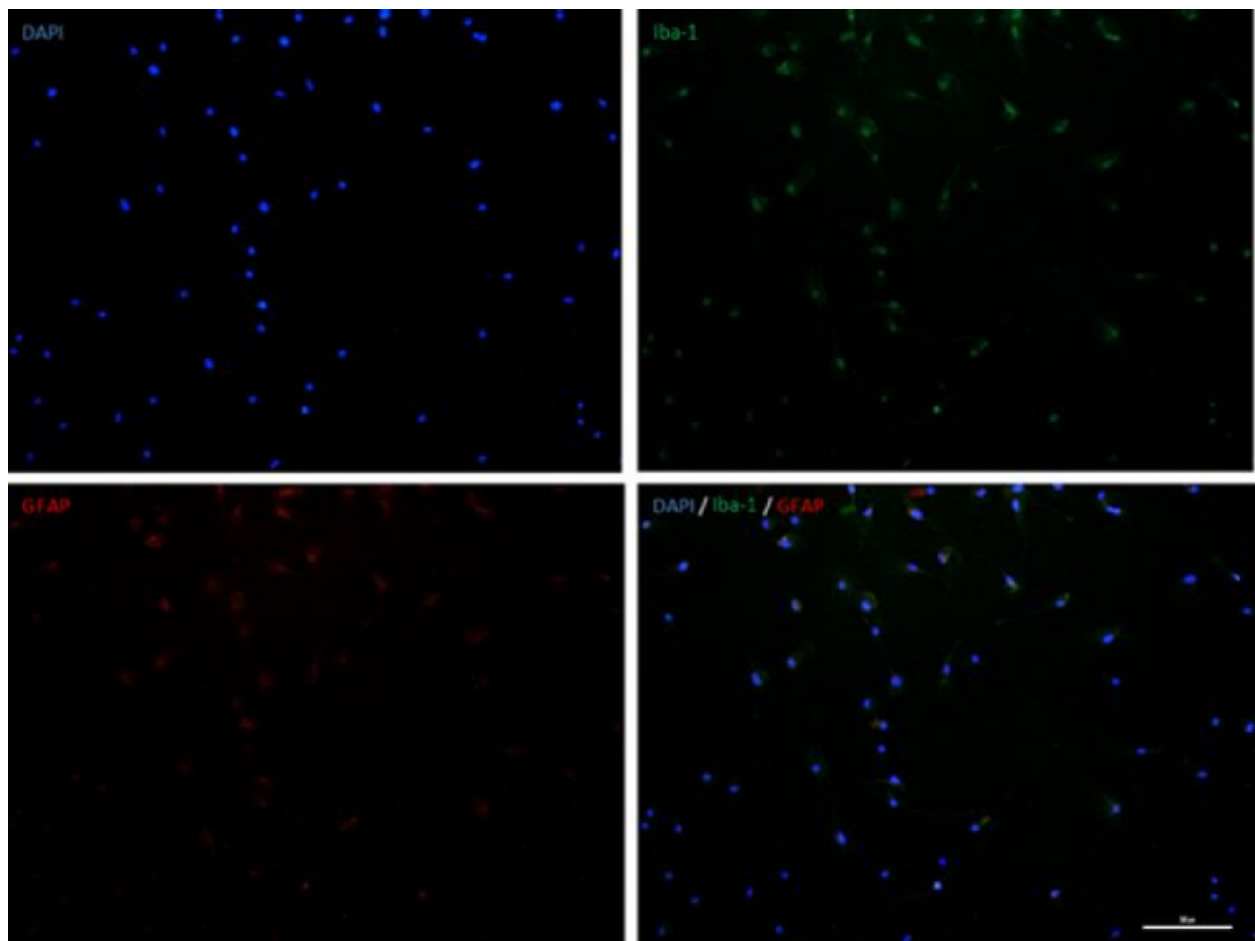


Figura 7. Fotomicrografias do ensaio de imunofluorescência de células primárias de microglia. Células primárias provenientes do córtex de ratos neonatos foram cultivadas para a obtenção de células de glia mista e submetidas à separação mecânica. Como resultado, observamos a separação da fração das células de microglia. Marcação em azul: DAPI (núcleos); marcação em verde: Iba-1 (microglia); marcação em vermelho: GFAP (astrócitos). A última imagem é resultado da sobreposição das outras 3. O resultado corresponde a 3 experimentos independentes. Escala: 1cm = 500µm

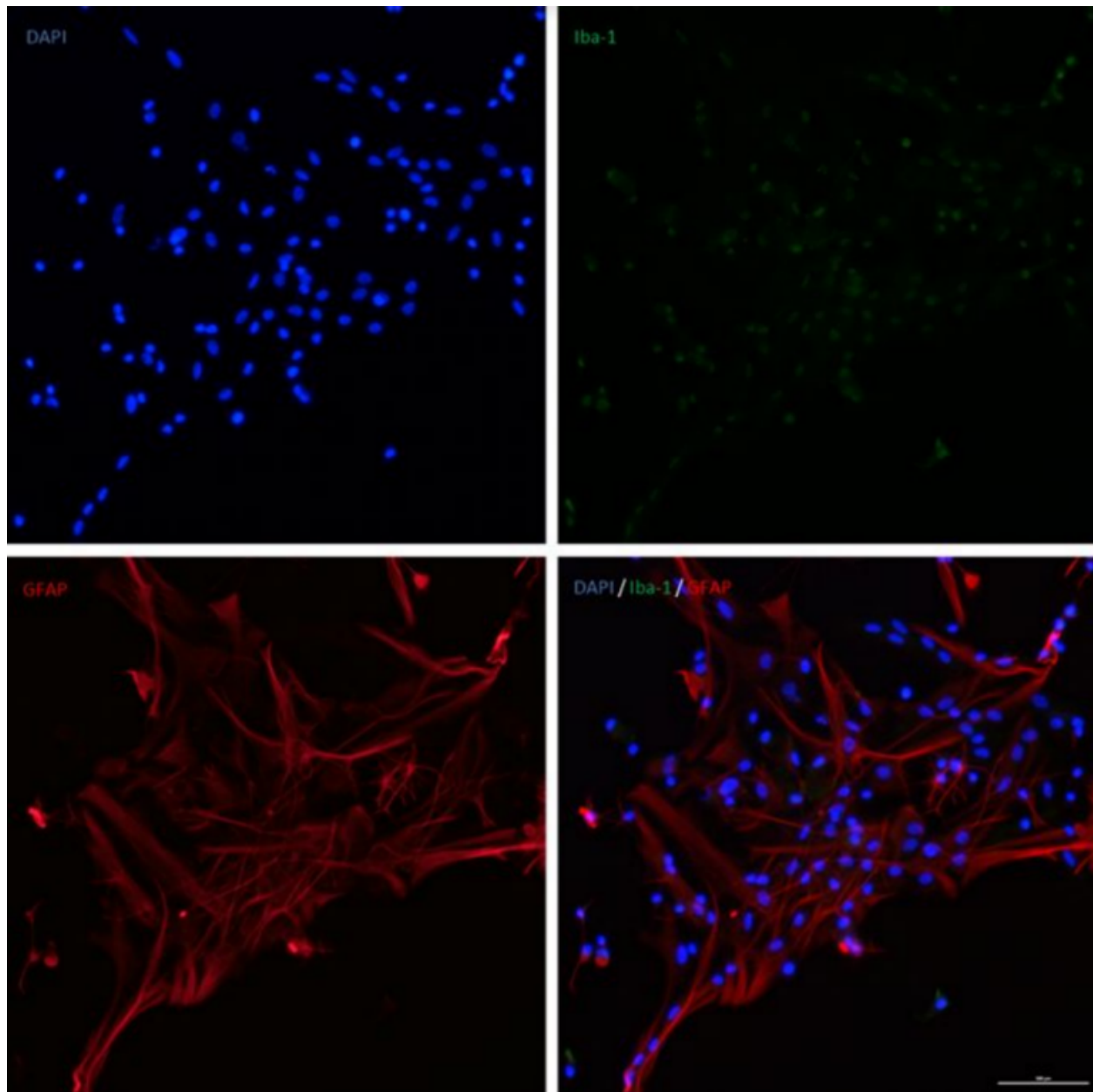


Figura 8. Fotomicrografias de ensaio de imunofluorescência de células primárias da glia (mista). Células primárias provenientes do córtex de ratos neonatos foram cultivadas para a obtenção de células de glia mista, sem serem submetidas à separação mecânica. Marcação em azul: DAPI (núcleos); marcação em verde: Iba-1 (microglia); marcação em vermelho: GFAP (astrócitos). A última imagem é resultado da sobreposição das outras 3. O resultado corresponde a 3 experimentos independentes. Escala: 1cm = 500 μ m

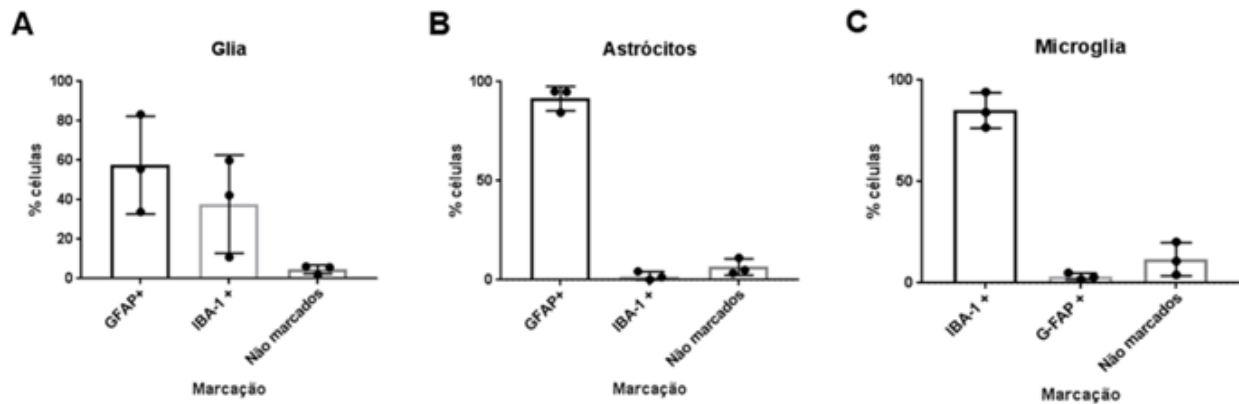


Figura 9. Quantificação dos tipos celulares encontrados após separação mecânica. Caracterização dos diferentes tipos celulares na cultura mista de glia, astrócitos isolados e microglia isolados. GFAP representa a marcação para astrócitos e Iba-1 representa a marcação para microglia. (A) representa a constituição da cultura de glia mista, que é de, em média, em 55% de astrócitos, 40% de microglia e 5% de outros tipos celulares não identificados. (B) representa a constituição da cultura de astrócitos, que é de, em média, em 91% de astrócitos, 2% de microglia e 7% de outros tipos celulares não identificados. (C) representa a constituição da cultura de microglia, que é de, em média, em 86% de microglia, 3% de astrócitos e 11% de outros tipos celulares não identificados. As células que não foram marcadas por GFAP ou Iba-1 podem ser oligodendrócitos ou outras células presentes no SNC. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. $n = 3$.

4.3 Ensaios de viabilidade

4.3.1 Curva de viabilidade celular do LPS

Foi feita uma curva de resposta à toxicidade do LPS (Figura 10). O LPS foi utilizado em diferentes concentrações para avaliar qual seria a melhor concentração a ser utilizada neste estudo para todos os tipos celulares. Apenas o tratamento nas células de cultura primária de microglia com LPS na concentração de 10 μ g/mL apresentou um aumento na atividade de LDH em comparação com o grupo controle (Figura 10A). Após o teste, a concentração de 1 μ g/mL foi escolhida, por não causar um aumento significativo da lise celular em nenhum dos grupos estudados e ser uma concentração bastante utilizada em cultura celular (Kinoshita et al., 2017; Isaac et al., 2017; Lynch et al., 2010).

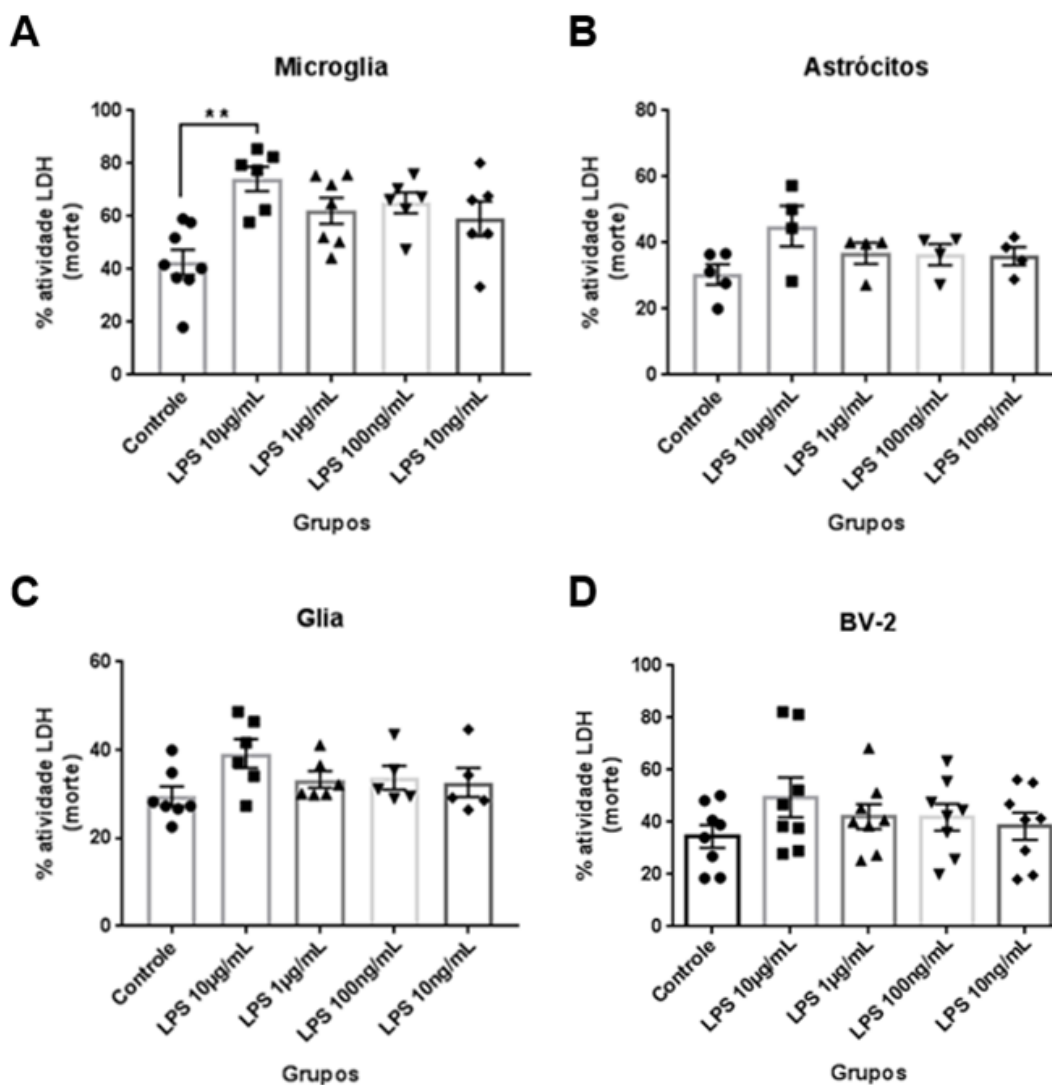


Figura 10. Curva de atividade de LDH em resposta ao tratamento com LPS. Porcentagem de lise celular em diferentes concentrações de LPS por 24 horas de tratamento. Foi visto que em células de cultura primária de microglia isolada a concentração de 10µg/mL foi capaz de aumentar significativamente a atividade do LDH (A), o que não foi visto nos outros tipos celulares. Em nenhuma outra concentração, em nenhum outro tipo celular, foi vista diferença significativa entre os tratamentos (B, C e D). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia, glia mista e BV-2 = 6; n astrócitos = 4. * $p < 0.05$.

A modulação do metabolismo pelo LPS em diferentes concentrações foi observada (Figura 11) sendo que o LPS parece diminuir a resposta metabólica da célula principalmente em concentrações mais altas. Nas células de cultura primária, este efeito está mais acentuado nas células isoladas (tanto de microglia quanto de astrócitos) (Figuras 11A e 11B). Além da falta de interação das células com outros tipos celulares, o método de separação utilizado (que necessita que as células fiquem algum

tempo em garrafas fechadas sem a troca gasosa com o meio), pode ter interferido neste e em todos os resultados de avaliação do metabolismo. Porém, na linhagem celular BV-2, a diminuição do metabolismo induzido por LPS também é observado na concentração de LPS 10µg/mL (Figura 11D), o que sugere que essa diminuição na atividade metabólica está realmente relacionada ao isolamento do tipo celular ou à necessidade da interação entre microglia e o astrócito.

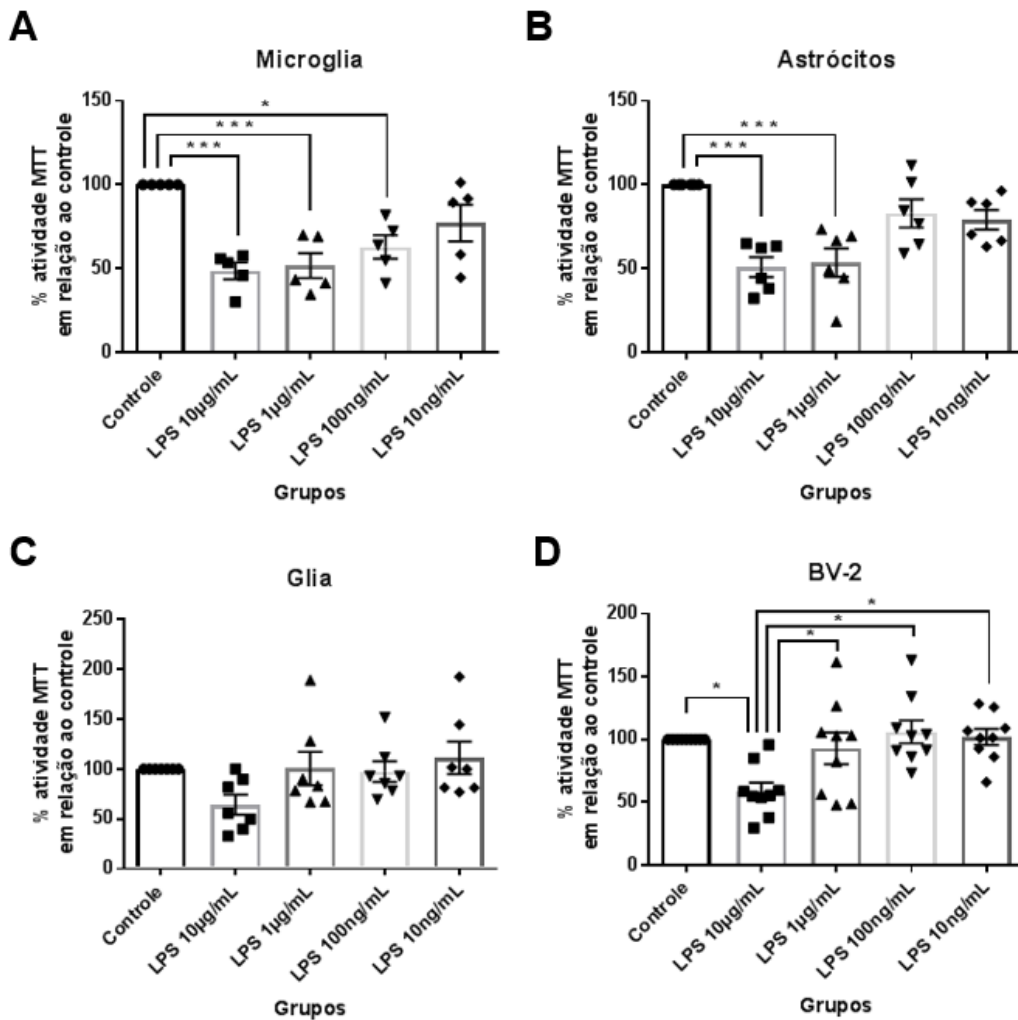


Figura 11. Curva de atividade de MTT em resposta ao tratamento com LPS. Porcentagem de mudança do nível de metabolismo celular em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de LPS por 24 horas de tratamento. O LPS parece diminuir a resposta metabólica das células, especialmente em concentrações mais altas, nas células isoladas de cultura primária de microglia, astrócitos e na linhagem celular BV-2 (respectivamente A, B e D), mas não em células de cultura primária de glia mista (C). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia = 5, n astrócitos e glia mista = 6, n BV-2 = 8. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.3.2 Curva de viabilidade celular do GPNMB

Foi feita uma curva de resposta à toxicidade do tratamento com GPNMB (Figura 12), a fim de verificar se ele promove morte celular. O tratamento com GPNMB, nas concentrações escolhidas (entre 2,5 μ g/mL e 25ng/mL) não parece diminuir a viabilidade celular nos tipos celulares estudados, o que torna as concentrações estudadas seguras. Portanto, as concentrações escolhidas para o GPNMB foram escolhidas com base em estudos anteriores na literatura: 2,5 μ g/mL para linhagem celular (Ono et al, 2012b, Tanaka et al, 2012) e 25ng/mL para células de cultura primária (Neal et al, 2018).

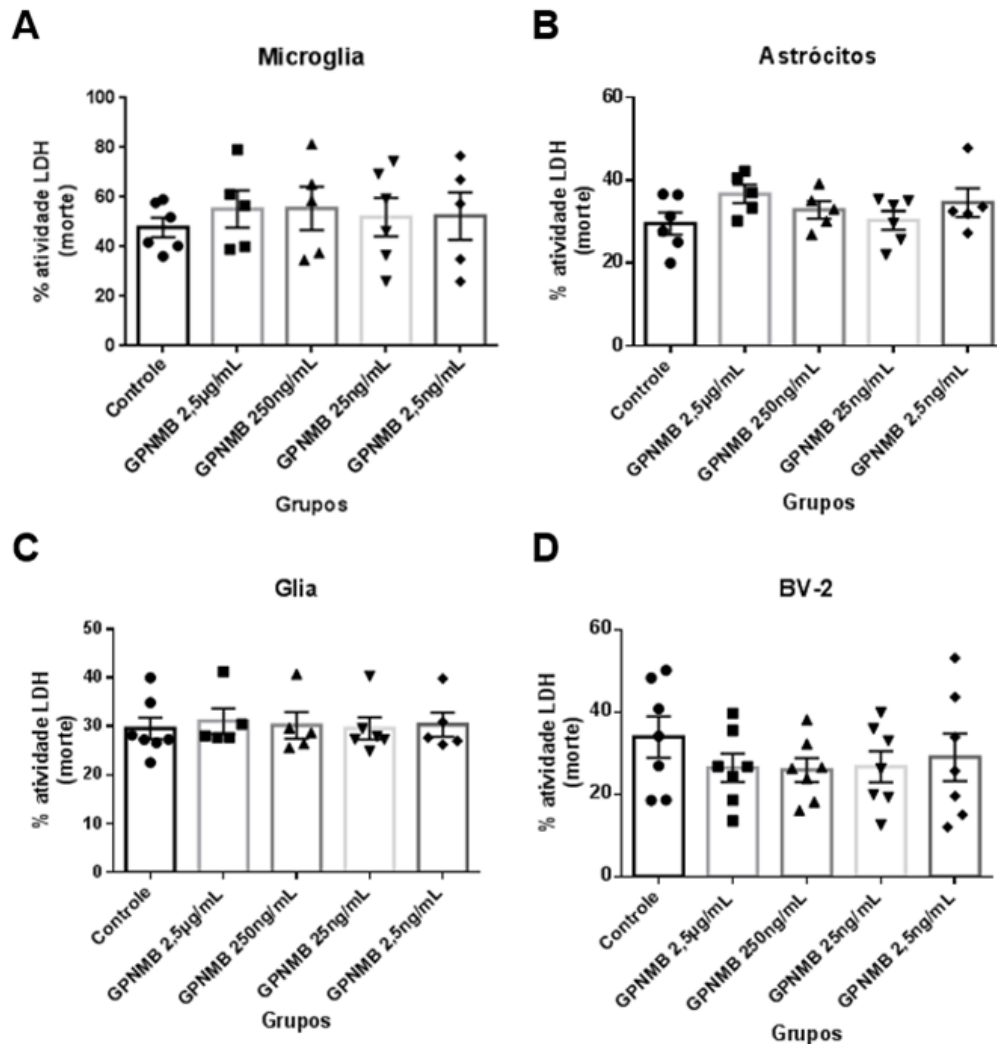


Figura 12. Curva de atividade de LDH em resposta ao tratamento com GPNMB. Porcentagem de lise celular em diferentes concentrações de GPNMB por 24 horas de tratamento. Em nenhuma concentração, em nenhum grupo, foi vista diferença significativa na atividade do LDH entre os tratamentos (A, B, C e D). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna

representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia e BV-2 = 6; n astrócitos e glia mista = 4.

Foi feita uma curva para verificar se há modulação do metabolismo pela GPNMB (Figura 13). O GPNMB não parece modular, em nenhuma concentração escolhida, a resposta metabólica das células estudadas.

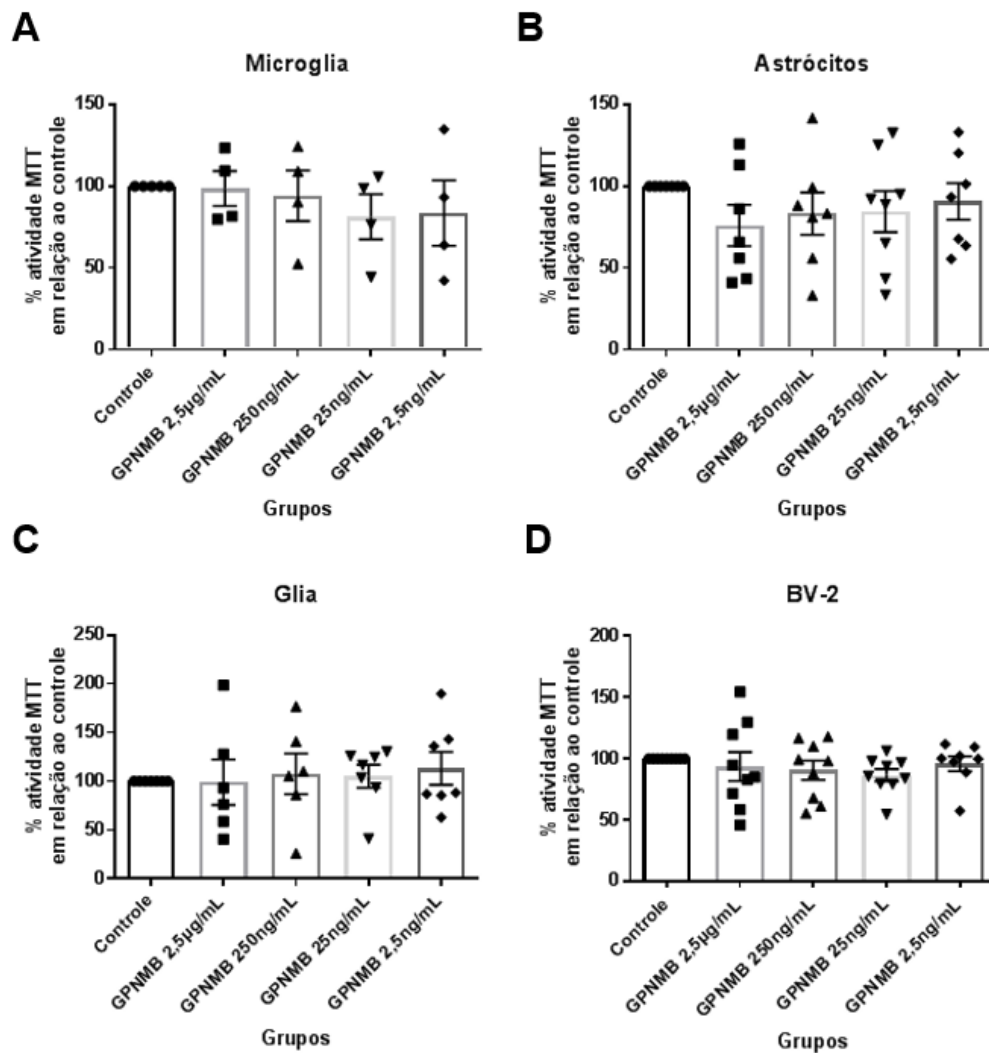


Figura 13. Curva de atividade de MTT em resposta ao tratamento com GPNMB. Porcentagem de mudança do nível de metabolismo celular em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de LPS por 24 horas de tratamento. Em nenhuma concentração, em nenhum grupo, foi vista diferença significativa na atividade de MTT entre os tratamentos (A, B, C e D). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia = 4, n astrócitos e glia mista = 6, n BV-2 = 9

4.3.3 Curva de viabilidade celular do co-tratamento de LPS e GPNMB

Foram realizados testes para verificar se a associação da GPNMB com o LPS poderia alterar a viabilidade celular (Figura 14). Para isso, foram feitos tratamentos concomitantes, por 24 horas de ambas as substâncias. Em células primárias de microglia, a combinação de LPS 1µg/mL + GPNMB 2,5µg/mL parece potencializar a morte celular em relação aos outros grupos (Figura 14A), embora os grupos com o tratamento isolado (apresentados nas Figuras 10 e 12) não apresentaram diferença significativa de toxicidade. Nos outros grupos não houve diferença significativa entre nenhum tratamento estudado.

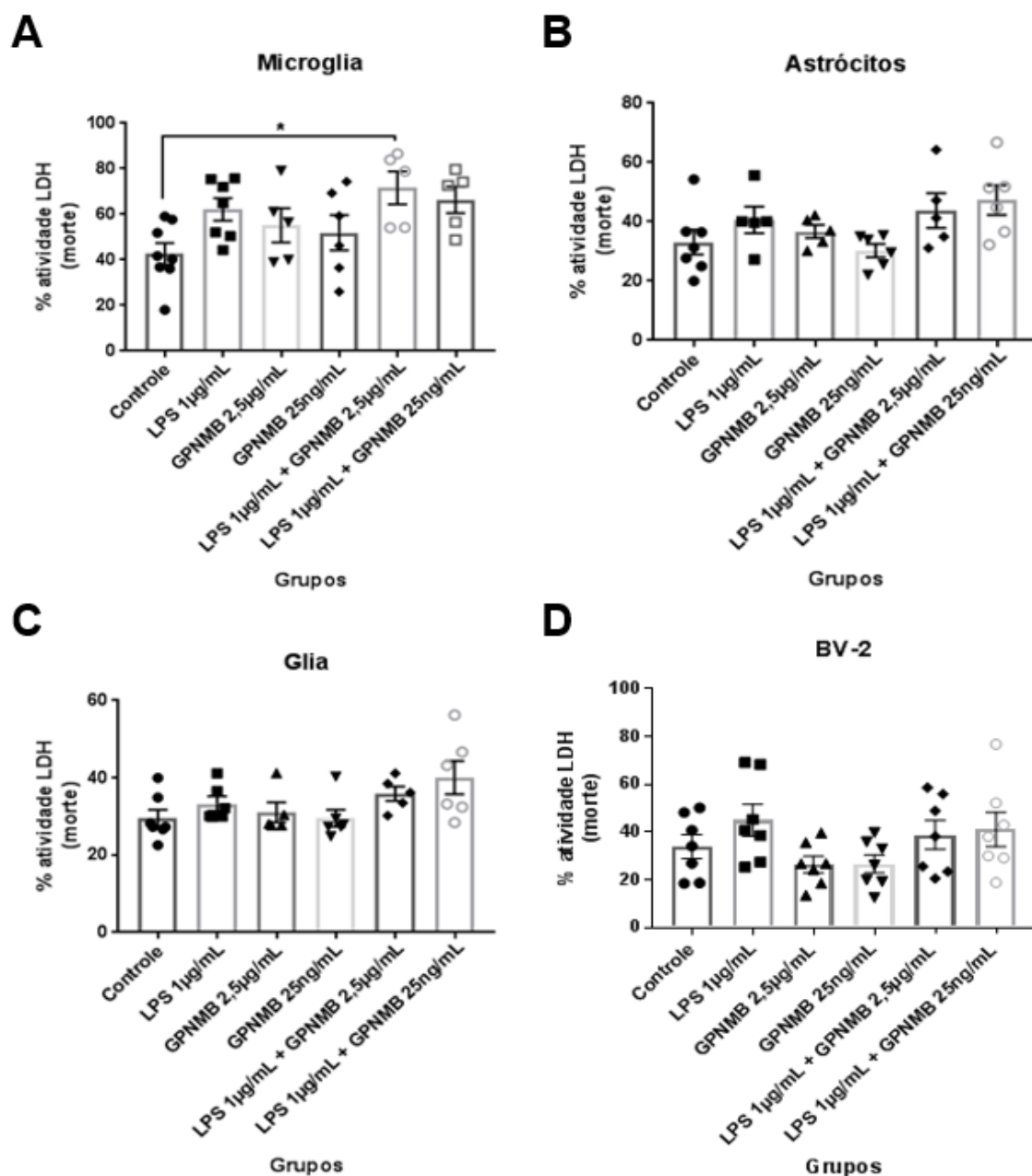


Figura 14. Atividade de LDH em resposta ao co-tratamento de LPS e GPNMB. Foi visto que em células de cultura primária de microglia isolada o tratamento concomitante com LPS 1µg/mL + GPNMB 2,5µg/mL durante 24 horas foi capaz de aumentar significativamente a atividade do LDH (A), o que não foi visto nos outros tipos celulares. Em nenhuma outra concentração, em nenhum grupo, foi vista diferença significativa entre os tratamentos (B, C e D). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia, astrócitos e glia mista = 6, n BV-2 = 7. * p<0.05

O mesmo tratamento foi utilizado para observar se a associação da GPNMB com o LPS poderia alterar a resposta metabólica (Figura 15). Em células da microglia, os tratamentos de LPS 1µg/mL e de LPS 1µg/mL + GPNMB 2,5µg/mL diminuem o

metabolismo celular em relação ao controle, sendo que o grupo tratado com LPS 1µg/mL também teve seu metabolismo diminuído em relação ao grupo tratado com GPNMB na concentração de 2,5µg/mL (Figura 15A). Nos astrócitos, é vista uma diminuição do metabolismo celular em relação ao controle em todos os grupos que foram tratados com LPS 1µg/mL durante 24 horas (grupos LPS 1µg/mL, LPS 1µg/mL + GPNMB 2,5µg/mL e LPS 1µg/mL + GPNMB 25µg/mL) (Figura 15B). Isso aponta que, pelo menos em células de cultura primária de microglia e astrócitos, há uma diminuição do metabolismo celular induzido por LPS na concentração de 1µg/mL durante 24 horas, que não é revertida pela adição do GPNMB nas concentrações de 2,5µg/mL e 25ng/mL. Nas células de cultura primária de glia mista e da linhagem BV-2, nenhum efeito foi observado (Figuras 15C e 15D). O aumento da sensibilidade observado em células de cultura primária isoladas de microglia e astrócitos mostra que a interação entre elas parece ser importante para a resposta do LPS no metabolismo celular.

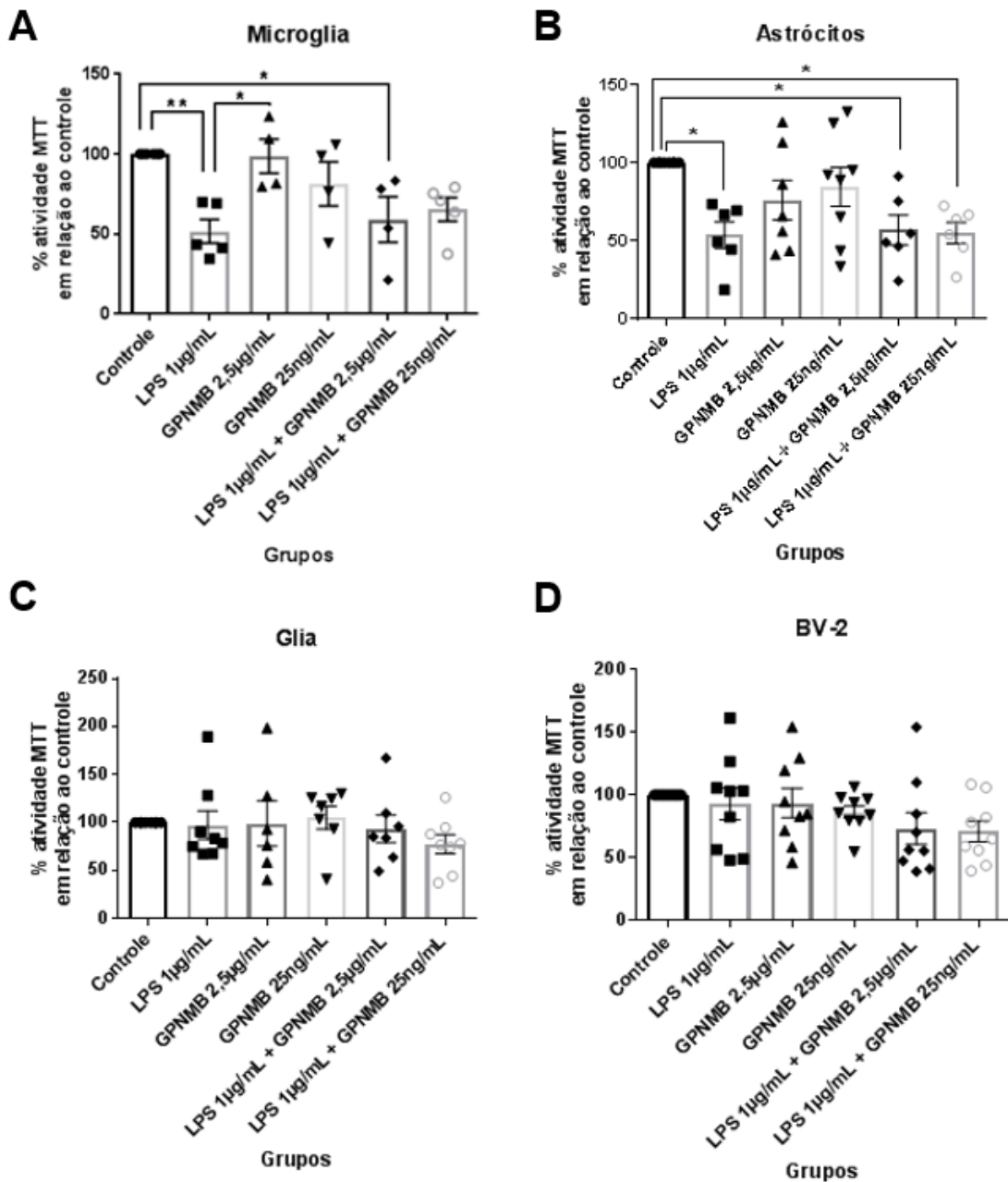


Figura 15. Atividade de MTT em resposta ao co-tratamento de LPS e GPNMB. Porcentagem de mudança do nível de metabolismo celular em relação ao grupo controle no co-tratamento de LPS e GPNMB. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Em células da microglia, o tratamento de LPS 1µg/mL e de LPS 1µg/mL + GPNMB 2,5µg/mL diminuem o metabolismo celular em relação ao controle, sendo que o grupo tratado com LPS 1µg/mL também teve seu metabolismo diminuído em relação ao grupo tratado com GPNMB na concentração de 2,5µg/mL (A). Nos astrócitos, é vista uma diminuição do metabolismo celular em relação ao controle em todos os grupos que foram tratados com LPS 1µg/mL durante 24 horas (grupos LPS 1µg/mL, LPS 1µg/mL + GPNMB 2,5µg/mL e LPS 1µg/mL + GPNMB 25µg/mL) (B). Nas células de glia mista e da linhagem BV-2, não foram observadas alterações significativas no metabolismo após o co-tratamento (C e D). Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia = 5, n astrócitos = 6, n glia mista = 7, n BV-2 = 9. * p<0.05, ** p<0.01

4.3.4 Curva de viabilidade celular do tratamento de GPNMB+LPS (pré-tratamento)

Foram realizados testes para verificar se um pré-tratamento com GPNMB pode modular a viabilidade celular seguida da adição de LPS na concentração de 1µg/mL por 1 hora (Figura 16). Para isso, foi adicionado GPNMB, nas concentrações de 2,5µg/mL e 25ng/mL, 24 horas antes do teste, e o LPS na concentração de 1µg/mL 1 hora antes do teste. O LPS na concentração de 1µg/mL durante 1 hora não parece alterar a viabilidade celular, na presença ou não do tratamento prévio com GPNMB. O efeito significativamente diferente do co-tratamento observado na Figura 14 não é replicado no tratamento tardio de LPS, o que mostra que provavelmente o efeito de potencializar a morte celular é dependente majoritariamente do LPS e do tempo de incubação (Figura 10).

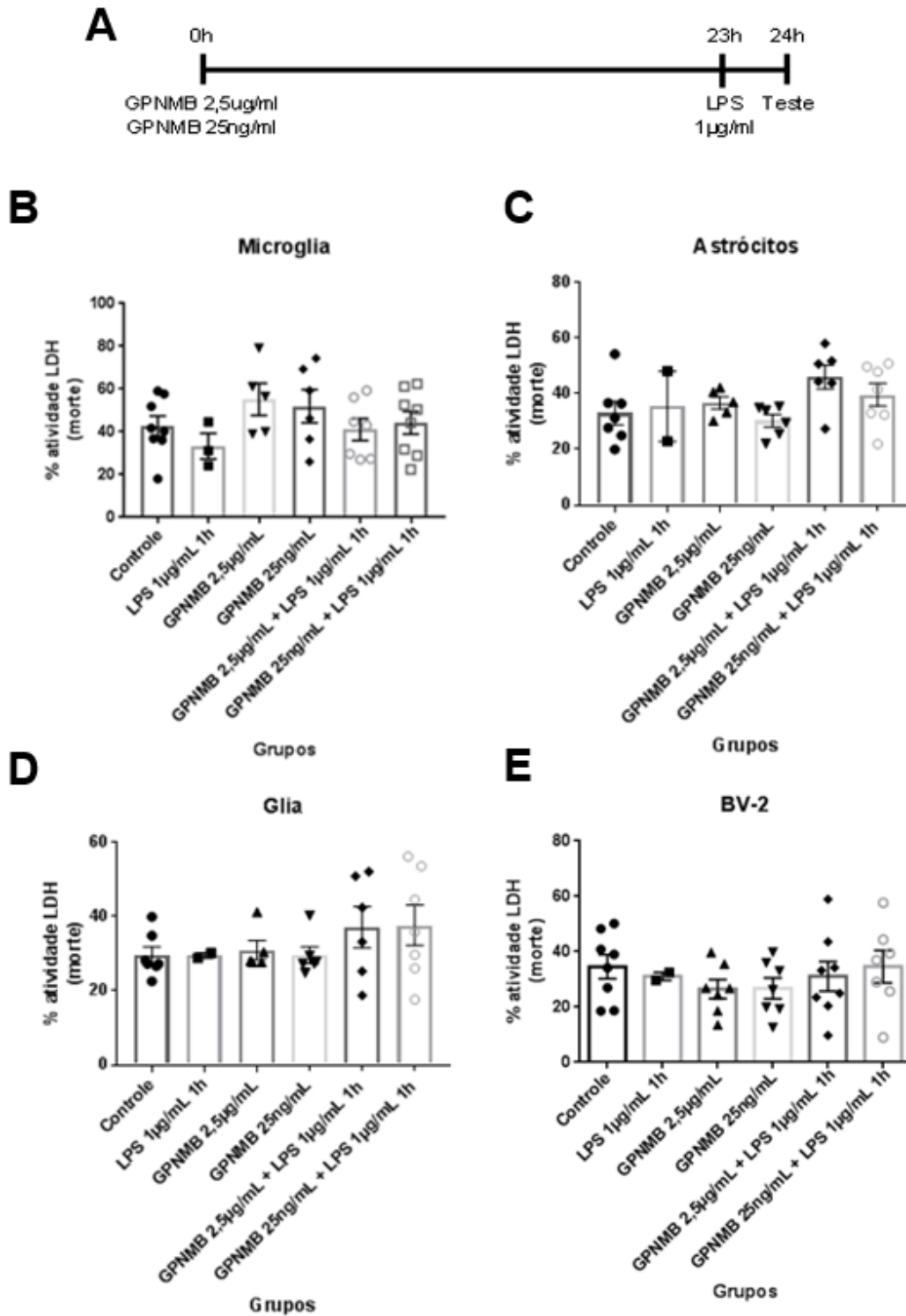


Figura 16. Atividade de LDH em resposta ao desafio com LPS após o pré-tratamento com GPNMB. Porcentagem de lise celular após o pré-tratamento com GPNMB seguido de desafio com LPS. (A) linha do tempo mostrando o protocolo experimental. Em nenhuma concentração, em nenhum grupo, foi vista diferença significativa na atividade do LDH entre os tratamentos (B, C, D e E). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia, astrócitos e glia mista = 6, n BV-2 = 7.

O mesmo tratamento foi utilizado para observar se o pre-tratamento com a GPNMB seguido do LPS poderia alterar a resposta metabólica (Figura 17). Apenas nas células primárias da microglia foi visto que o tratamento prévio de GPNMB na concentração de 2,5µg/mL, seguido pelo tratamento de LPS 1µg/mL por 1 hora foi capaz de diminuir a resposta metabólica celular em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com LPS (Figura 17A).

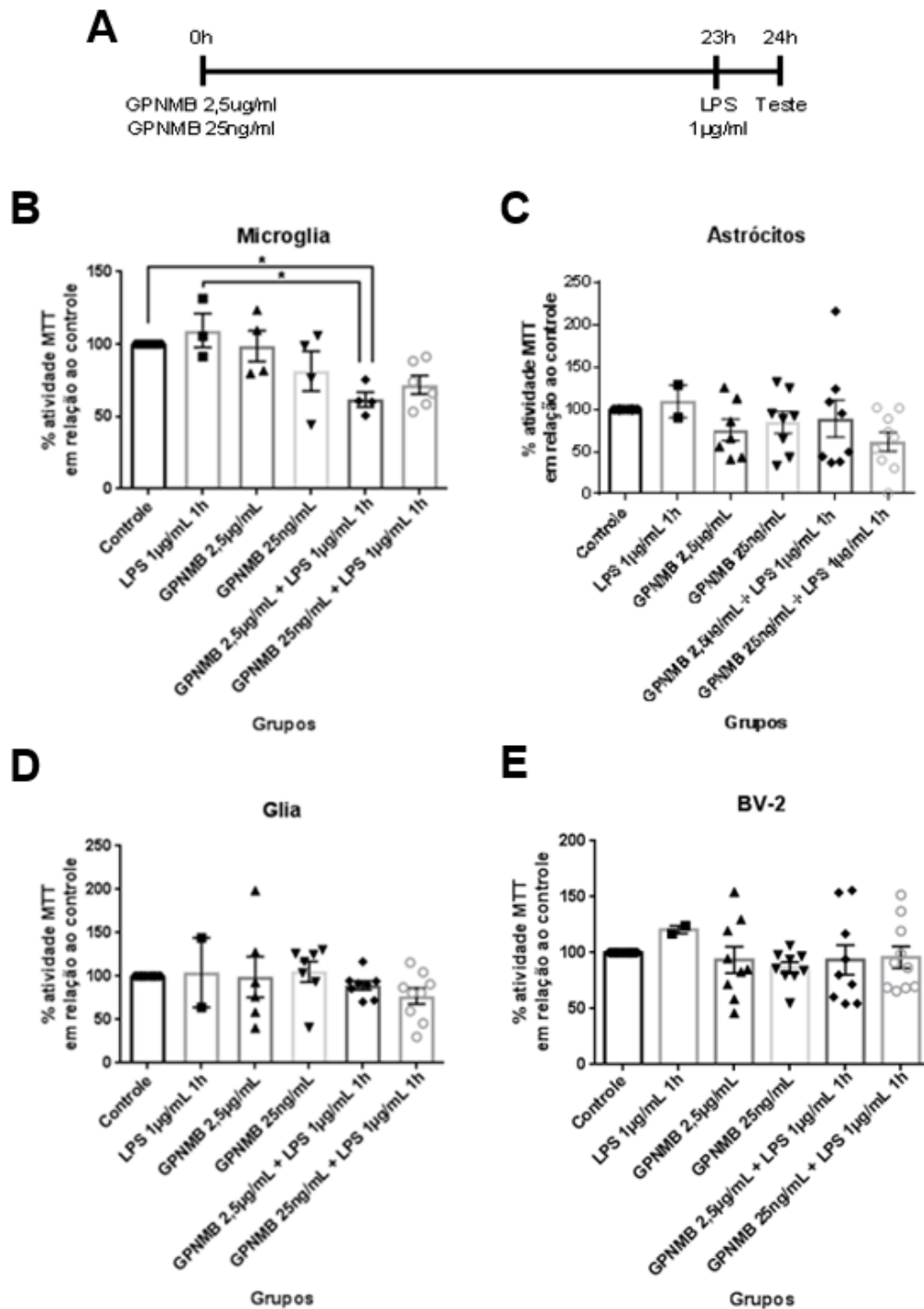


Figura 17. Atividade de MTT em resposta ao desafio com LPS após o pré-tratamento com GPNMB. Porcentagem de lise celular após o pré-tratamento com GPNMB seguido de desafio com LPS. (A) linha do tempo mostrando o protocolo experimental. Apenas em células da microglia foi visto que o tratamento prévio de GPNMB na concentração de 2,5µg/mL, seguido pelo tratamento de LPS 1µg/mL por 1 hora foi capaz de diminuir a resposta metabólica celular em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com LPS na concentração de 1µg/mL por 1 hora (A). Não foram observadas alterações significativas no metabolismo nos outros tipos celulares estudados (B, C e D). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de 1 via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia = 4, n astrócitos e BV-2 = 8, n glia mista = 7. * $p < 0.05$

4.3.5 Curva de viabilidade celular do co-tratamento de ouabaína+GPNMB

Foram realizados testes para verificar se a associação da GPNMB com a ouabaína modula a resposta apresentada por essas substâncias nas células (Figura 18). A GPNMB e a ouabaína interagem com o mesmo receptor (NKA), portanto, esse ensaio foi realizado para verificar se há uma competição de resposta entre os tratamentos via NKA. Não foi vista uma alteração da viabilidade celular com a adição de ouabaína ou no co-tratamento de ouabaína e GPNMB.

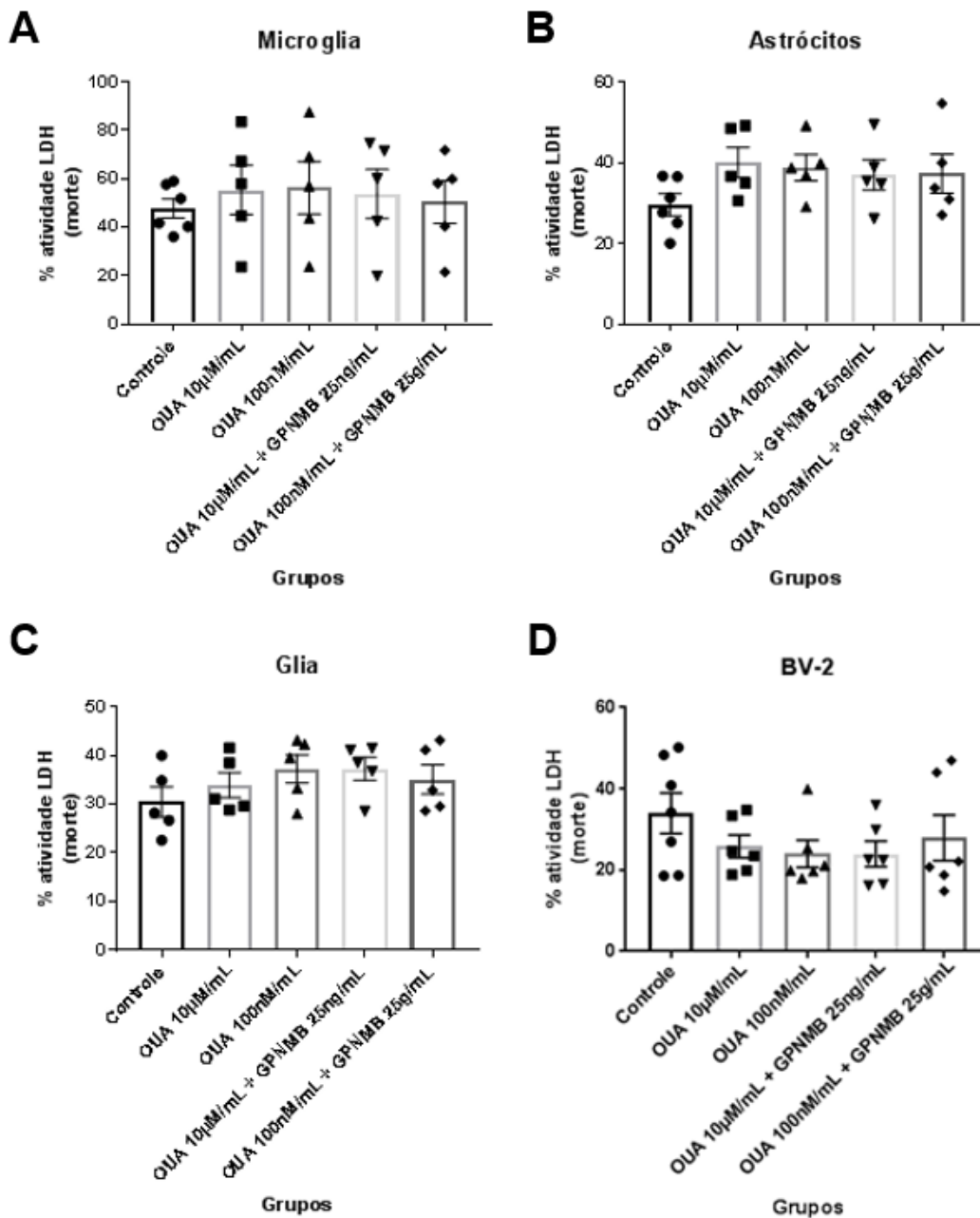


Figura 18. Atividade de LDH após o tratamento com ouabaína na presença ou ausência de GPNMB. Porcentagem de lise celular no co-tratamento de ouabaína e GPNMB. Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Em nenhuma concentração, em nenhum tipo celular, foi vista uma diferença significativa na atividade do LDH entre os tratamentos (A, B, C e D). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia, astrócitos e glia mista = 5, n BV-2 = 6.

O mesmo tratamento foi utilizado para observar se a associação da GPNMB com a ouabaína modula a resposta apresentada por essas substâncias nas células (Figura 19). Houve uma diminuição na resposta metabólica em nos grupos de

astrócitos isolados provenientes de cultura primária frente ao tratamento com ouabaína (concentrações de 10 μ M/mL e 100nM/mL) e também no tratamento concomitante da ouabaína a 100nM/mM com GPNMB a 25ng/mL (Figura 19B). Isso indica que há uma sensibilização desse tipo celular específico frente a estímulos com a presença de ouabaína. Nos demais tipos celulares, não foi vista uma modulação no metabolismo celular com a adição de ouabaína ou no co-tratamento de ouabaína e GPNMB.

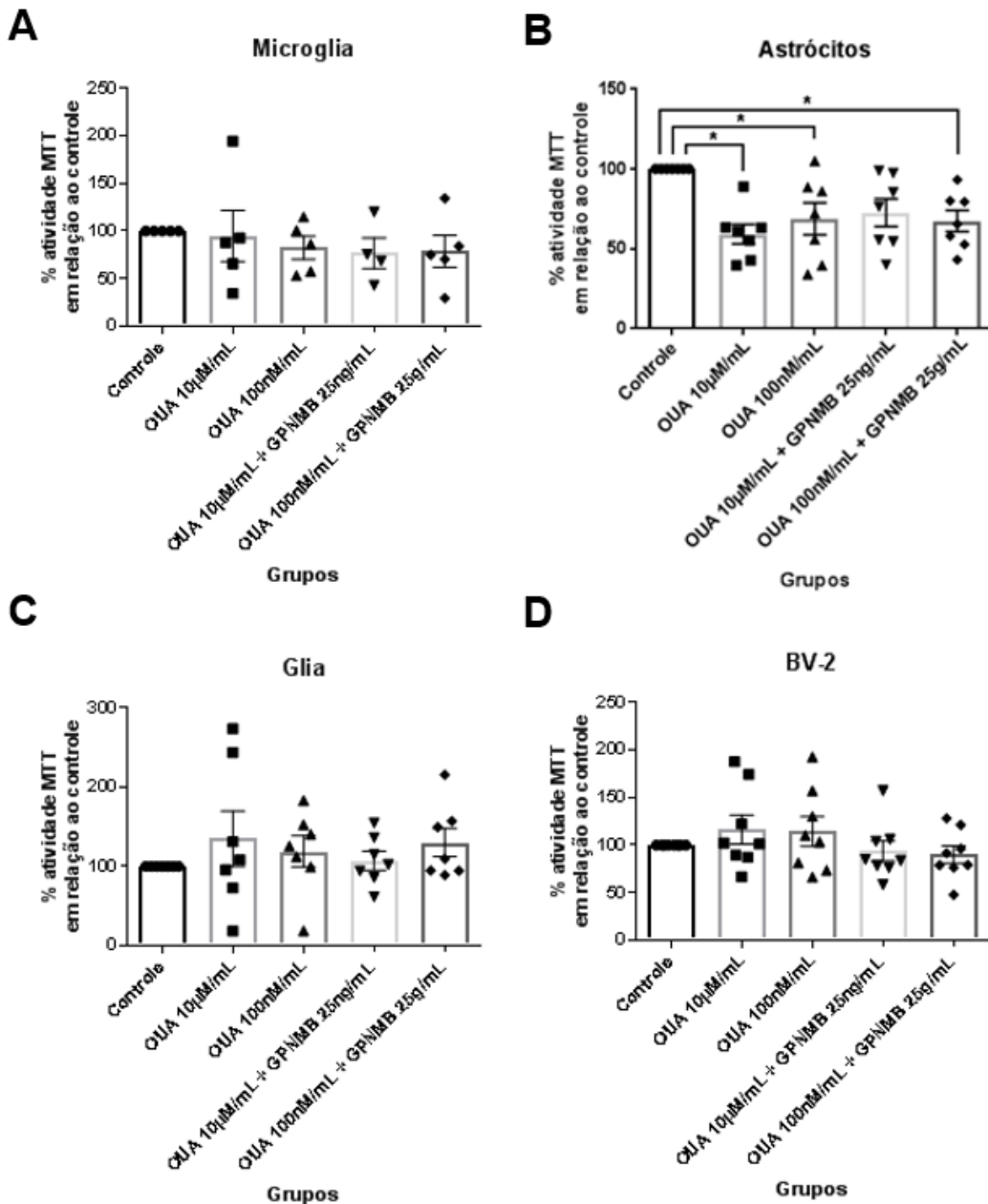


Figura 19. Atividade de MTT após o tratamento com ouabaína na presença ou ausência de GPNMB. Porcentagem de mudança do nível de metabolismo celular em relação ao grupo controle no tratamento ou co-tratamento de Ouabaína e GPNMB. Houve uma diminuição na resposta metabólica em nos grupos de astrócitos isolados provenientes de cultura primária frente ao tratamento com ouabaína

(concentrações de 10µM/mL e 100nM/mL) e no tratamento co-tratamento de ouabaína 100nM/mM com GPNMB 25ng/mL em relação ao grupo controle (B). Não foi vista uma modulação na atividade de MTT com a adição de ouabaína ou no co-tratamento de ouabaína e GPNMB nos demais grupos (A, C D). Cada ponto no gráfico representa a média da triplicata de um experimento individual. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n microglia = 5, n astrócitos e glia mista = 7, n BV-2 = 8. * p<0.05

4.4 Avaliação do efeito da GPNMB nas vias da ERK e Akt e seu impacto no NF-κB

4.4.1 Avaliação da ativação da via da ERK e da Akt e efeitos da GPNMB em células da linhagem BV-2

Foi realizado um ensaio de Western Blot a fim de verificar se o tratamento proposto de GPNMB (2,5µg/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos é capaz de ativar a via da ERK (Figura 20A e 20B) ou a via da Akt (Figura 20C e 20D) em células da linhagem BV-2. Não houve diferença nos níveis de ERK fosforilada em relação à ERK total nem de Akt fosforilada em relação à Akt total em nenhum dos grupos estudados, sugerindo que não houve ativação das vias da ERK ou da Akt no tempo e tratamentos propostos nas células da linhagem BV-2

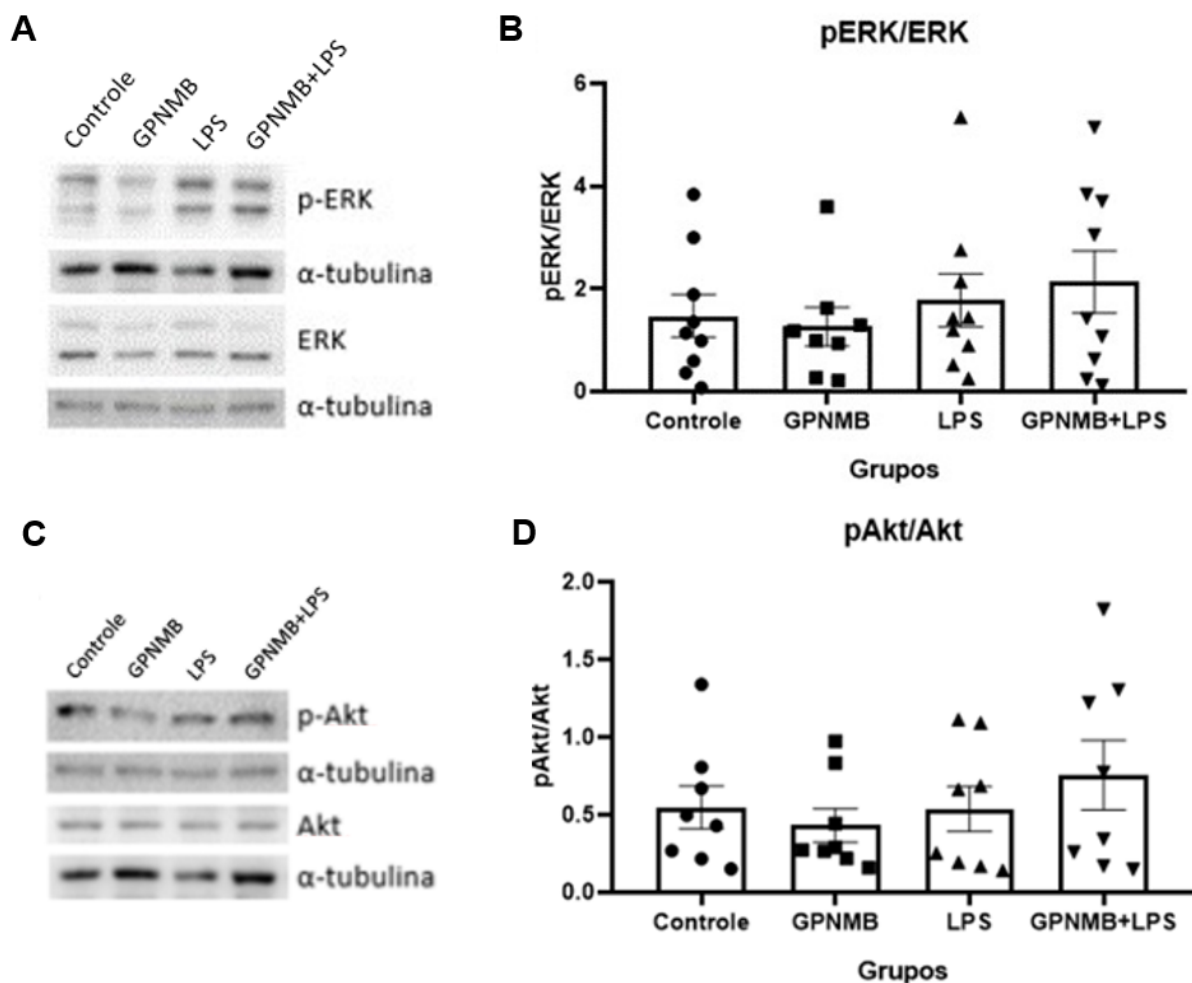


Figura 20. Avaliação da fosforilação da ERK em células da linhagem BV-2. Células da linhagem BV-2 foram tratadas com GPNMB (2,5µg/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. (A) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti-pERK, anti-ERK e anti-α-tubulina. (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas para cada grupo, normalizado pela α-tubulina e calculada a razão entre p-ERK e ERK. (C) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti-pAkt, anti-Akt e anti-α-tubulina. (D) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas para cada grupo, normalizado pela α-tubulina e calculada a razão entre p-Akt e Akt. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n p-ERK/ERK = 9; n p-Akt/Akt = 8.

Também foi avaliado se o tratamento proposto é capaz de translocar a subunidade p65 do NF-κB em células da linhagem BV-2. Para isso, foram medidos os níveis de p65 no citosol das células tratadas, maneira indireta de inferir a translocação desta subunidade (Figura 21). Não houve diferença nos níveis citosólicos de p65 em nenhum dos grupos estudados, sugerindo que não houve a translocação desta subunidade ao núcleo, conseqüentemente não houve a ativação do NF-κB no tempo e tratamento propostos.

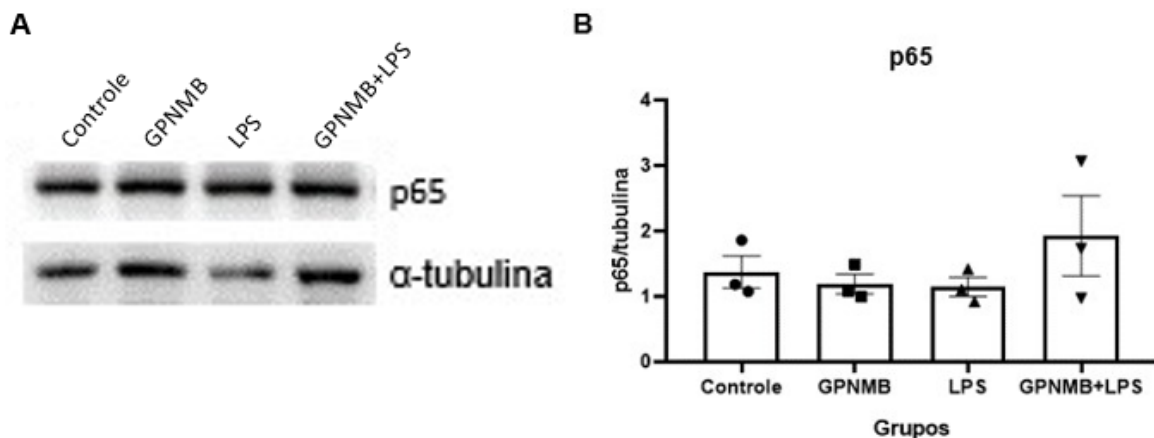


Figura 21. Avaliação dos níveis citosólicos de p65 em células da linhagem BV-2. Células da linhagem BV-2 foram tratadas com GPNMB (2,5µg/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. Os níveis de p65 foram normalizados de acordo com a quantificação de α-tubulina do grupo correspondente. (A) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti-p65 e anti-α-tubulina. (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de p65 para cada grupo, normalizado pela α-tubulina. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n = 3.

4.4.2 Avaliação da ativação da via da ERK e da Akt e efeitos da GPNMB em células de cultura primária de glia

Foi realizado um ensaio de Western Blot a fim de verificar se o tratamento proposto de GPNMB (25ng/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos é capaz de ativar a via da ERK (Figura 22A e 22B) ou a via da Akt (Figura 22C e 22D) em células de cultura primária de glia mista. Não houve diferença nos níveis de ERK fosforilada em relação à ERK total nem de Akt fosforilada em relação à Akt total em nenhum dos grupos estudados, sugerindo que não houve ativação das vias da ERK ou da Akt no tempo e tratamentos propostos nas células de cultura primária de glia mista.

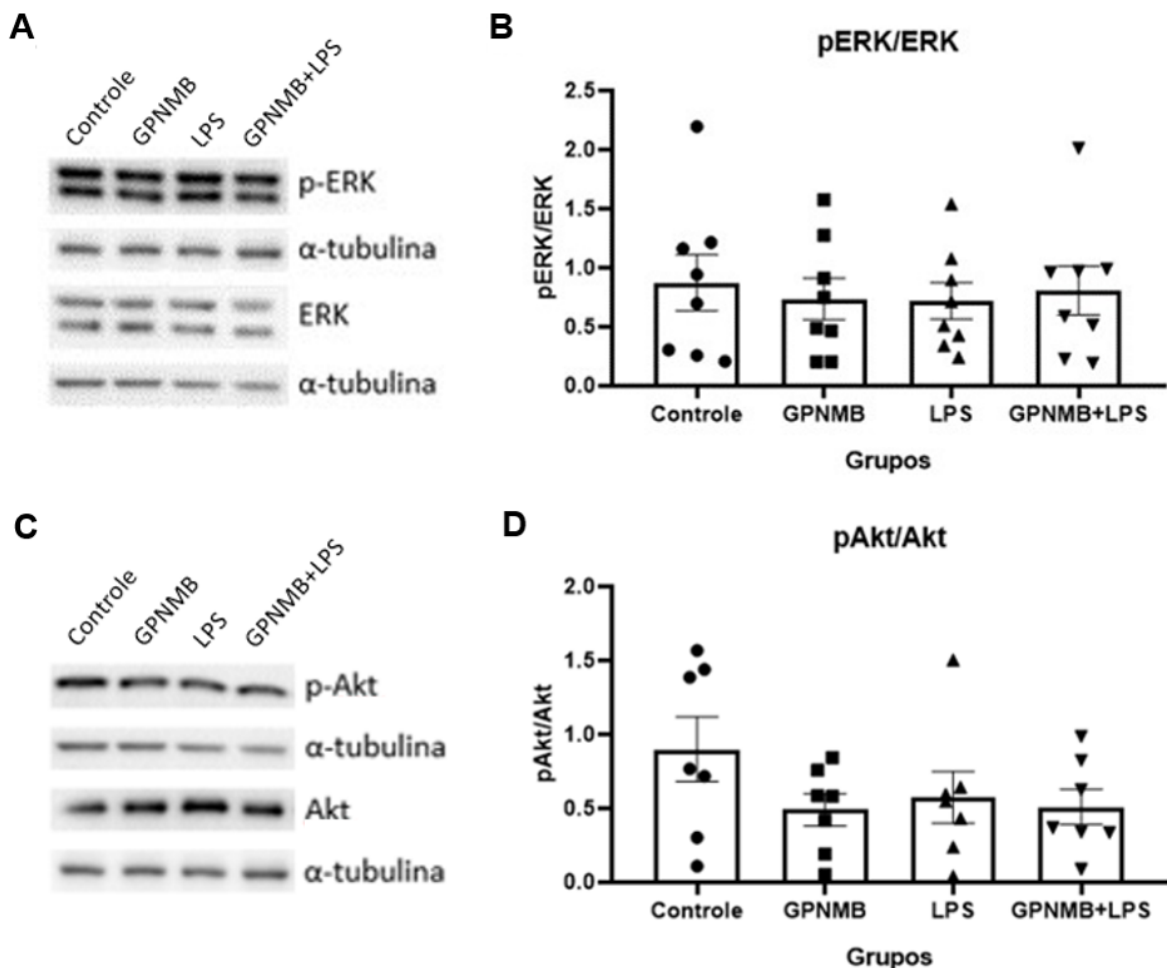


Figura 22. Avaliação da ativação da via da ERK em células de cultura primária de glia mista. Células de cultura primária de glia mista foram tratadas com GPNMB (25ng/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. (A) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti-pERK, anti-ERK e anti-α-tubulina. (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas para cada grupo, normalizado pela α-tubulina e calculada a razão entre p-ERK e ERK. (C) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti-pAkt, anti-Akt e anti-α-tubulina. (D) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas para cada grupo, normalizado pela α-tubulina e calculada a razão entre p-Akt e Akt. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n p-ERK/ERK = 8; n p-Akt/Akt = 7.

Também foi avaliado se o tratamento proposto é capaz de translocar a subunidade p65 do NF-κB. Para isso, foram medidos os níveis de p65 no citosol das células tratadas, maneira indireta de inferir a translocação desta subunidade (Figura 23). Não houve diferença nos níveis citosólicos de p65 em nenhum dos grupos estudados, sugerindo que não houve a translocação desta subunidade ao núcleo, conseqüentemente não houve a ativação do NF-κB no tempo e tratamento propostos nas células de cultura primária de glia mista.

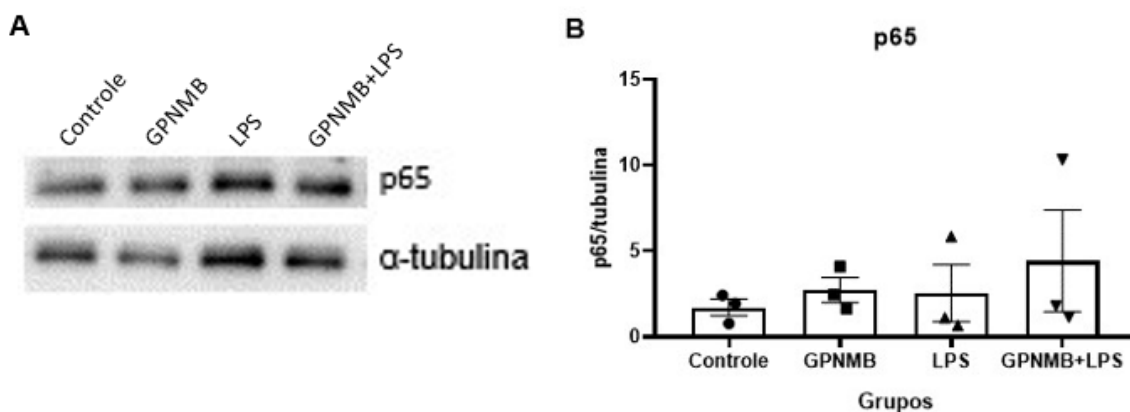


Figura 23. Avaliação dos níveis citosólicos de p65 em células de cultura primária de glia mista. Células da linhagem BV-2 foram tratadas com GPNMB (25ng/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. Os níveis de p65 foram normalizados de acordo com a quantificação de α -tubulina do grupo correspondente. (A) radiografia com bandas representativas para o anticorpo anti-p65 e anti- α -tubulina. (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de p65 para cada grupo, normalizado pela α -tubulina. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n = 3.

4.5 Avaliação dos níveis de RNAm de citocinas pró- e anti-inflamatórias tratadas com GPNMB e LPS

4.5.1 Expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em células da linhagem BV-2

Foi realizado um ensaio de RT-PCR para avaliar os níveis de expressão do RNAm de moléculas envolvidas com a resposta inflamatória em células da linhagem BV-2 após o tratamento com GPNMB (2,5µg/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos (Figura 24). Os genes analisados foram *IL-1 β* (Figura 24A e 24B), *IL-10* (Figura 24C e 24D) e *TNF- α* (Figura 24E e 24F). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de RNAm de nenhum dos genes analisados após os tratamentos propostos neste modelo.

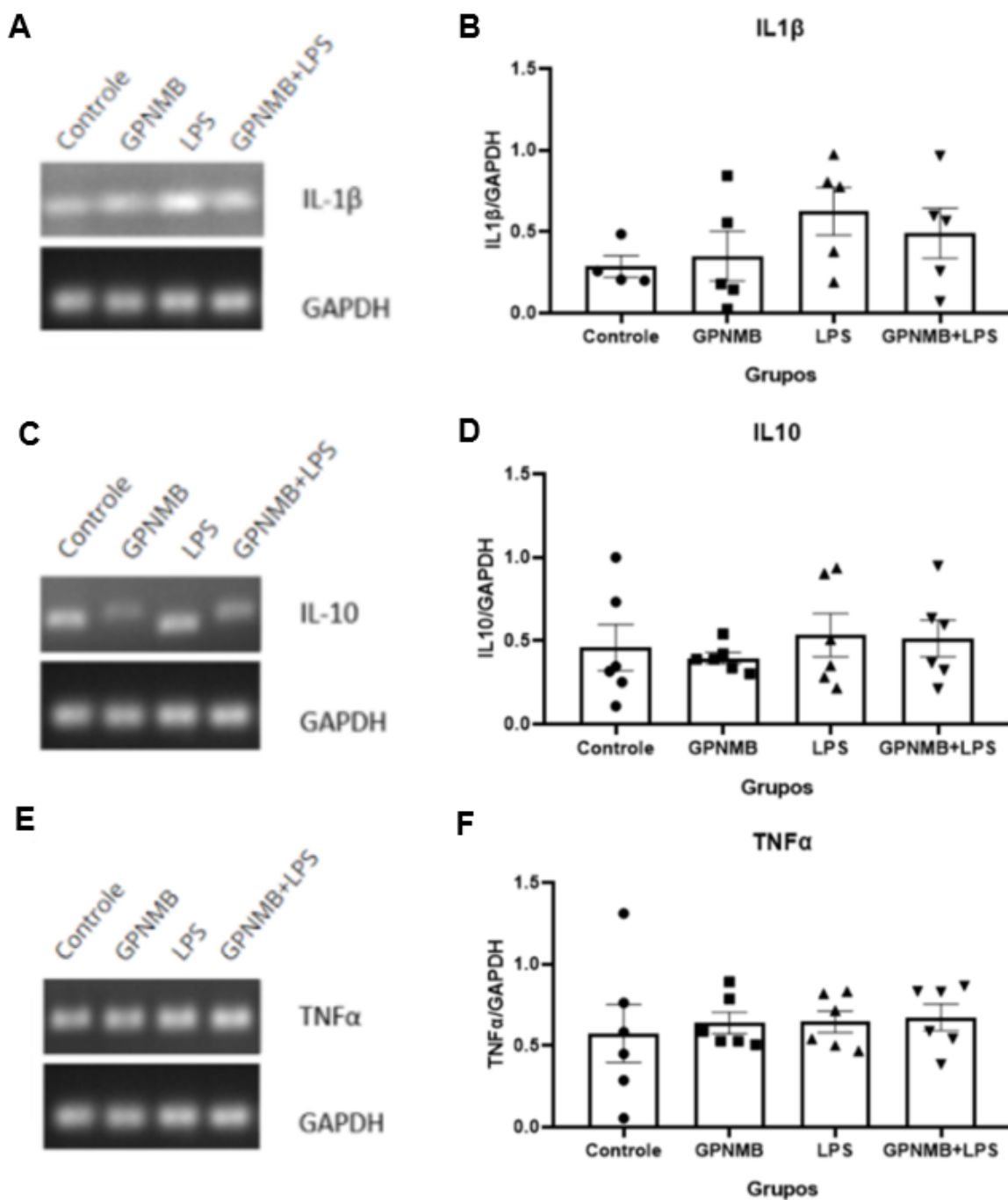


Figura 24. Expressão de RNAm de *IL-1 β* em células da linhagem BV-2. Células da linhagem BV-2 foram tratadas com GPNMB (2,5 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. (A) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *IL-1 β* . (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *IL-1 β* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. (C) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *IL-10*. (D) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *IL-10* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. (E) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *TNF- α* . (F) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *TNF- α* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n *IL-1 β* = 5; n *IL-10* e *TNF- α* = 6.

4.5.2 Expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em células primárias de glia (co-tratamento)

Foi realizado um ensaio de RT-PCR para avaliar os níveis de expressão do RNAm de moléculas envolvidas com a resposta inflamatória após o tratamento ou o co-tratamento de GPNMB e LPS (Figura 25). As células de glia mista provenientes de cultura primária foram tratadas com GPNMB (25ng/mL), LPS (1µg/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. Houve diferença estatisticamente significativa entre níveis de RNAm de *IL-1β* após o tratamento das células primárias de glia mista com LPS na concentração de 1µg/mL em relação aos grupos que não foram tratados com LPS (grupo controle e grupo GPNMB) (Figura 25B). Porém, não houve diferença estatística significativa entre o grupo co-tratado com LPS e GPNMB e nenhum outro grupo estudado. Para o gene *IL-10*, apesar de haver uma tendência de aumento nos níveis de RNAm de *IL-10* após o tratamento com LPS em relação com os outros grupos estudados, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 25D). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de RNAm de *TNF-α* após os tratamentos propostos neste modelo (Figura 25F). As fotografias dos géis com as bandas representativas para cada um dos genes estão presentes nas figuras 25A, 25C e 25E.

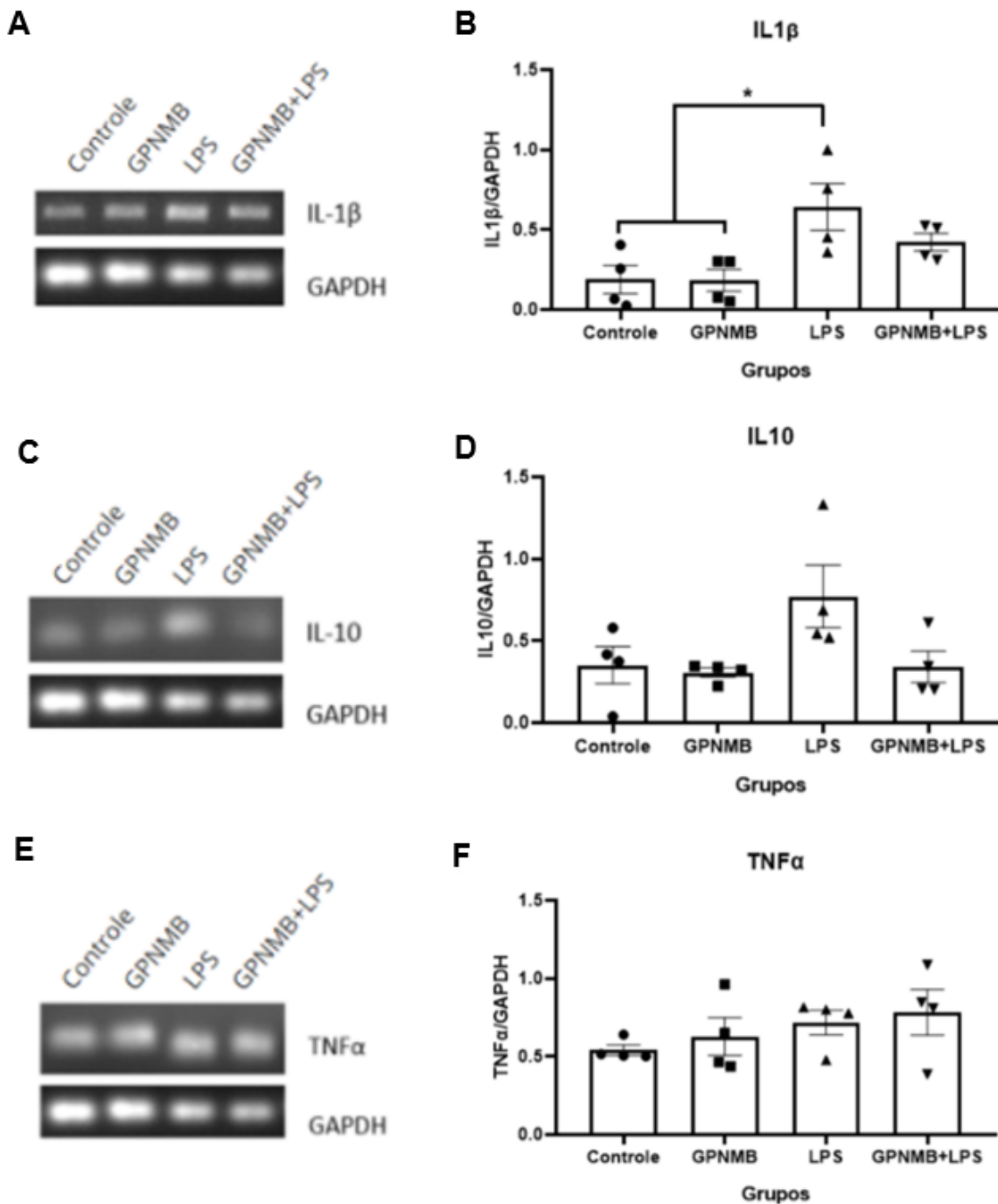


Figura 25. Expressão de RNAm de *IL-1 β* em células primárias de glia mista. Células de glia mista provenientes de cultura primária de ratos foram tratadas com GPNMB (25ng/mL), LPS (1 μ g/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. (A) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *IL-1 β* . (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *IL-1 β* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. (C) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *IL-10*. (D) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *IL-10* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. (E) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *TNF- α* . (F) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *TNF- α* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n = 4. * p<0.05

4.5.3 Expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em células primárias de glia (pré-tratamento)

Foi realizado um ensaio de RT-PCR para avaliar os níveis de expressão do RNAm de moléculas envolvidas com a resposta inflamatória após o pré-tratamento com GPNMB seguido de um desafio com LPS (Figura 26). As células de glia mista provenientes de cultura primária foram tratadas com GPNMB (25ng/mL) durante 1 hora, LPS (1µg/mL) por 30 minutos ou GPNMB (25ng/mL) durante 30 minutos e, em seguida, desafiadas com LPS (1µg/mL) por 30 minutos adicionais (totalizando 1 hora de tratamento com GPNMB) (esquema representativo ilustrado na Figura 4). Os genes analisados foram *IL-1β* (Figura 26A e 26B), *IL-10* (Figura 26C e 26D) e *TNF-α* (Figura 26E e 26F). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de RNAm de nenhum dos genes analisados após os tratamentos propostos neste modelo.

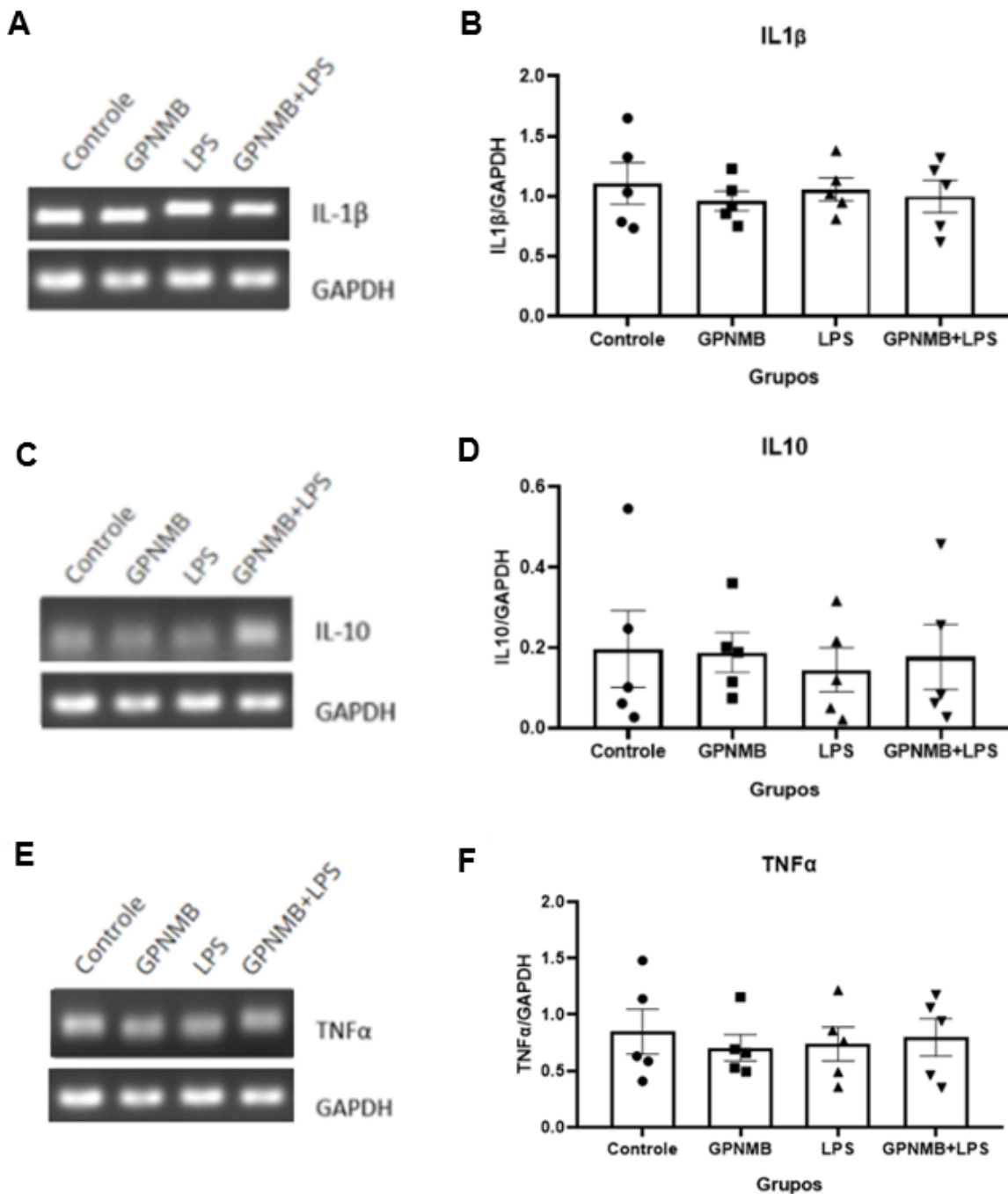


Figura 26. Expressão de RNAm de *IL-1 β* em células primárias de glia mista (pré-tratamento). Células de glia mista provenientes de cultura primária de ratos foram tratadas com GPNMB (25ng/mL) durante 1 hora, LPS (1 μ g/mL) por 30 minutos ou GPNMB durante 30 minutos, seguido de um desafio com LPS por 30 minutos. (A) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *IL-1 β* . (B) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *IL-1 β* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. (C) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *IL-10*. (D) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *IL-1 β* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. (E) imagem representativa das bandas resultantes da reação de PCR para o gene *TNF- α* . (F) gráfico contendo o resultado da quantificação da intensidade das bandas de *TNF- α* para cada grupo, normalizadas pelo *GAPDH*. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n = 5.

4.6 Análise dos níveis de TNF- α liberado no meio

Foi realizado um ensaio de ELISA a fim de verificar se houve um aumento nos níveis de TNF- α liberado no meio extracelular em células de cultura primária após os diferentes tratamentos apresentados anteriormente (Figura 27). Em todos os tipos celulares provenientes de cultura primária com a presença de microglia (tanto microglia isolada quanto glia mista) houve um aumento dos níveis de TNF- α comparado ao controle após o tratamento com LPS na concentração de 1 μ g/mL por 24 horas, tanto o tratamento apenas com LPS quanto o co-tratamento com LPS e GPNMB (Figura 27A e 27C). Para a cultura primária de astrócitos, houve apenas uma tendência de aumento dos níveis de TNF- α após tratamento com LPS (Figura 27B). O número de experimentos realizados é abaixo de 3, portanto a análise estatística não pôde ser realizada.

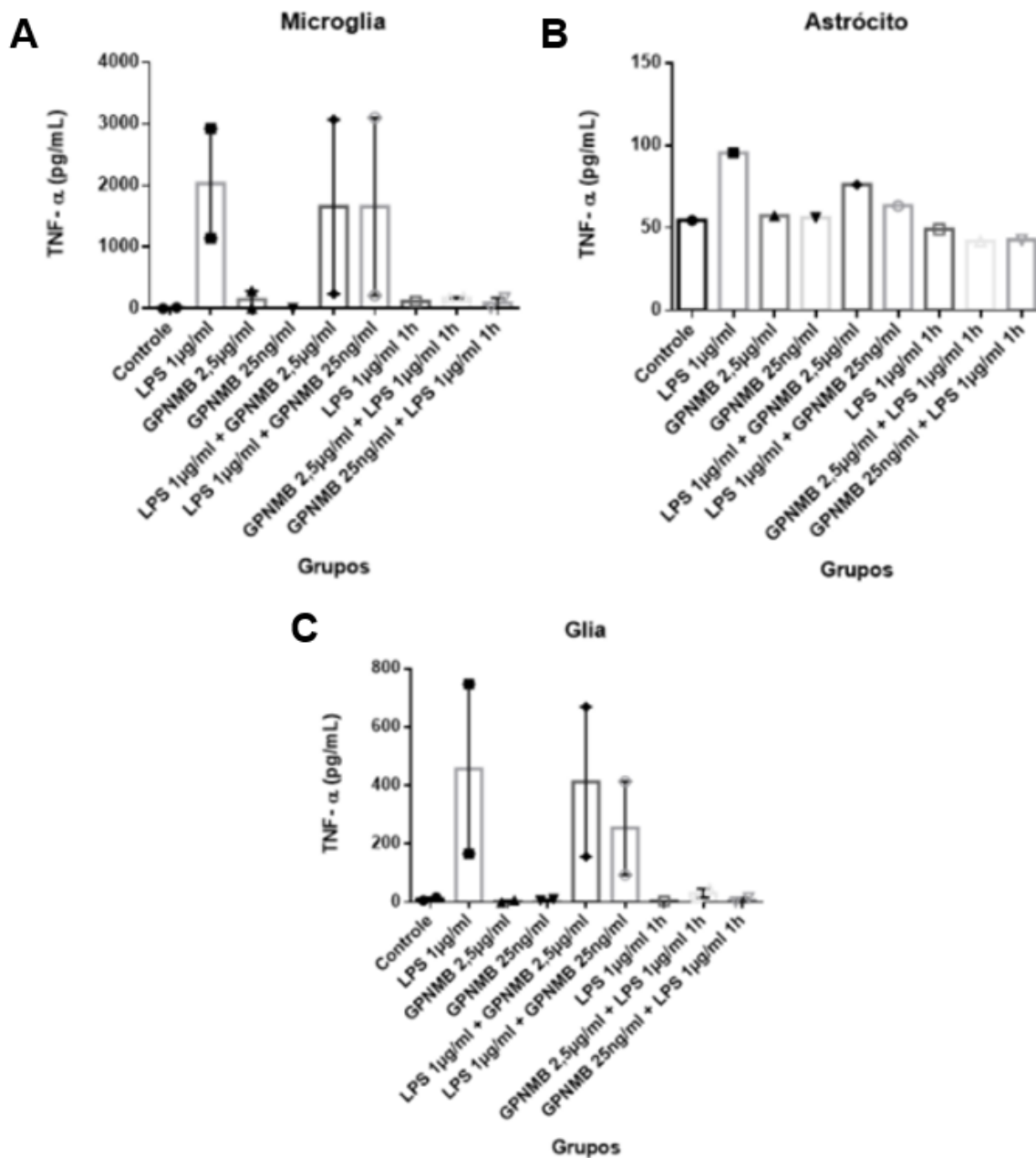


Figura 27. Níveis de TNF- α após diferentes tratamentos. Os níveis de TNF- α em células primárias de microglia (A), astrócitos (B) e glia mista (C) foram analisados após diferentes tratamentos. Os grupos LPS 1 μ g/mL e GPNMB 2,5 μ g/mL e LPS 1 μ g/mL + GPNMB 25ng/mL foram tratados por 24 horas, sendo um co-tratamento. Já nos grupos LPS 1 μ g/mL + GPNMB 2,5 μ g/mL, LPS 1 μ g/mL + GPNMB 25ng/mL, GPNMB 2,5 μ g/mL + LPS 1 μ g/mL e GPNMB 25ng/mL + LPS 1 μ g/mL, o primeiro tratamento foi feito 24 horas antes do teste, e o segundo tratamento foi adicionado 1 hora antes da realização do teste. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. n microglia e glia mista = 2, n astrócitos = 1.

Além disso, foi realizado um ensaio de ELISA para quantificar o TNF- α no meio extracelular em células da linhagem BV-2 após o tratamento com LPS na concentração de 1 μ g/mL, GPNMB na concentração de 2,5 μ g/mL ou um co-tratamento com essas

duas substâncias pelo período de 30 minutos (Figura 28). Houve um aumento na liberação de TNF- α nessas células em ambos os grupos que foram tratados LPS, sendo que a adição de GPNMB juntamente com o LPS não foi capaz de reverter esta resposta.

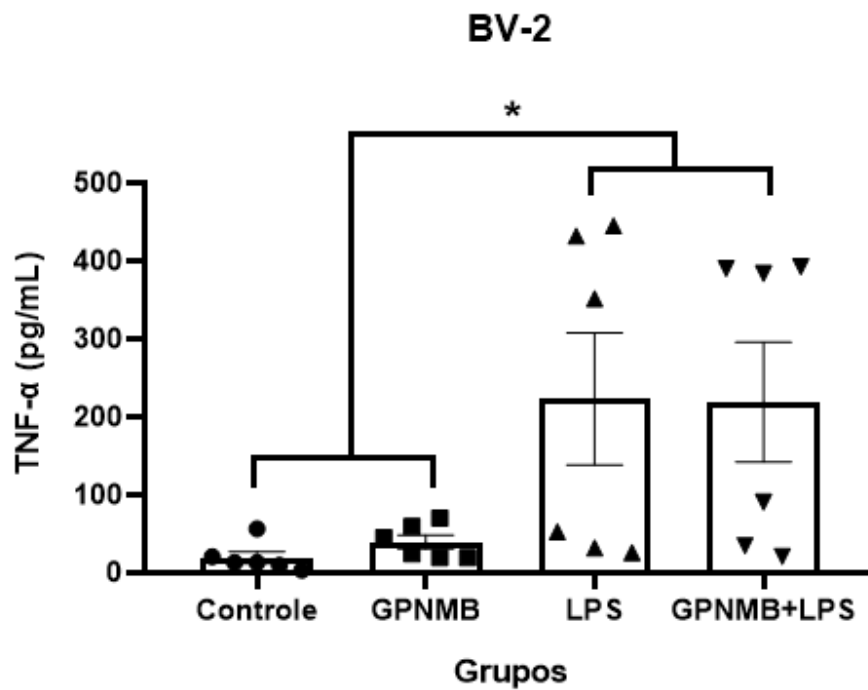


Figura 28. Células da linhagem BV-2 foram tratadas com GPNMB (2.5 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) ou um co-tratamento com essas duas substâncias por 30 minutos. Foram quantificados os níveis de TNF- α liberados para o meio extracelular após o tratamento. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. n = 6. * = p<0.05

5 DISCUSSÃO

A GPNMB é uma glicoproteína endógena cujo papel na neuroinflamação, processo relevante nas doenças neurodegenerativas, foi pouco explorado até o momento. Estudos anteriores demonstram capacidade antiapoptótica e neuroprotetora desta glicoproteína, o que a classifica como uma possível candidata para um novo tratamento para doenças neurodegenerativas. Além disso, a GPNMB interage com a NKA, uma proteína transmembrana que possui influência na inflamação e na sobrevivência celular. Neste estudo, foi proposto estudar como esses mecanismos estão interligados, buscando entender o papel da GPNMB nas células da glia, que são fundamentais na modulação da sinalização inflamatória no SNC, e posteriormente verificar seu efeito na vigência de um estímulo neuroinflamatório, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos. Neste aspecto, sugerimos utilizar as células da glia, por serem elas as maiores responsáveis pelo suporte e manutenção da homeostase do SNC. Porém, pela glia ser composta de diversos tipos celulares, tentamos isolar dois dos tipos celulares: microglia e astrócitos, por serem os mais envolvidos com a resposta neuroinflamatória.

A separação de células pelo método de microbeads foi descontinuada pois, apesar de ser um método que possibilita isolar células de animais adultos de microglia e astrócitos de forma muito precisa, não conseguimos atingir um bom rendimento nem uma boa viabilidade celular (Figura 5). As células de microglia obtidas por esse processo, mesmo incubadas em um meio de cultura suplementado para microglia, continuaram não sendo viáveis. Por questões de tempo de projeto, e principalmente por existirem métodos alternativos de separação das células, optamos por dar continuidade ao projeto utilizando a cultura primária de neonatos e posteriormente isolar as células pelo método mecânico, descrito no item 3.3 deste trabalho, que apresentaram uma boa taxa de separação e as células continuam viáveis (Figura 9).

Os indícios da função neuroprotetora da GPNMB são provenientes, majoritariamente, de estudos feitos com linhagem celular (Ono et al, 2016b, Tanaka et al., 2012, Noda et al., 2017), assim como os estudos que mostraram uma ação anti-inflamatória da GPNMB (Ripoll et al., 2007, Neal et al., 2018). Linhagens celulares

são células que passaram por algum processo de imortalização ou são provenientes de tumores, portanto, podem ter uma resposta diferente daquela observada em células de cultura primária. Sendo assim, os efeitos sugeridos da GPNMB em estudos anteriores podem não ser reproduzidos em células provenientes de cultura primária. Mesmo que os efeitos entre linhagem celular e células primárias sejam semelhantes, o tempo ou concentração necessários para que eles sejam vistos podem ser diferentes. As células BV-2, que são uma linhagem celular isolada de microglia, parecem ser menos sensíveis ao tratamento com LPS do que as células de microglia isoladas de cultura primária, tanto no ensaio de viabilidade quanto no metabolismo celular. Apenas o tratamento com LPS 10µg/mL por 24 horas resultou na diminuição da resposta metabólica nas células BV-2 (Figura 11), enquanto esse efeito foi observado também em concentrações menores na microglia primária.

Nas curvas de dose-resposta de LPS não se observou morte celular significativa no tratamento com a concentração de 1µg/mL de LPS durante 24 horas em nenhum dos tipos celulares (Figura 10), portanto, foi a concentração escolhida no estudo. Já na curva de dose-resposta de GPNMB, nenhuma das concentrações pareceu modular a viabilidade ou o metabolismo celular dos grupos estudados (Figuras 12 e 13). Portanto, as concentrações utilizadas neste estudo foram escolhidas baseadas na literatura: 2,5µg/mL para linhagem celular (Ono et al, 2012b, Tanaka et al, 2012) e 25ng/mL para células de cultura primária, por ser a concentração mais próxima à concentração estudada previamente em astrócitos provenientes de cultura primária (Neal et al, 2018).

As células isoladas de cultura primária (microglia ou astrócitos) parecem ser mais susceptíveis aos tratamentos com LPS, principalmente nos testes de resposta ao metabolismo, já que apresentaram uma resposta reduzida em relação ao teste de MTT em diversos grupos após o tratamento com LPS (Figura 11). Existem diversos fatores que podem explicar essa sensibilização, porém este resultado pode ter se dado pelo método de separação das células. Nesse método, as células são separadas mecanicamente, e exige que as células passem pela privação de CO₂ por algumas horas, o que pode causar alterações metabólicas nas células. Além disso, existe uma grande interação entre todas as células da glia, ajudando no suporte do SNC e das células em si. Em um sistema isolado, as células estão mais vulneráveis a estímulos

nocivos (Lyons e Kettenmann, 1998), assim como o comprometimento de um tipo celular afeta todos os outros (Lange et al, 2018). Para contornar o problema da possível interferência do método de separação na resposta metabólica da célula, propomos a utilização da cultura primária de glia mista, sem separação, mas continuamos a compará-las com as células BV-2. As células de glia mista utilizadas neste estudo constituem, em média, em 55% de astrócitos, 40% de microglia e 5% de outros tipos celulares não identificados. Essas células foram utilizadas tanto para analisar o comportamento da GPNMB apenas em células da microglia quanto como um parâmetro para comparação com os resultados já existentes na literatura.

A GPNMB não parece modular os níveis de toxicidade ou metabolismo celular, o que indica que as células continuam viáveis e sem alterações significativas no metabolismo nas concentrações estudadas (Figuras 12 e 13). Com esses dados, é possível sugerir que o efeito da GPNMB seja evidenciado frente a outro estímulo. Nos estudos já publicados, o efeito da GPNMB está geralmente associado a outro, como no estudo em que a GPNMB apresenta um efeito neuroprotetor frente a estímulos oxidativos (Tanaka et al., 2012), assim como em outro estudo que mostra o aumento da expressão de GPNMB no SNC após administração sistêmica de LPS (Huang et al., 2012).

Além disso, não foi vista uma mudança da viabilidade ou metabolismo celular pela co-administração de ouabaína e GPNMB (Figuras 18 e 19), apesar de existirem indícios de que elas atuem no mesmo receptor. Esse dado não descarta que ocorra uma competição entre essas duas moléculas, já que a concentração de ouabaína utilizada neste estudo não é tóxica para as células, como visto nos grupos apenas com ouabaína (Figura 18). Outra alternativa é de que o sítio de ligação da GPNMB e ouabaína na NKA podem ser distintos, ou com afinidades diferentes de acordo com cada isoforma. No caso da ouabaína, há uma baixa afinidade pela subunidade $\alpha 1$ e alta afinidade pelas subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ (Juhászova & Blaustein, 1997). Apesar da hipótese de que a GPNMB interage com a NKA, apenas poucos estudos mostraram essa interação (Ono et al., 2016a, 2016b). Como a GPNMB interage com outros receptores e moléculas, os efeitos moduladores da inflamação podem ser dados por outro mecanismo, como a interação com o receptor CD44 (Neal

et al., 2018). Neste estudo, a GPNMB não reverteu os efeitos do LPS na concentração de 1µg/mL na viabilidade (Figuras 14 e 16) ou metabolismo celular (Figuras 15 e 17), porém, o efeito da GPNMB pode existir sem afetar esses parâmetros, como na alteração da liberação de citocinas inflamatórias.

Apesar de já ter sido relatada em estudos anteriores, não foi vista a ativação das vias da ERK e Akt pela GPNMB na concentração estudada em células da linhagem BV-2 (Figura 20) nem em células de glia mista provenientes de cultura primária (Figura 22). Os estudos que viram a ativação destas vias após tratamento com GPNMB recombinante utilizaram células NSC-34 (células de linhagem híbridas de neuroblastoma e medula espinhal) (Ono et al., 2016b), NIH-3T3 (células de linhagem de fibroblastos) (Furochi et al., 2007), ou tecido cerebral de animais transgênicos superexpressando GPNMB (Nakano et al., 2014). Por outro lado, também já foi visto que o tratamento com o fragmento extracelular de GPNMB recombinante inibiu a ativação da ERK em células C57Blk6 (precursores de osteoclastos derivados de medula óssea) (Sondag et al., 2016), animais que possuem uma mutação nonsense no gene da GPNMB possuem maiores níveis basais de ERK e Akt fosforiladas em osteoblastos primários, e que a reversão dessa mutação diminui os níveis de fosforilação dessas vias (Abdelmagrid et al., 2015) e que o bloqueio da GPNMB pelo tratamento com siRNA elevou os níveis de ERK fosforilada em células da linhagem RAW.264.7 (células de linhagem semelhantes a macrófagos) (Sasaki et al., 2015) e BV-2 (Shi et al., 2014). Esses estudos sugerem que a ação da GPNMB na modulação de vias intracelulares depende do tipo celular estudado. Com os dados obtidos neste trabalho, sugere-se que o tratamento com o fragmento extracelular de GPNMB recombinante, nas concentrações de 2,5µg/mL para células da linhagem BV-2 e 25ng/mL para células primárias de glia mista de ratos, no tempo de 30 minutos, não é capaz de modular as vias da ERK e da Akt.

Para estudar a ação da GPNMB na inflamação, a translocação da subunidade p65 do NF-κB foi avaliada de forma indireta, por meio de sua quantificação no citosol pelo ensaio de Western Blotting. Observa-se que, em ambos tipos celulares estudados, há um aumento dos níveis de p65 no citosol após o co-tratamento com GPNMB e LPS por 30 minutos (Figuras 21 e 23). Esse dado levanta a hipótese de que o co-tratamento

de GPNMB com LPS pode atuar impedindo a ativação do NF- κ B. Porém, como não foi observada uma diminuição dos níveis de p65 citosólico após o tratamento com LPS na concentração de 1 μ g/mL como seria esperado, esse experimento precisa ser replicado, incluindo outros tempos e concentrações dos tratamentos. Não há outros estudos que investigaram a relação entre a GPNMB e o NF- κ B de forma direta, apenas um estudo que mostra que a inibição da Akt leva ao aumento da GPNMB e inibição do NF- κ B (Gutknecht et al., 2015).

Em relação à citocina anti-inflamatória *IL-10*, a resposta parece ser diferente nos dois tipos celulares estudados. Nas células da linhagem BV-2, não houve uma modulação na transcrição de *IL-10* em nenhum dos grupos estudados (figura 24D), porém nas células de glia mista de cultura primária, houve uma tendência (apesar de não ter sido estatisticamente significativa) para o aumento dos níveis de RNAm de *IL-10* no grupo tratado apenas com LPS na concentração de 1 μ g/mL, o que parece ter sido revertido no grupo co-tratado com LPS e GPNMB (Figura 25D). Não há outros estudos que investigam os níveis de transcrição de *IL-10* células da glia após o tratamento com GPNMB, mas em um estudo com células humanas primárias de fibroblastos de ligamentos periodontais (hPDLCs), a transfecção de RNAm de GPNMB parece aumentar os níveis proteicos de IL-10 após o tratamento com LPS (Song & Lin, 2019). Portanto, a influência da GPNMB nos níveis de IL-10 parece ser dependente do tipo celular, tempo ou tipo de tratamento estudado. Apesar do LPS aumentar a expressão de IL-10, essa interleucina é considerada anti-inflamatória por promover inibição da produção de moléculas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Malefyt et al., 1991), promovendo a regulação e resolução do quadro inflamatório. Portanto, os dados obtidos neste estudo sugerem que a GPNMB pode ter influência na inflamação, o que pode alterar a sua resolução nas células primárias de glia mista, porém esse experimento deve ser replicado mais vezes para confirmar este papel.

Em relação à modulação da transcrição das citocinas pró-inflamatórias, apesar de não ter sido estatisticamente significativo, a transcrição de *IL-1 β* teve uma leve tendência de aumento nos grupos tratados com LPS nas células BV-2 (Figura 24A). Nas células de glia mista originárias de cultura primária houve um aumento significativo na transcrição de *IL-1 β* somente no grupo tratado com LPS em relação aos grupos não

tratados com LPS, e o co-tratamento com LPS e GPNMB parece ter revertido parcialmente o aumento da transcrição de *IL-1 β* nesse tipo celular (Figura 25A). Esse dado sugere que a GPNMB pode ter uma função anti-inflamatória nas células de cultivo primário de glia mista frente a um outro estímulo pró-inflamatório.

Apesar de serem amplamente utilizadas em experimentos *in vitro*, as células de linhagem muitas vezes não replicam os dados obtidos em células provenientes de cultura primária. Uma característica que precisa ser observada em relação às células de linhagem é o número de passagens das células, pois após muitas replicações as células podem sofrer importantes alterações fisiológicas e morfológicas. Neste estudo, as células BV-2 foram repicadas até a 30^a passagem. As diferenças na resposta inflamatória entre células da linhagem BV-2 e células primárias de microglia foram analisadas poucas vezes na literatura, sendo que alguns estudos apontam que as células da BV-2 podem ser boas representantes da resposta inflamatória observada nas células primárias de microglia (Henn et al., 2009; Lund et al., 2006), e outros que observaram importantes diferenças após a administração de LPS, tanto na expressão de citocinas (Horvath et al., 2008), quanto no transcriptoma (Das et al., 2016). Mesmo nos estudos que concluem que há uma alta similaridade na resposta inflamatória entre células BV-2 e de microglia primária, essa resposta é menos pronunciada nas células de linhagem (Henn et al., 2009; Lund et al., 2006), o que pode explicar porque foi observada uma diferença significativa na transcrição de *IL-1 β* após a administração de LPS nas células primárias de glia mista (Figura 25A), porém não na linhagem BV-2 (Figura 24A). De fato, foi observado em um estudo anterior que, após o tratamento com LPS na concentração de 1 μ g/mL por 24 ou 48 horas, há um aumento expressivo na expressão de *IL-1 β* em células primárias da microglia, sendo que esse aumento não foi expressivo em células da linhagem BV-2 (Horvath et al., 2008).

A diferença nos níveis de RNAm de *TNF- α* entre células BV-2 e células primárias de microglia após o tratamento com LPS também já foi observado. Após o tratamento com LPS a 1 μ g/mL, houve um pequeno aumento nos níveis de RNAm de *TNF- α* em células primárias da microglia apenas após 24 horas, mas não em 48 horas, sendo que este efeito não foi observado em células BV-2 em nenhum desses tempos (Horvath et al., 2008). Neste estudo, não foi observada uma modulação na transcrição de *TNF- α*

após os tratamentos propostos em nenhum dos dois tipos celulares estudados, sendo que a expressão de *TNF- α* foi analisada após 30 minutos de tratamento (Figuras 24F e 25F). Portanto, sugere-se que a modulação da transcrição de *TNF- α* após a administração de LPS é dependente do tempo em que é analisada, sendo que o pico da sua transcrição não foi observado após 30 minutos de tratamento com LPS.

Também foram analisados os níveis de *TNF- α* liberados no meio extracelular após os tratamentos propostos neste estudo. Em células primárias, a liberação de *TNF- α* parece ter acontecido após 24 horas, mas não após 1 hora de tratamento com LPS na concentração de 1 μ g/mL, em culturas com microglia presente (microglia isolada e glia mista), e a administração de GPNMB não foi capaz de reverter esse aumento (Figuras 27A e 27C). Já em astrócitos, não parece haver uma diferença na liberação de *TNF- α* em nenhum dos tratamentos e condições estudados (Figura 27B). Em células da linhagem BV-2, houve um aumento na liberação de *TNF- α* no meio extracelular em todos os grupos tratados com LPS a 1 μ g/mL por 30 minutos (Figura 28). A administração de LPS pode ativar a via do TLR-4 e promover a resposta inflamatória tanto células da microglia quanto astrócitos, porém, o tempo do pico da expressão de cada citocina é diferente nesses tipos celulares. Após a administração de LPS i.p. na concentração de 10 μ g/mL, células da microglia tiveram o pico da expressão de RNAm de *TNF- α* após 2-4 horas da injeção, enquanto o pico de transcrição em astrócitos foi após 12 horas (Norden et al., 2015).

O aumento dos níveis de *TNF- α* pelo administração de LPS em células da linhagem BV-2 mostra que provavelmente o tratamento com LPS está sendo efetivo, porém, se forem analisados os grupos de forma individual, o LPS pode não ter sido efetivo em todos os experimentos (Figura 28). Por o aumento dos níveis de *TNF- α* só terem sido verificados no ensaio de ELISA, mas não no ensaio de RT-PCR, conclui-se que em 30 minutos de tratamento com LPS há apenas a liberação do *TNF- α* do meio intracelular ao extracelular, mas que provavelmente ainda não ocorreu o pico da transcrição do RNAm do gene *TNF- α* em células da linhagem BV-2 no tempo e concentração estudados. Em outro estudo, foi vista uma diminuição nos níveis de *TNF- α* em células que superexpressam GPNMB (por transfecção) tratadas com LPS em comparação com células vetor-nulo tratadas com LPS (Song & Lin, 2019), porém

este estudo foi realizado com hPDLCs e o tempo de tratamento com LPS foi de 24 horas.

A modulação de citocinas pró-inflamatórias pela GPNMB também já foi analisada em outros estudos, porém sendo estudada em relação à falta da expressão de GPNMB. Foi demonstrado que a falta de GPNMB, utilizando tanto um modelo animal com uma mutação no gene da GPNMB quanto um modelo *in vitro* de células de linhagem de macrófagos transfectada com siRNA de GPNMB, leva a um aumento da transcrição dos genes *IL-1 β* e *TNF- α* , na ausência e na presença de LPS (Sasaki et al., 2015). Em contraste, já foi relatado que em células BV-2 transfectadas com siRNA de GPNMB o aumento dos níveis proteicos de IL-1 β e TNF- α causado pela administração de LPS foi menor em comparação com células com níveis normais de GPNMB (Shi et al., 2014). Esses dados mostram que ainda não há clareza no papel da GPNMB em relação às citocinas pró-inflamatórias. Os dados obtidos neste estudo sugerem um papel anti-inflamatório da GPNMB devido aos dados em relação à transcrição do gene da *IL-1 β* após a administração de LPS na presença e ausência da GPNMB (Figura 25A).

O papel da GPNMB na inflamação também parece estar associado ao tipo celular estudado. A administração i.p. de LPS levou ao aumento de GPNMB na microglia de ratos adultos (Huang et al., 2012), porém o tratamento com LPS *in vitro* em células mononucleares fagocitárias derivadas do fígado levou à diminuição da expressão de GPNMB (Haralanova-Ilieva et al., 2005). Uma linhagem celular de macrófagos superexpressando GPNMB apresentou menores níveis de IL-6 e IL-12 após o tratamento com LPS (Ripoll et al., 2007), e a administração de GPNMB em astrócitos leva à diminuição dos níveis de IL-6 e iNOS após o tratamento com um mix de citocinas pró-inflamatórias (Neal et al., 2018). A transfecção de RNAm de GPNMB em hPDLCs faz com que elas apresentem menores níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12 e maiores níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 após o tratamento com LPS (Song & Lin, 2019). Esses dados sugerem um papel anti-inflamatório da GPNMB. Contudo, foi observado que a ausência da GPNMB em células BV-2 suprime o aumento nos níveis de IL-1 β , TNF- α e iNOS causado pela

administração de LPS (Shi et al., 2014), sugerindo um papel pró-inflamatório para a GPNMB.

Moléculas que interagem com a NKA, causando uma resposta celular (como os glicosídeos cardiotônicos), usualmente possuem uma característica de pré-condicionamento da resposta (Marck e Pierre, 2018). Um pré-tratamento com essas substâncias pode influenciar respostas à inflamação (Orellana et al., 2016, Kinoshita et al., 2017) e lesão aguda por isquemia/reperfusão (Belliard et al., 2013). Essa interação entre um pré-tratamento, ou um desafio prévio ao sistema, pode estar relacionado com um fenômeno chamado de hormese. Na hormese, um estímulo anterior induz uma resposta adaptativa no sistema, condicionando-o, o que leva o sistema a responder mais eficientemente a um estímulo nocivo, aumentando a resiliência do sistema biológico a injúrias futuras (Leak et al., 2018).

Para estudar se a GPNMB é capaz de ser um estímulo hormético, definimos no estudo um pré-tratamento com GPNMB em células de glia mista originárias de cultura primária (na concentração de 25ng/mL) por 30 minutos, seguido de um desafio desencadeado pelo tratamento com LPS (1µg/mL) por mais 30 minutos. Os níveis de RNAm das citocinas *IL-1β*, *IL-10* e *TNF-α* foram quantificados por RT-PCR, porém nenhuma mudança na transcrição destes genes foi observada na concentração e tempo propostos neste estudo (Figura 26). O tempo do pré-tratamento com GPNMB escolhido foi o de 30 minutos, por ser o tempo em que a GPNMB ativa as vias da ERK e da Akt em células da linhagem NSC-34 (Ono et al., 2016b), porém, esse tempo não foi o suficiente para desencadear mudanças na expressão de citocinas. Como não há estudos anteriores que realizaram o pré-tratamento com GPNMB seguido de um desafio com LPS, o tempo em que os efeitos na expressão de citocinas podem ser observados ainda não é conhecido.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a GPNMB não possui uma influência clara na viabilidade e no metabolismo celular nos tempos e concentrações estudados. Enquanto o LPS é capaz de modular o metabolismo celular, principalmente em células isoladas de microglia e astrócitos de cultura primária. Foi observado que as células de linhagem e a glia mista primária parecem ser mais resistentes aos estímulos nocivos do LPS, o que pode ser explicado pelo processo de imortalização de linhagem celular e pelas interações celulares presentes nas células de cultura mista. Além disso, o tratamento de GPNMB nas condições estudadas não ativou as vias da ERK e da Akt na cultura primária de glia mista ou em células da linhagem BV-2. No contexto inflamatório, a GPNMB parece não ter efeito na translocação do NF- κ B, porém foi observado que a administração de GPNMB juntamente com um estímulo pró-inflamatório parece levar à diminuição expressão do RNAm de *IL-1 β* co-tratado com LPS. Vale salientar que esta é a primeira evidência experimental que relata este efeito em cultura primária de glia. Esse dado corrobora estudos anteriores que mostram um papel anti-inflamatório da GPNMB, o que sugere que este efeito também se aplica às células de cultura primária. Contudo, mais experimentos nesta área seriam importantes para melhor entendermos o papel da GPNMB no contexto neuroinflamatório.

REFERÊNCIAS

- Abdelmagrid, S. M., Barbe, M. F., Rico, M. C., Salihoglu, S., Arango-hisijara, I., Selim, A. H., Anderson, M. G., Owen, T. A., Popoff, S. N., Safadi, F. F. (2008). Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function. *Experimental Cell Research*, 314(13), 2334–2351. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.006>
- Aizman, O., Aperia, A. (2003). Na,K-ATPase as a signal transducer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 986, 489–496
- Arnaiz, G. R. de L., Ordieres, M. G. L. (2014). Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. *International Journal of Biomedical Science*, 10(2), 85–102
- Bandari, P. S., Qian, J., Yehia, G., Joshi, D. D., Maloof, P. B., Potian, J., Oh, H. S., Gascon, P., Harrison, J. S., & Rameshwar, P. (2003). Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type: a transmembrane protein that is similar to neurokinin 1 interacts with substance P. *Regulatory peptides*, 111(1-3), 169–178. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(02\)00288-4](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(02)00288-4)
- Belliard, A., Sottejeau, Y., Duan, Q., Karabin, J. L., Pierre, S. V. (2013). Modulation of cardiac Na⁺, K⁺-ATPase cell surface abundance by simulated ischemia-reperfusion and ouabain preconditioning. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304(1), 94-103. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00374.2012>
- Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B., Barres, B. A. (2017). Diverse requirements for microglial survival, specification, and function revealed by defined-medium cultures. *Neuron*, 94(4), 759-773. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.043>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Camandola, S., Mattson, M. P. (2007). NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(2), 123–132. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.2.123>
- Cho, C. E., Damle S. S., Wancewicz E. V., Mukhopadhyay S., Hart C. E., Mazur C., Swayze E. E., Kamme F. (2019). A modular analysis of microglia gene expression, insights into the aged phenotype. *BMC Genomics*, 20, 164. <http://doi.org/10.1186/s12864-019-5549-9>
- Chung, J.-S., Sato, K., Dougherty, I. I., Cruz, P. D., Ariizumi, K. (2007). DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation. *Blood*, 109(10), 4320–4327. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-053769>
- Das, A., Kim, S. H., Arifuzzaman, S., Yoon, T., Chai, J. C., Lee, Y. S., Park, K. S., Jung, K. H., Chai, Y. G. (2016). Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional

responses in established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0644-1>

de Sá Lima, L., Kawamoto, E. M., Munhoz, C. D., Kinoshita, P. F., Orellana, A. M. M., Curi, R., Scavone, C. (2013). Ouabain activates NF κ B through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Neuropharmacology*, 73, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.006>

de Vasconcelos, D. I. B., Leite, J. A., Carneiro, L. T., Piuvezam, M. R., de Lima, M. R. V., de Morais, L. C. L., Rodrigues-Mascarenhas, S. (2011). Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Ouabain in Mice. *Mediators of Inflammation*, 2011, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/912925>

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 174(5), 1209–1220. <https://doi.org/10.1084/jem.174.5.1209>

Furochi, H., Tamura, S., Mameoka, M., Yamada, C., Ogawa, T., Hirasaka, K., Nikawa, T. (2007). Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Letters*, 581(30), 5743–5750. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.036>

Garcia, I. J. P., Kinoshita, P. F., de Oliveira Braga, I., Parreira, G. M., Mignaco, J. A., Scavone, C., de Lima Santos, H. (2018). Ouabain attenuates the oxidative stress induced by lipopolysaccharides in the cerebellum of rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(2), 2156–2167. <https://doi.org/10.1002/jcb.26377>

Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J. S., Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 81(6), 1285–97. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00928.x>

Geering, K. (2006). FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(2), F241–F250. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00126.2005>

Geering, K. (2008). Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 17(5), 526–532. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283036cbf>

Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. (1998). NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 225–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>

Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>

Glezer, I., Munhoz, C. D., Kawamoto, E. M., Marcourakis, T., Werneck Avellar, M. C., Scavone, C. (2003). MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF- κ B induced by LPS. *Neuropharmacology*, 45(8), 1120–1129. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00279-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00279-X)
Goehler, L. E., Erisir, A., Gaykema, R. P. A. (2006). Neural-immune interface in the rat area postrema. *Neuroscience*, 140(4), 1415–1434.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.048>

Grabert, K., McColl, B. W. (2018). Isolation and Phenotyping of Adult Mouse Microglial Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1784, 77–86.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_7

Graeber, M. B., Li, W., Rodriguez, M. L. (2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FESB Letters*. 585(23), 3798-3805. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.033>

Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(3), 1997–2007.
<https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>

Gutknecht, M., Geiger, J., Joas, S., Dörfel, D., Salih, H. R., Müller, M. R., Grünebach, F., Rittig, S. M. (2015). The transcription factor MITF is a critical regulator of GPNMB expression in dendritic cells. *Cell communication and signaling*, 13, 19.
<https://doi.org/10.1186/s12964-015-0099-5>

Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P. (2016). Endogenous Ouabain. *Hypertension*, 68(3), 526–532.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06599>

Haralanova-Ilieva, B., Ramadori, G., Armbrust, T. (2005). Expression of osteoactivin in rat and human liver and isolated rat liver cells. *Journal of hepatology*, 42(4), 565–572.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.12.021>

Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Inagaki, C. (1998). CI-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience Letters*, 254(3), 141–144

Henn, A., Lund, S., Hedtjärn, M., Schrattenholz, A., Pörzgen, P., Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 26(2), 83–94.
<https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>

Hof, P. R., Mobbs, C.V. (2000). Handbook of the neuroscience of aging. *Elsevier/Academic Press*, 2010, 1–53

Horvath, R. J., Nutile-McMenemy, N., Alkaitis, M. S., DeLeo, J. A. (2008). Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *Journal of Neurochemistry*, 107(2), 557–569. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05633.x

Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature reviews. Neurology*, 11(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.207>

Huang, J.-J., Ma, W.-J., Yokoyama, S. (2012). Expression and immunolocalization of Gpnmb, a glioma-associated glycoprotein, in normal and inflamed central nervous systems of adult rats. *Brain and Behavior*, 2(2), 85–96. <https://doi.org/10.1002/brb3.39>

Hüttenrauch, M., Ogorek, I., Klafki, H., Otto, M., Stadelmann, C., Weggen, S., Wiltfang, J., Wirths, O. (2018). Glycoprotein NMB: a novel Alzheimer's disease associated marker expressed in a subset of activated microglia. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0612-3>

Isaac, C., Mauborgne, A., Grimaldi, A., Ade, K., Pohl, M., Limatola, C., Boucher Y., Demangel, C., Guenin-Macé, L. (2017). Mycolactone displays anti-inflammatory effects on the nervous system. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006058>

Juhaszova, M., Blaustein, M. P. (1997). Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1800–1805. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1800>

Kawamoto, E. M., Munhoz, C. D., Lepsch, L. B., de Sá Lima, L., Glezer, I., Markus, R. P., Scavone, C. (2008a). Age-related changes in cerebellar phosphatase-1 reduce Na,K-ATPase activity. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1712–1720. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.008>

Kawamoto, E. M., Lepsch, L. B., Boaventura, M. F., Munhoz, C. D., Lima, L. S., Yshii, L. M., Avellar, M. C., Curi, R., Mattson, M. P., Scavone, C. (2008b). Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *Journal of neuroscience research*, 86(4), 845–860. <https://doi.org/10.1002/jnr.21548>

Kinoshita, P. F., Leite, J. A., Orellana, A. M. M., Vasconcelos, A. R., Quintas, L. E. M., Kawamoto, E. M., Scavone, C. (2016). The Influence of Na⁺, K⁺-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. *Frontiers in Physiology*, 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00195>

Kinoshita, P. F., Yshii, L. M., Orellana, A. M. M., Paixão, A. G., Vasconcelos, A. R., Lima, L. de S., Kawamoto, E. M., Scavone, C. (2017). Alpha 2 Na⁺,K⁺-ATPase silencing induces loss of

inflammatory response and ouabain protection in glial cells. *Scientific Reports*. 7(4894).
<http://doi.org/10.1038/s41598-017-05075-9>

Kinoshita, P. F., Yshii, L. M., Vasconcelos, A. R., Orellana, A. M. M., Lima, L. de S., Davel, A. P. C., Scavone, C. (2014). Signaling function of Na,K-ATPase induced by ouabain against LPS as an inflammation model in hippocampus. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 218.
<https://doi.org/10.1186/s12974-014-0218-z>

Kobayashi, M., Usui-Kawanishi, F., Karasawa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Mise, N., Takahashi, M. (2017). The cardiac glycoside ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction. *PLoS ONE*, 12(5), e0176676.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176676>

Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., Tjon, E., Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47(3), 566–581.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>

Kuan, C.-T., Wakiya, K., Dowell, J. M., Herndon, J. E., Reardon, D. A., Graner, M. W., Bigner, D. D. (2006). Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma Protein B, a Potential Molecular Therapeutic Target in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Clinical Cancer Research*, 12(7), 1970–1982.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2797>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lange, J., Haslett, L. J., Lloyd-Evans, E., Pocock J. M., Sands M. S., Williams B. P., Cooper J. D. (2018). Compromised astrocyte function and survival negatively impact neurons in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(74).
<https://doi.org/10.1186/s40478-018-0575-4>

Leak, R. K., Calabrese, E. J., Kozumbo, W. J., Gidday, J. M., Johnson, T. E., Mitchell, J. R., Ozaki, C. K., Wetzker, R., Bast, A., Belz, R. G. Bøtker, H. E., Koch, S., Mattson, M. P, Simon, R. P., Jirtle, R. L., Andersen, M. E. (2018). Enhancing and Extending Biological Performance and Resilience. *Dose-Response: a publication of International Hormesis Society*, 16(3).
<http://doi.org/10.1177/1559325818784501>

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

Lund, S., Christensen, K. V., Hedtjörn, M., Mortensen, A. L., Hagberg, H., Falsig, J., Hasseldam, H., Schrattenholz, A., Pörzgen, P., Leist, M. (2006). The dynamics of the LPS triggered

inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *Journal of neuroimmunology*, 180(1-2), 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.007>

Lynch, A. M., Murphy, K. J., Deighan, B. F., O'Reilly, J. A., Gun'ko, Y. K., Cowley, T. R., Gonzalez-Reyes, R. E., Lynch, M. A. (2010). The impact of glial activation in the aging brain. *Aging and disease*, 1(3), 262–278.

Lyons, S. A., Kettenmann, H. (1998). Oligodendrocytes and Microglia Are Selectively Vulnerable to Combined Hypoxia and Hypoglycemia Injury in Vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18(5). <https://doi.org/10.1097/00004647-199805000-00007>

Maric, G., Rose, A. A., Annis, M. G., Siegel, P. M. (2013). Glycoprotein Non-Metastatic B (GPNMB): A Metastatic Mediator and Emerging Therapeutic Target in Cancer. *OncoTargets and Therapy*, 9(6), 839-52. <http://doi.org/10.2147/OTT.S44906>

Mark, R. J., Hensley, K., Butterfield, D. A., Mattson, M. P. (1995). Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(9), 6239-6249.

Marck, P. V., Pierre, S. V. (2018). Na/K-ATPase Signaling and Cardiac Pre/Postconditioning with Cardiotonic Steroids. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2336. <https://doi.org/10.3390/ijms19082336>

Martinez, F. O., Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>

Mascarenhas, S., Leite, J., Galvão, G., & Alves, A. (2014). Effect of ouabain on NFκB and p-38 activation in macrophages: a new biotechnological application. *BMC Proceedings*, 8(4), 260. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-P260>

Maurya, P. K., Prakash, S. (2013). Decreased Activity of Ca⁺⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase during Aging in Humans. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(1), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0172-8>

Mecha, M., Iñigo, P. M., Mestre, L., Hernangómez, M., Borrell J., Guaza C. (2011). An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Scientific Protocols*. <http://doi.org/10.1038/protex.2011.218>

Michalinos A, Tsaroucha AK, Lambropoulou M, Schizas D, Valsami G, Kostomitsopoulos N, Pitiakoudis MS, Simopoulos CE. (2020). Glycoprotein non-metastatic melanoma B expression after hepatic ischemia reperfusion and the effect of silibinin. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 5(7). <http://doi.org/10.21037/tgh.2019.11.01>

Moloney, E. B., Moskites, A., Ferrari, E. J., Isacson, I., Hallett, P. J. (2018). The glycoprotein GPNMB is selectively elevated in the substantia nigra of Parkinson's disease patients and

increases after lysosomal stress. *Neurobiology of Disease*. 120, 1-11.
<http://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.08.013>

Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sørensen, T. L.-M., Petersen, J., Andersen, J. P., Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium–potassium pump. *Nature*, 450(7172), 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nature06419>

Munhoz, C. D., Sorrells, S. F., Caso, J. R., Scavone, C., Sapolsky, R. M. (2010). Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, 30(41), 13690–8. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0303-09.2010>

Murthy, M. N., Blauwendraat, C.; UKBEC, Guelfi, S.; IPDGC, Hardy, J., Lewis, P. A., Trabzuni, D. (2017). Increased brain expression of GPNMB is associated with genome-wide significant risk for Parkinson's disease on chromosome 7p15.3. *Neurogenetics*, 18(3), 121-133. <http://doi.org/10.1007/s10048-017-0514-8>

Nagahara, Y., Shimazawa, M., Tanaka, H., Ono, Y., Noda, Y., Ohuchi, K., Hara, H. (2015). Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B ameliorates skeletal muscle lesions in a SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 93(10), 1552–1566. <https://doi.org/10.1002/jnr.23619>

Nakano, Y., Suzuki, Y., Takagi, T., Kitashoji, A., Ono, Y., Tsuruma, K., Yoshimura, S., Shimazawa, M., Iwama, T., Hara, H. (2014). Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) as a novel neuroprotective factor in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neuroscience*, 277, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.065>

Neal, M. L., Boyle, A. M., Budge, K. M., Safadi, F. F., Richardson, J. R. (2018). The glycoprotein GPNMB attenuates astrocyte inflammatory responses through the CD44 receptor. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1100-1>

Noda, Y., Tsuruma, K., Takata, M., Ishisaka, M., Tanaka, H., Nakano, Y., Hara, H. (2017). GPNMB Induces BiP Expression by Enhancing Splicing of BiP Pre-mRNA during the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11828-3>

Okamoto, I., Pirker, C., Bilban, M., Berger, W., Losert, D., Marosi, C., Pehamberger, H. (2005). Seven Novel and Stable Translocations Associated with Oncogenic Gene Expression in Malignant Melanoma. *Neoplasia*, 7(4), 303–311. <https://doi.org/10.1593/neo.04514>

Onaga, M., Ido, A., Hasuike, S., Uto, H., Moriuchi, A., Nagata, K., Tsubouchi, H. (2003). Osteoactivin expressed during cirrhosis development in rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet, accelerates motility of hepatoma cells. *Journal of Hepatology*, 39(5), 779–785. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00361-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00361-1)

Ohnishi, T., Yanazawa, M., Sasahara, T., Kitamura, Y., Hiroaki, H., Fukazawa, Y., Kii, I., Nishiyama, T., Kakita, A., Takeda, H., Takeuchi, A., Arai, Y., Ito, A., Komura, H., Hirao, H., Satomura, K., Inoue, M., Muramatsu, S., Matsui, K., Tada, M., Hoshi, M. (2015). Na, K-ATPase $\alpha 3$ is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(32), E4465–E4474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421182112>

Ono, Y., Chiba, S., Yano, H., Nakayama, N., Saio, M., Tsuruma, K., Hara, H. (2016a). Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) promotes the progression of brain glioblastoma via Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 481(1–2), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.034>

Ono, Y., Tsuruma, K., Takata, M., Shimazawa, M., Hara, H. (2016b). Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B extracellular fragment shows neuroprotective effects and activates the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways via the Na⁺/K⁺-ATPase. *Scientific Reports*, 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep23241>

Orellana, A. M., Kinoshita, P. F., Leite, J. A., Kawamoto, E. M., Scavone, C. (2016). Cardiogenic Steroids as Modulators of Neuroinflammation. *Frontiers in Endocrinology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00010>

Orellana, A. M., Leite, J. A., Kinoshita, P. F., Vasconcelos, A. R., Andreotti, D. Z., de Sá Lima, L., Kawamoto, E. M., Scavone, C. (2018). Ouabain increases neural branching in hippocampus and improves spatial memory. *Neuropharmacology*, 140, 260-274. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.008>

Orellana, A. M., Vasconcelos, A. R., Leite, J. A., de Sá Lima, L., Andreotti, D. Z., Munhoz, C. D., Scavone, C. (2015). Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3 β and WNT/ β -Catenin signaling in rat hippocampus. *Aging*, 7(12), 1094–1108. <https://doi.org/10.18632/aging.100853>

Perry, V. H., Nicoll, J. A., Holmes, C. (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(4), 193–201. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>

Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(3), 557–581. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5>

Ransohoff, R. M., Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1164–1171. <http://doi.org/10.1172/JCI58644>

Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., Cummings, T. J., Kuan, C.-T., Bigner, D. D., Wang, X.-F. (2003). Bone-related Genes Expressed in Advanced Malignancies Induce Invasion and Metastasis in a Genetically Defined Human Cancer Model. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15951–15957. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211498200>

Ripoll, V. M., Irvine, K. M., Ravasi T., Sweet, M. J., Hume, D. A. (2007). Gpnmb Is Induced in Macrophages by IFN- γ and Lipopolysaccharide and Acts as a Feedback Regulator of Proinflammatory Responses. *Journal of Immunology*, 178(10), 6557-6566. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6557>

Ripoll, V. M., Meadows, N. A., Raggatt, L.-J., Chang, M. K., Pettit, A. R., Cassady, A. I., Hume, D. A. (2008). Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene*, 413(1–2), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.01.014>

Rose, A. A. N., Annis, M. G., Dong, Z., Pepin, F., Hallett, M., Park, M., Siegel, P. M. (2010). ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLoS ONE*, 5(8), e12093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012093>

Rose, A. A., Siegel, P. M. (2007). Osteoactivin/HGFIN: is it a tumor suppressor or mediator of metastasis in breast cancer? *Breast Cancer Research*, 9(6), 403. <https://doi.org/10.1186/bcr1791>

Rotunno, M. S., Bosco, D. A. (2013). An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 253. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00253>

Saade, M., Araujo de Souza, G., Scavone, C., Kinoshita, P. F. (2021) The Role of GPNMB in Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 12, 674739. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674739>

Sasaki, F., Kumagai, K., Uto, H., Takami, Y., Kure, T., Tabu, K., Nasu, Y., Hashimoto, S., Kanmura, S., Numata, M., Moriuchi, A., Sakiyama, T., Tsubouchi, H., Ido, A. (2015). Expression of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B in macrophages infiltrating injured mucosa is associated with the severity of experimental colitis in mice. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7503-7511. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4408>

Scavone, C., Munhoz, C. D., Kawamoto, E. M., Glezer, I., Lima, L. de S., Marcourakis, T., Markus, R. P. (2005). Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na,K-ATPase activity. *Neurobiology of Aging*, 26(6), 907–916. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.013>

Shi, F., Duan, S., Cui, J., Yan, X., Li, H., Wang, Y., Chen, F., Zhang, L., Liu, J., Xie, X. (2014). Induction of Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) Expression in the Microglia by Lipopolysaccharide (LPS) via Upregulation of Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma B (GPNMB) Expression. *Journal of Molecular Neuroscience*, 54(2), 234-42. <https://doi.org/10.1007/s12031-014-0280-0>

Shikano, S., Bonkobara, M., Zukas, P. K., Ariizumi, K. (2001). Molecular cloning of a dendritic cell-associated transmembrane protein, DC-HIL, that promotes RGD-dependent adhesion of endothelial cells through recognition of heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8125–8134. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008539200>

Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K., Banik, N. L. (2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*, 87(1), 10-20. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>

Sondag, G. R., Mbimba, T. S., Moussa, F. M., Novak, K., Yu, B., Jaber, F. A., Abdelmagid, S. M., Geldenhuys, W. J., Safadi, F. F. (2016). Osteoactivin inhibition of osteoclastogenesis is mediated through CD44-ERK signaling. *Experimental & molecular medicine*, 48(9), e257. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.78>

Song, R., Lin, L. (2019). Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma Protein B (GPNMB) Ameliorates the Inflammatory Response in Periodontal Disease. *Inflammation*, 42, 1170–1178. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-00977-4>

Tanaka, H., Fujita, N., Tsuruo, T. (2005). 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1-mediated I κ B Kinase β (IKKB) Phosphorylation Activates NF- κ B Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40965–40973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506235200>

Tanaka, H., Shimazawa, M., Kimura, M., Takata, M., Tsuruma, K., Yamada, M., Takahashi, H., Hozumi, I., Niwa, J.-I., Iguchi, Y., Nikawa, T., Sobue, G., Inuzuka, T., Hara, H. (2012). The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep00573>

Taya, M., Hammes, S. R. (2018). Glycoprotein Non-Metastatic Melanoma Protein B (GPNMB) and Cancer: A Novel Potential Therapeutic Target. *Steroids*, 133, 102-107. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.10.013>

van der Lienden, M. J. C., Gaspar, P., Boot, R., Aerts, J., van Eijk, M. (2018). Glycoprotein non-metastatic protein B: an emerging biomarker for lysosomal dysfunction in macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 66. <https://doi.org/10.3390/ijms20010066>

Verkhatsky, A., Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239-389. <http://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

Weterman, M. A., Ajubi, N., van Dinter, I. M., Degen, W. G., van Muijen, G. N., Rutter, D. J., Bloemers, H. P. (1995). nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts. *International Journal of Cancer*, 60(1), 73–81.

Woo, M. S., Park, J. S., Choi, I. Y., Kim, W. K., Kim, H. S. (2008). Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 106(2), 770–80. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05430.x>

Wu, L., Xiong, X., Wu, X., Ye, Y., Jian, Z., Zhi, Z. (2020). Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 28. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00028>

Xie, Z. (2003). Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 986, 497–503.

Xie, Z., Askari, A. (2002). Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, 269(10), 2434–2439.

Yu, B., Sondag, G. R., Malcuit, C., Kim, M. H., Safadi, F. F. (2016). Macrophage-Associated Osteoactivin/GPNMB Mediates Mesenchymal Stem Cell Survival, Proliferation, and Migration Via a CD44-Dependent Mechanism. *Journal of cellular biochemistry*, 117(7), 1511–1521. <https://doi.org/10.1002/jcb.25394>

Zhou, L., Zhuo, H., Ouyang, H., Liu, Y., Yuan, F., Sun, L., Liu, F., Liu, H. (2017). Glycoprotein non-metastatic melanoma protein b (Gpnmb) is highly expressed in macrophages of acute injured kidney and promotes M2 macrophages polarization. *Cellular immunology*, 316, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.03.006>