

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

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-1β*. 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.

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).

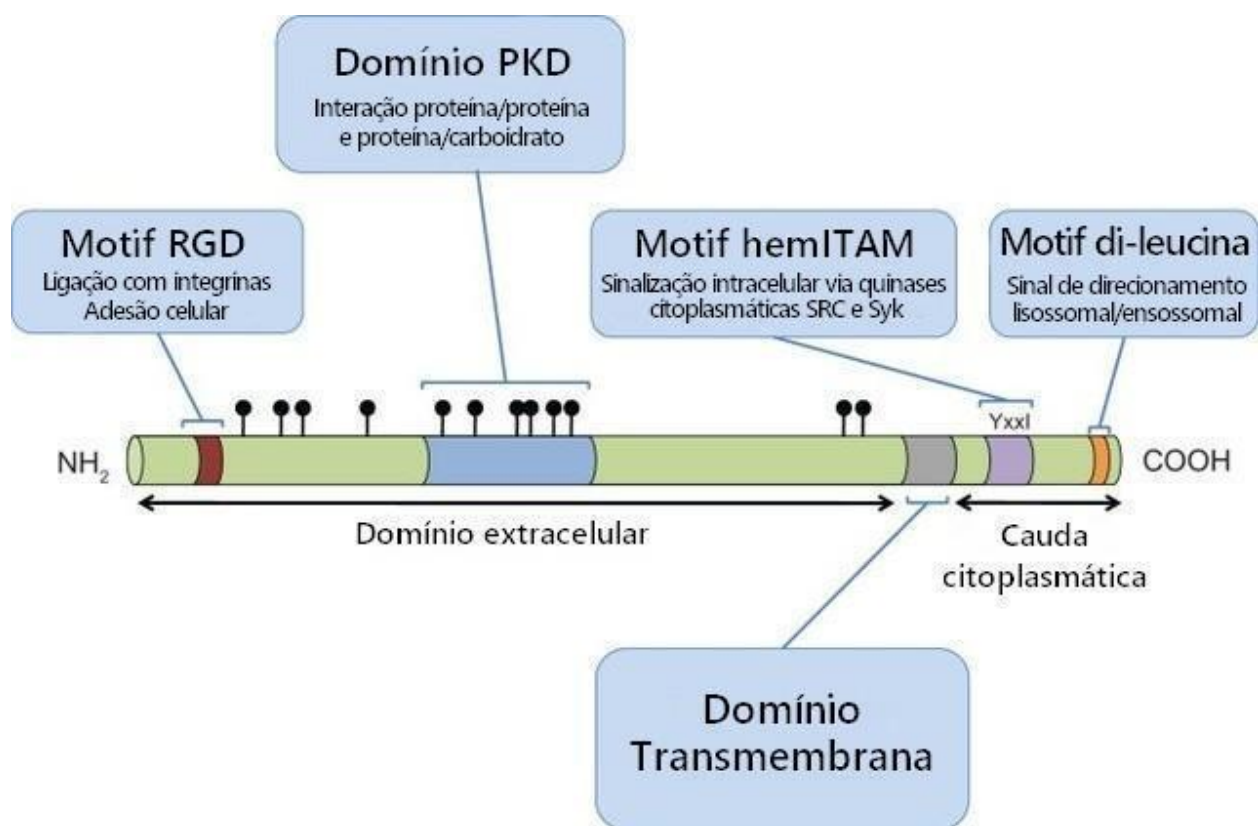


Figura 1. Representação da glicoproteína GPNMB. Figura mostrando os sítios de glicosilação, domínios, motifs e terminais da glicoproteína GPNMB. Traduzido de Maric et al, 2013.

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 -Amiloide (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 FXYD. 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 FXYD 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).

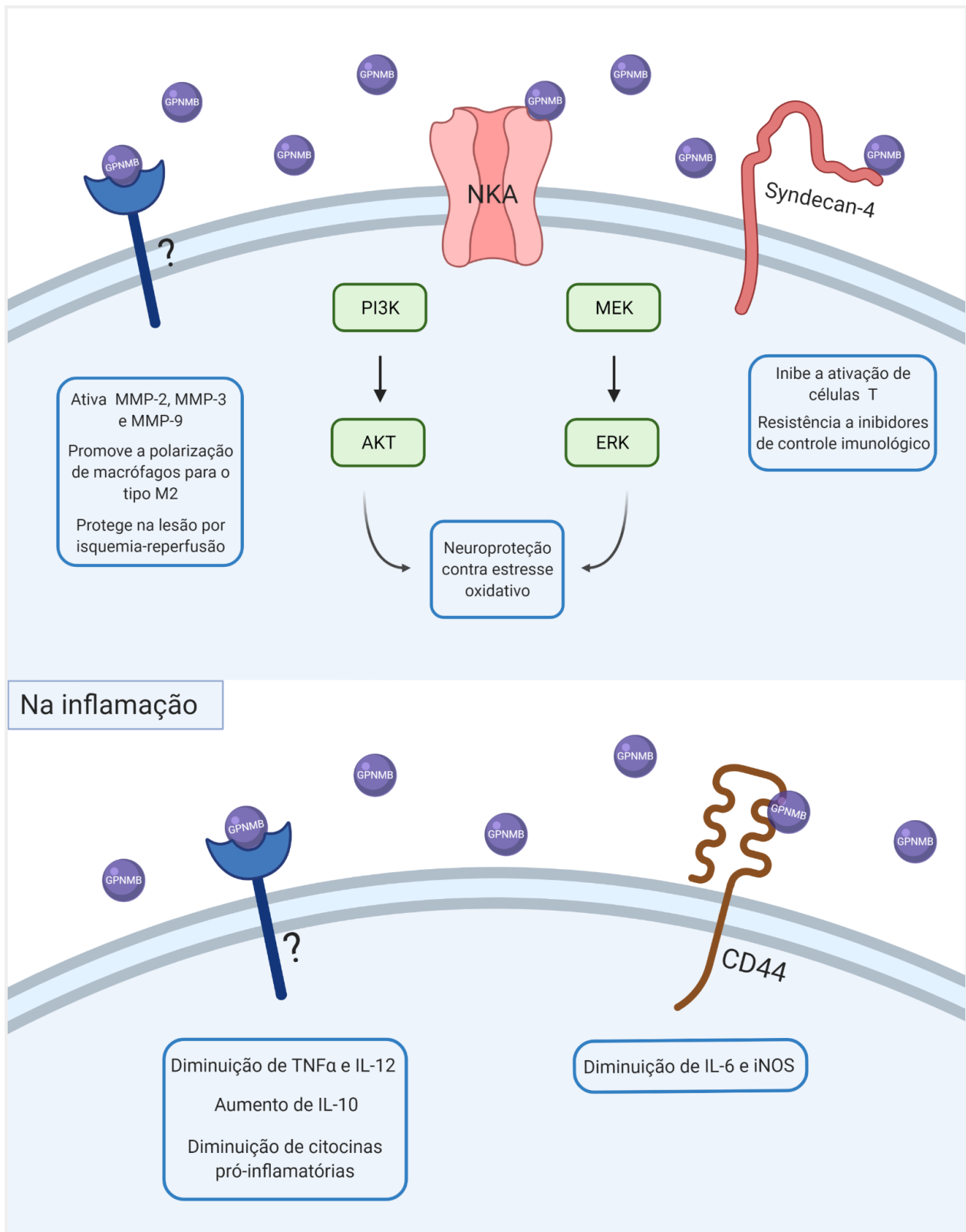


Figura 2. Esquema da sinalização intracelular desencadeada pela GPNMB em condições fisiológicas e inflamatórias. Após a clivagem pela ADAM10, a fração extracelular solúvel da GPNMB pode interagir com diversos receptores e outras moléculas, algumas ainda não conhecidas, e ativar uma resposta que leva 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).

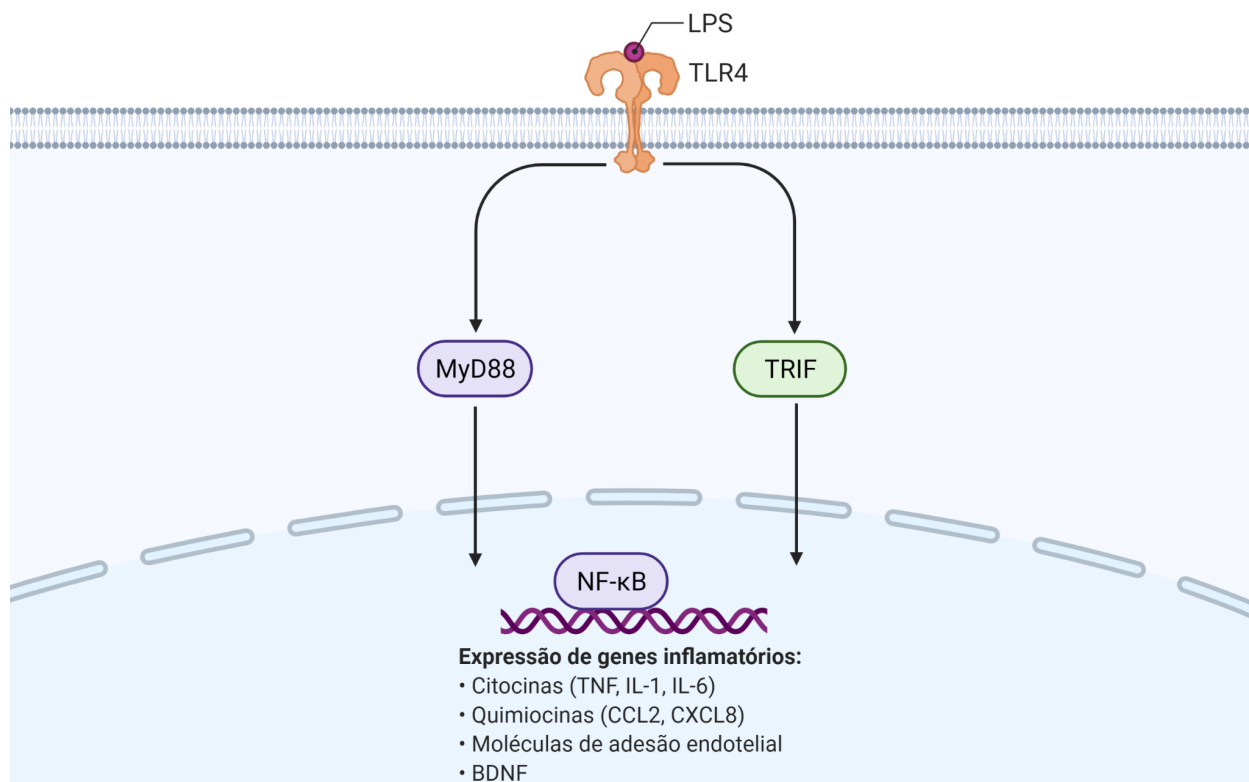


Figura 3. Mecanismo de ação do LPS via sinalização do TLR. A ligação do LPS no TLR ativa as proteínas MyD88 e TRIF, que resultam na ativação do NF- κ B. O NF- κ B, por sua vez, favorece a transcrição de genes envolvidos com o processo inflamatório e adaptativo. Esta figura foi adaptada e traduzida de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

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- κ B 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. 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>