

AMANDA GALVÃO DA PAIXÃO

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

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe

Versão Corrigida.

São Paulo

2018

RESUMO

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

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

Palavras-chave: PTEN. Neuroinflamação. Células gliais.

ABSTRACT

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

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

Key-words: PTEN. Neuroinflammation. Glial cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neuroinflamação

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

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

Astrócitos e micróglia inspecionam e são altamente sensíveis a perturbações em seu microambiente, onde atuam no controle da resposta imune no SNC, na remoção de restos celulares e na homeostase tecidual, desempenhando um papel crucial à defesa e ao reparo tecidual frente à neuroinflamação (revisado em SOFRONIEW, 2015b; revisado em KIELIAN, 2014). Tanto astrócitos quanto micróglia podem se tornar reativos para responder a essas perturbações e, em conjunto com neurônios e células não-neurais, ativam mecanismos celulares e moleculares com potencial pró- ou anti-inflamatório dependendo do estímulo de ativação (revisado em FARINA; ALOISI; MEINL, 2007).

No caso da micróglia, em condições saudáveis, esta célula permanece em estado de repouso, assumindo uma morfologia ramificada. A micróglia pode ser ativada por estímulos pró-inflamatórios como padrões moleculares associados ao

patógeno (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs) e, em resposta a estes estímulos, assume uma morfologia do tipo ameboide, a qual facilita seu deslocamento através do tecido (TORRES-PLATAS et al., 2014)

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

Enquanto a ativação microglial prolongada e a consequente liberação excessiva de elementos pró-inflamatórios podem ser tóxicas aos neurônios, a atividade microglial, por outro lado, também pode levar à resolução da resposta inflamatória via espectro de ativação do tipo M2 (revisado em HENEKA; KUMMER; LATZ, 2014). Este fenótipo de ativação microglial pode estimular a expressão gênica para codificar a secreção de citocinas anti-inflamatórias - IL-4 e IL-10 -, receptores de superfície, como o *cluster* de diferenciação (CD)206, enzimas como a arginase (arg)-1 e proteínas de defesa antioxidante, como superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GSR) (revisado em CARNIGLIA et al., 2017; CHHOR et al., 2013; revisado em ROJO et al., 2014).

1.2. PTEN: sinalização, função e localização subcelular

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

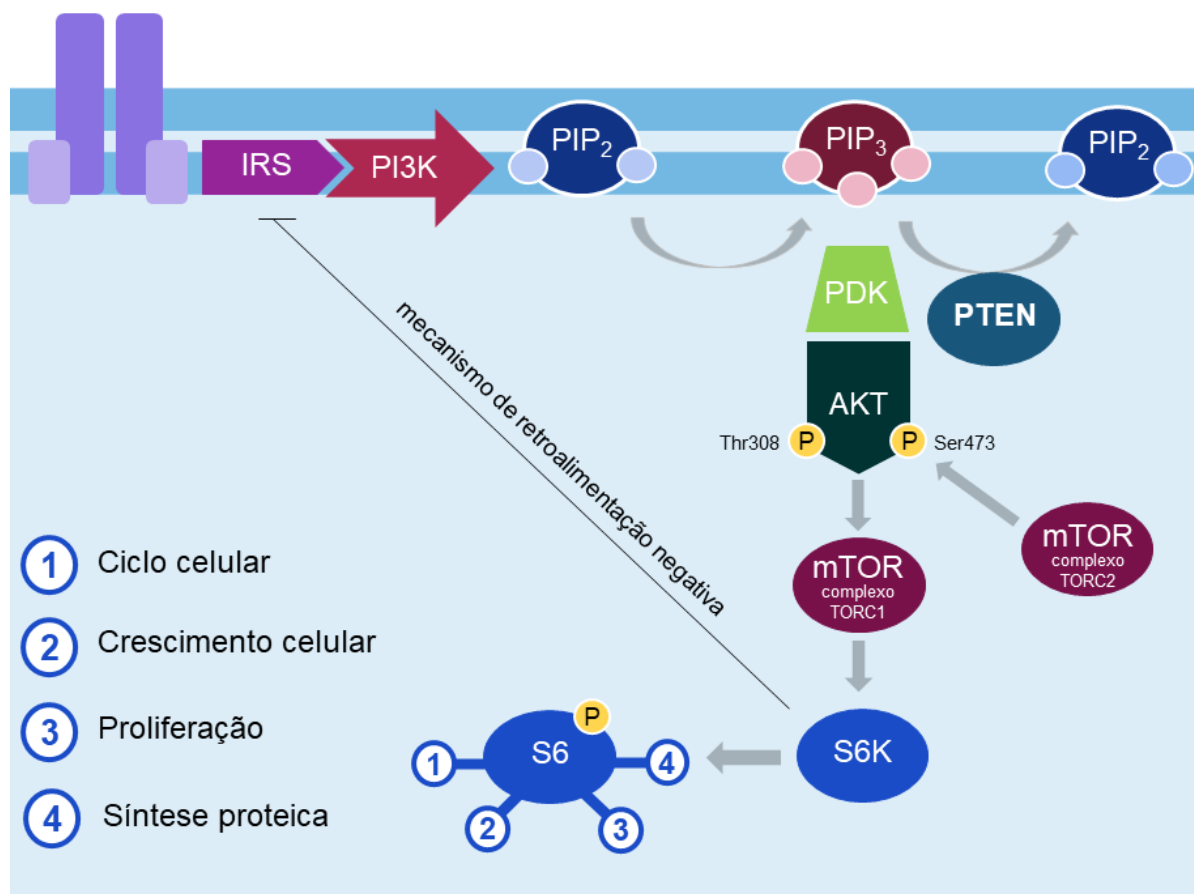
Outrora proposta exclusivamente como fosfatase citoplasmática, hoje se sabe que o conjunto de funções da PTEN vai além de sua atividade de fosfatase, e, eventualmente, dependente de sua localização entre os diferentes compartimentos celulares. Evidências crescentes sustentam a ideia de que a PTEN seja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

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

Interessantemente, um estudo conduzido em células U87MG (PTEN^{null}) revelou que a PTEN pode se comportar diferentemente no citosol e no núcleo. A inserção de PTEN em células PTEN^{null} removeu os níveis de PIP₃ da membrana plasmática,

contudo, o mesmo efeito não foi observado quanto aos níveis nucleares, mesmo após transfecção exclusivamente nuclear da PTEN na célula (LINDSAY et al., 2006). Ademais, a PTEN nuclear desempenha um importante papel em processos associados à estabilidade do genoma, atuando no reparo de DNA, na integridade cromossomal, senescência e ciclo celular, bem como é capaz de regular diversos outros processos via interação proteína-proteína, como, por exemplo, o crescimento celular e a transcrição gênica via interação com o fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta AMP (CREB) (revisado em CHEN; GUO, 2017; BASSI et al., 2013; GU et al., 2011).

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



Receptores do tipo tirosina quinase, como o receptor de insulina, uma vez ativados levam à fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e conseqüentemente da PI3K, ativando-a. Como quinase, a PI3K converte o PIP₂ em PIP₃, propiciando o acoplamento da quinase dependente de fosfoinosítídeo (PDK) à AKT, a qual é fosforilada, ativando elementos posteriores da via, como o complexo mTORC1 e a S6 quinase (S6K). Esta, por sua vez, leva à fosforilação de seu substrato, a S6. Além disso, a S6K participa de um mecanismo de retroalimentação negativa à fosforilação do IRS e conseqüentemente reduz a sinalização da

via PI3K/AKT. A PTEN, como fosfatase, converte o substrato PIP₃ em PIP₂, inibindo a via da AKT. Fonte: Adaptado de COSTA, 2017.

1.3. PTEN e inflamação

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

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

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

Desta forma, embora o conjunto de descobertas relacionadas à PTEN esteja distribuído em vasta literatura científica ao longo das últimas décadas, as descobertas atuais ainda são limitadas e apontam para um papel dual da PTEN frente ao processo inflamatório. Assim, o presente estudo buscou responder à seguinte pergunta: quais os possíveis efeitos da PTEN sobre a neuroinflamação em células gliais? Este trabalho se baseou na hipótese de que a resposta ao LPS e a localização subcelular da PTEN possam estar modificadas em células gliais cuja PTEN esteja inibida, de modo que a célula deficiente em PTEN seja capaz de expressar um padrão gênico e proteico diferencial comparado às células com a PTEN funcional, com conseqüente desregulação de citocinas inflamatórias, enzimas antioxidantes, genes associados à

inflamação e translocação citoplasma-núcleo da PTEN, assim, a sinalização e a compartimentalização da PTEN seriam essenciais à resposta inflamatória no SNC. Por fim, este trabalho encaminha respostas que podem aprofundar a compreensão dos efeitos da PTEN sobre a neuroinflamação, as doenças associadas à deleção e mutação da PTEN, as doenças neurodegenerativas e, agregado a estudos futuros, pode contribuir ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as condições supracitadas.

2. CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

- AOYAMA, D. et al. Involvement of TGF β -Induced Phosphorylation of the PTEN C-Terminus on TGF β -Induced Acquisition of Malignant Phenotypes in Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81133, 22 nov. 2013.
- BASSI, C. et al. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. **Science**, 2013.
- BASSI, C.; STAMBOLIC, V. PTEN, here, there, everywhere. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 12, p. 1595–1596, 11 dez. 2013.
- BAYASCAS, J. R.; ALESSI, D. R. Regulation of Akt/PKB Ser473 Phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 18, n. 2, p. 143–145, abr. 2005.
- BONONI, A. et al. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca²⁺ signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 12, p. 1631–1643, 28 dez. 2013.
- BONONI, A.; PINTON, P. Study of PTEN subcellular localization. **Methods**, v. 77, p. 92–103, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976b.
- BRAGANHOL, E. et al. Nucleotide receptors control IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 secretions as well as proliferation in human glioma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 1, p. 120–130, jan. 2015.
- COSTA, João Victor Cabral. **Efeitos modulatórios da PTEN sobre a cognição e a plasticidade sináptica em camundongos submetidos a intervenções não farmacológicas: a dieta intermitente e o exercício físico**. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/D.42.2017.tde-24112017-142910. Acesso em: 2018-08-30.
- CALDWELL, R. B. et al. Arginase: an old enzyme with new tricks. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 395–405, jun. 2015.
- CARNIGLIA, L. et al. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–23, 2017.
- CARSON, M. J. et al. CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 48–65, out. 2006.
- CHEN, L.; GUO, D. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 7, p. 581–589, 26 jul. 2017.

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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