CAROLINA PARGA MARTINS PEREIRA

O PAPEL DA MICROGLIA NO MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

Co-orientadora: Prof. Dra. Nadja C. de Souza Pinto

Versão Original

São Paulo

2019

RESUMO

Pereira, C. P. M. **O papel da microglia no modelo da doença de Parkinson induzido pela 6-hidroxidopamina.** Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A doença de Parkinson (DP) é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum em idosos e é caracterizada pela presença de disfunções motoras decorrentes da redução de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc). Uma das principais neurotoxinas utilizadas para o estudo de DP em modelos animais é a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que possui como mecanismo de neurotoxicidade a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A liberação de EROs pela NADPH oxidase (Nox) e a ativação microglial constituem os eventos iniciais da neurodegeneração induzida pela 6-OHDA. A Nox2 está relacionada com a modulação dos fenótipos microgliais e encontra-se superativada na DP, levando a um desequilíbrio redox e a danos celulares. A microglia é o principal componente da defesa imune no sistema nervoso central (SNC) e é dependente do receptor fator 1 estimulador de colônias (CSF1R) para a sobrevivência. O inibidor de CSF1R é utilizado como método para depletar microglia em modelos de neurodegeneração e, consequentemente, compreender o impacto da sua eliminação no processo da doença. Baseado nisso, foram propostas duas abordagens para compreender o papel da microglia na progressão da DP induzida pela 6-OHDA, sendo que o primeiro investigou a modulação da ativação microglial pela Nox2 em camundongos nocautes para a subunidade $gp91^{phox}$, enquanto que o segundo avaliou o impacto da depleção por meio do tratamento com 1200mg/Kg de PLX5622, um tipo de inibidor de CSF1R. Os animais naïves $gp91^{phox-/-}$ apresentaram aumento da proliferação de microglias e da expressão da enzima iNOS. Quando submetidos à 6-OHDA, os nocautes não apresentaram declínio motor em função do tempo avaliado pelo teste do cilindro, devido à maior sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na SNpc em relação aos selvagens (WT). Um dos possíveis fatores relacionados à perda expressiva de neurônios nos WT foi a indução precoce da enzima iNOS, sugerindo que a ativação de Nox2 conjuntamente com iNOS na microglia aumenta os níveis de EROs tornando os neurônios mais susceptíveis à morte celular. Também foram observadas modulações temporais distintas entre os grupos com relação à expressão de CD86 e Arginase-1, além dos nocautes apresentarem baixos níveis de

lesões oxidativas no DNA mitocondrial quando comparado com os WT. Assim, a ativação da Nox2 e da iNOS parecem atuar em sinergia no processo neurodegenerativo causado pela 6-OHDA. Por outro lado, os resultados com PLX5622 mostraram que a depleção microglial acelera o comprometimento da coordenação motora e da bradicinesia avaliado pelo teste do poste, bem como reduz o número de neurônios dopaminérgicos na SNpc. Além disso, a redução de células postivas para GFAP, do marcador CD68 e da regulação de genes ligados a microglia foram observados. O gene MeCP2, que está relacionado à via nigroestriatal e que consiste em um importante modulador da expressão de TH, está pouco expresso no grupo submetido à depleção microglial e à 6-OHDA. Esses achados sugerem que a deficiência na comunicação entre microglias e astrócitos, bem como a redução do nível de transcritos do gene MeCP2 causados pela depleção microglial, podem contribuir para a aceleração do processo neurodegenerativo causado pela 6-OHDA.

Palavras-chave: Microglia. Doença de Parkinson. 6-OHDA. NADPH oxidase. CSF1R.

ABSTRACT

Pereira, C. P. M. **Microglial role in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine**. Thesis (PhD thesis in Human Physiology) – Biomedical Sciences Institute, Sao Paulo University, Sao Paulo, 2019.

Parkinson's disease (PD) is considered the second most common neurodegenerative disease in elderly people and is characterized by the presence of motor impairment, which is a consequence of dopaminergic neuron loss in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc). A major neurotoxin used for PD study in animal models is 6-hydroxydopamine (6-OHDA), which exerts neurotoxic effects through the production of reactive oxygen species (ROS). ROS release by the enzyme NADPH oxidase (Nox) and microglial activation are early events of neurodegeneration induced by 6-OHDA. Nox2 is related to modulation of microglia phenotypes and is overactivated in PD, which can lead to redox imbalance and cellular damage. Microglial cells are the main components of immune defense in the central nervous system and are dependent upon Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) for survival. The CSF1R inhibitor is used with a tool to deplete microglia in models of neurodegenerative diseases and, consequently, to understand the impact of its elimination in the disease process. Based on that, we proposed two approaches to evaluate the microglial role in the PD progression induced by 6-OHDA, in which the first one investigated the modulation of microglial activation by Nox2 in $gp91^{phox}$ knockout mice, whereas the second one evaluated the impact of microglial depletion through a treatment with 1200 mg/Kg of PLX5622, one type of CSF1R inhibitor. The $gp91^{phox-/-}$ naïve mice showed an increase of microglia proliferation and in the iNOS expression. When the knockout mice were submitted to 6-OHDA, they did not have motor impairments as a function of toxin exposure as evaluated by cylinder test. This result is due to the increase number of dopaminergic neurons survival in SNpc compared to wild type (WT). One of the possible factors involved in neurons death in WT was the early iNOS induction, which indicates that Nox2 and iNOS simultaneous activation in microglial cells enhance ROS levels, leading to neurons more vulnerable to cell death. Moreover, the expression of CD86 and Arginase-1 have differences in temporal modulation between both groups, as well as knockout mice showed

lower levels of oxidative damage in mitochondrial DNA when compared with WT. Thus, the activation of Nox2 and iNOS could act sinergically in the neurodegenerative process caused by 6-OHDA.On the other hand, results with PLX5622 indicated that the microglial depletion aggravates the impairment of bradykinesia and motor coordination evaluated by pole test, as well as the reduction of tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons in the SNpc. Moreover, the decrease of GFAP positive cells, of CD68 marker and regulation of genes linked to microglia were observed. The MeCP2 gene, related to the nigrostriatal pathway and an important modulator of TH expression, is down-regulated in the group with microglial elimination and submitted to 6-OHDA. These findings suggest that the deficiency of crosstalk between astrocytes and microglia, as well as the reduced MeCP2 transcript levels may contribute to the acceleration of neurodegenerative process initiated by 6-OHDA.

Keywords: Microglia. Parkinson’s disease. 6-OHDA. NADPH oxidase. CSF1R.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Doença de Parkinson

O envelhecimento populacional ocorre de maneira acelerada, e segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (1), o número de idosos (acima de 60 anos) em 2030 irá superar o número de crianças (menores de 15 anos de idade) em torno de 4 milhões. Em 2050, essa diferença passará para 35,8 milhões, totalizando nesse ano 64,1 milhões de idosos no Brasil. A alta proporção de idosos resulta em consequências diretas aos sistemas de saúde pública, como o aumento dos custos dos tratamentos médico-hospitalares decorrentes, principalmente, do aumento da incidência e prevalência das doenças associada à idade como, por exemplo, a doença de Parkinson.

A doença de Parkinson (DP) é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum, ficando apenas depois da doença de Alzheimer (DA). Em países de alto poder econômico, as taxas de incidência anuais estabelecidas por idade média consistem em 14 por 100.000 pessoas na população total e 160 por 100.000 pessoas com mais de 65 anos de idade (2). Além disso, estima-se que o número de pessoas com DP em 2030 será maior que 50% em relação ao número de 2005 (3). A fase inicial da doença é rara antes dos 50 anos de idade e sua incidência aumenta significativamente após os 60 anos (4). Em um estudo realizado na cidade de Bambuí, no estado de Minas Gerais, os autores identificaram uma prevalência da DP de 3,3% em uma população com idade média de 73,5 ± 6,9 anos (5).

Em 1817, James Parkinson descreveu os sintomas da paralisia agitante no artigo intitulado "*An essay on the shaking palsy*", que posteriormente foi denominada como Doença de Parkinson por Jean-Martin Charcot (6). A DP é considerada, do ponto de vista clínico, como uma condição neuropatológica progressiva lenta, caracterizada pelo tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Contudo, esses sintomas clínicos apenas se manifestam quando a ocorrência de morte neuronal é em torno de 70-80% (7). A demência pode ocorrer em aproximadamente 20% a 60% dos indivíduos com DP, e é mais comum naqueles indivíduos mais idosos ou com um quadro mais severo

da doença. O termo demência pode ser definido como declínio de memória associado ao comprometimento de pelo menos outra função cognitiva (linguagem, gnosia, praxia ou funções executivas), com intensidade suficiente para causar um impacto significativo nas atividades sócio-ocupacionais do indivíduo. A demência associada à DP é caracterizada por lentidão motora e cognitiva, disfunção executiva e comprometimento na recuperação da memória (8).

Do ponto de vista neuropatológico, a DP é caracterizada pela redução de projeções dopaminérgicas no estriado, devido à degeneração neuronal na substância negra *pars compacta* (SNpc). Também é caracterizada pela presença de corpos e neuritos de Lewy (9). Os corpos e neuritos de Lewy também são encontrados em outras regiões cerebrais como no núcleo motor dorsal do vago, no núcleo basal de Meynert e no *locus coeruleus* (10). O estudo de Spillantini e colaboradores (11) demonstrou que os corpos e neuritos de Lewy de amostras cerebrais de pacientes com DP apresentaram forte imunorreatividade para α-sinucleína, indicando que modificações nessa molécula são responsáveis pela formação desses achados neuropatológicos.

A α-sinucleína (α-syn) é uma proteína de 14kDa constituída por 140 aminoácidos. Está localizada tanto em terminais pré-sinápticos e núcleo (12) quanto no citosol e em algumas membranas celulares como a membrana do retículo endoplasmático associado à mitocôndria (13). Existem, até o momento, seis tipos diferentes de mutações *missense* (p.A53T, p.A30P, p.E64K, p.H50Q, p.G51D, p.A53E) no gene que codifica a α-sinucleína (SNCA) que são determinantes no desenvolvimento da forma autossômica dominante da DP. A função dessa proteína ainda não está estabelecida, porém evidências sugerem que está relacionada com sua capacidade de interagir diretamente com membranas fosfolipídicas, em particular com vesículas da neurotransmissão sináptica (14).

Outros genes que estão associados à forma autossômica dominante da DP são: LRRK2, VPS35, EIF4G1, DNAJC13 e CHCHD2. LRRK2 codifica a *leucine-rich repeat kinase 2,* uma proteína com vários domínios que apresenta importantes funções no crescimento neurítico, na morfogênese sináptica, no tráfego de membrana, na autofagia, na síntese proteica e no sistema imune inato. Já mutações nos genes Parkin, PINK1 e DJ-1, que são importantes para

o bom funcionamento da mitocôndria, correspondem à forma recessiva da DP e está associada ao seu início precoce (idade anterior aos 40 anos)(15).

Entretanto, cerca de 90% dos casos diagnosticados não são familiares e sim esporádicos, indicando a importância de fatores ambientais para o início dessa doença (16). Um fator ambiental que aumenta o risco de DP é a exposição a pesticidas, como por exemplo: o paraquat, a rotenona e pesticidas organoclorados. Por possuírem propriedades lipofílicas, estas moléculas atravessam a barreira hemato-encefálica, e causam a morte neuronal dopaminérgica por meio do aumento dos níveis de estresse oxidativo que pode ocorrer via bloqueio de complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e/ou via ativação microglial (17).

1.2. Núcleos da Base e a Fisiopatologia da DP

A execução do movimento voluntário depende do processamento correto das informações sensório-motoras no cérebro, sendo que esse processo envolve uma rede neural complexa entre o córtex motor, os núcleos da base e o tálamo (18). Os núcleos da base consistem em: neoestriado (núcleo caudado e putâmen - CPu), segmentos externo e interno do globo pálido (GPe e GPi), os núcleos subtalâmicos (NST) e a substância negra (SN).

O estriado é composto em sua maior parte por projeções de neurônios espinhosos médios (MSN) que utilizam o ácido γ-amino-butírico (GABA) como neurotransmissor, bem como por projeções de neurônios dopaminérgicos. Esse núcleo da base é a principal estrutura que recebe impulsos nervosos na circuitaria dos gânglios da base e recebe projeções glutamatérgicas de todas as áreas corticais. Os principais alvos dessa estrutura são o globo pálido e a substânica negra *pars reticulata* (SNr) (18).

A SN é classificada em *pars reticulata* e *pars compacta*. A SNpc contém neurônios que possuem neuromelanina e apresentam como neurotransmissor a dopamina (18). Os principais receptores das projeções nigrais são o CPu, GP e NST. Já a SNr está localizada ventralmente e adjacente a SNpc, e contém neurônios GABAérgicos. Suas projeções inibitórias são enviadas principalmente ao núcleo ventral anterior e ventral lateral do tálamo (19).

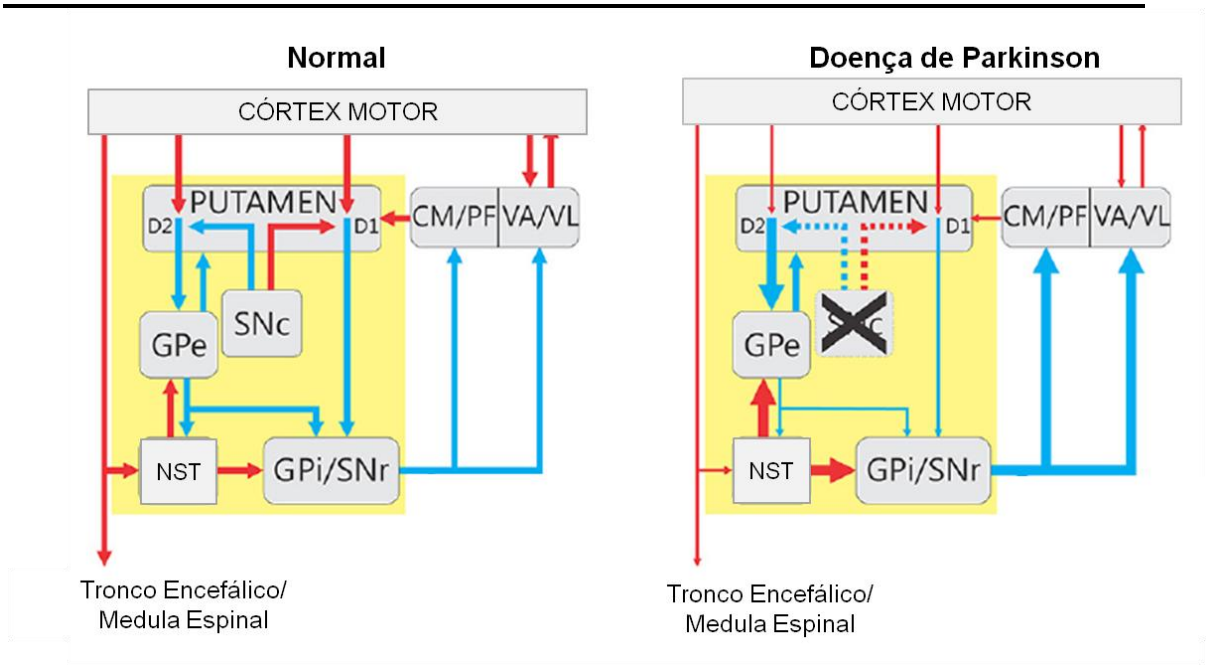
A ocorrência do movimento depende de dois circuitos que são conhecidos como via direta e indireta. A via direta corresponde à ativação cortical por meio

da liberação de glutamato e posterior ativação de MSN do estriado que se projetam para a SNr e o GPi. Os MSNs são GABAérgicos, ou seja, exercem uma ação inibitória nos neurônios da SNr e do GPi, que também são GABAérgicos. Essa inibição do SNr/GPi leva a desinibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo que apresentam projeções para o córtex motor. Assim, a via direta favorece o movimento (Figura 1) (20, 21). Já a via indireta corresponde aos MSNs do estriado que se conectam ao SNr/GPi por meio do GPe e do NST. Os MSNs estriatais inibem os neurônios GABAérgicos do GPe, levando a desinibição dos neurônios glutamatérgicos do NST, que por sua vez, ativam os neurônios GABAérgicos do SNr/GPi que se projetam para o tálamo. A inibição do tálamo possibilita a redução do movimento (revisado em (20, 21)).

Além disso, o estriado recebe uma densa inervação de neurônios dopaminérgicos da SNpc que atua como um importante modulador da atividade estriatal. Os MSNs da via direta e indireta são caracterizados por expressar diferentes receptores dopaminérgicos, sendo que o receptor D1 é expresso na direta e o D2 na indireta. Como esses receptores estão acoplados a diferentes proteínas G, sua ativação leva a distintas respostas bioquímicas. A ativação do receptor D1 aumenta a excitabilidade dos MSNs da via direta, facilitando a potenciação de longa duração (LTP) das sinapses glutamatérgicas, enquanto que a ativação do receptor D2 reduz a excitabilidade da via indireta, promovendo a depressão de longa duração (LTD) nas sinapses corticais (22). A diferente modulação das sinapses pelos receptores dopaminérgicos nas vias direta e indireta desencadeia a redução da inibição da projeção dos neurônios talamocorticais, possibilitando a ocorrência do movimento (21).

Na DP, a perda dos neurônios dopaminérgicos na SNpc resulta em respostas distintas nos MSNs estriatais da via direta e indireta. A redução dos níveis de dopamina na via direta leva a diminuição da atividade dos neurônios, enquanto que na via indireta ocasiona a hiperatividade. Consequentemente, o GPe é inibido pelo estriado, possibilitando a desinibição dos neurônios do NST e posterior excitação do GPi e SNr. O aumento da atividade de GPi e SNr é reforçado pela ausência da inibição dos neurônios da via direta. Dessa forma, há um aumento da inibição do tálamo, impedindo a ocorrência da atividade locomotora (21).

Figura 1. Via direta e indireta do circuito motor.



A imagem da esquerda indica os circuitos que estão presentes no estado normal, enquanto que a da direita esquematiza as vias que estão comprometidas na Doença de Parkinson. As setas azuis e vermelhas correspondem às conexões inibitórias e excitatórias, respectivamente. Além disso, as espessuras das setas indicam a força da sua atividade e a caixa amarela representa as interligações dos núcleos da base que recebem as conexões das regiões talâmicas e corticais. Abreviações: **D1** e **D2 =** subtipos de receptores dopaminérgicos; **GPe**= Globo Pálido Externo; **GPi**= Globo Pálido Interno; **NST**= Núcleo Subtalâmico; **SNc**= Substância negra *pars compacta*; **SNr**=Substância negra *pars reticulata*; **CM**= Núcleo talâmico centromedial; **PF** = Núcleo talâmico parafascicular; VA= núcleo subtalâmico ventral anterior; **VL** = núcleo subtalâmico ventrolateral.
Fonte: Adaptado de (21)

1.3. Modelos animais de DP

O desenvolvimento de modelos animais para a DP é fundamental para a compreensão da patogênese, dos mecanismos responsáveis pela progressão da doença e também para testar estratégias terapêuticas. Atualmente, os modelos animais de DP mais bem caracterizados são: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), paraquat e rotenona. Todas essas toxinas apresentam como característica comum a morte seletiva de neurônios dopaminérgicos por meio do estresse oxidativo (23).

A 6-OHDA é um análogo hidrolisado da dopamina, foi a primeira neurotoxina de neurônios dopaminérgicos descoberta e é a mais utilizada tanto em ensaios *in vivo* quanto *in vitro* (24, 25). Como essa molécula não atravessa

a barreira hemato-encefálica, o estudo dos seus efeitos só é possível por meio de injeções intracerebrais. Ungerstedt (26) foi o primeiro a testar o efeito da injeção de 6-OHDA no CPu e na SN em ratos e descobriu que essa droga degenera tanto os terminais nervosos quanto os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal. Quando essa toxina é administrada unilateralmente no estriado, ocorre a perda dos terminais nigroestriatais com posterior degeneração retrógrada e progressiva dos corpos dopaminérgicos na SNpc, sendo essa redução significativa após uma e duas semanas das injeções (27).

Essa molécula foi considerada um potencial fator neurotóxico na patogênese de DP devido às evidências do seu acúmulo em urinas de pacientes com DP tratados com L-dopa (28), uma vez que sua formação *in vivo* ocorre por meio da hidroxilação não enzimática da dopamina na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 (29). Os mecanismos responsáveis pela morte celular de neurônios dopaminérgicos por meio da administração de 6-OHDA ainda não estão totalmente estabelecidos, porém o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão envolvidos. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocorrer por dois mecanismos, sendo eles: a deaminação pela Monoamina Oxidase (MAO) (30) e a auto-oxidação (31). O processo de auto-oxidação compreende a reação espontânea da 6-OHDA com o oxigênio, levando a formação de quinona e H_2O_2 (32). Nas fases intermediárias dessa reação é gerado o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que atua como o catalisador da auto-oxidação (33). O $O_2^{\bullet-}$ pode gerar outras espécies reativas como, por exemplo, o radical hidroxila (OH•) a partir da reação com o H_2O_2 (33). Dessa forma, a auto-oxidação de 6-OHDA gera três produtos tóxicos para o neurônio, que são: a quinona, o H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ (33). Além disso, verificou-se que a indução por 6-OHDA reduz a atividade de algumas enzimas antioxidantes, como a glutationa (GSH) e a superóxido dismutase (SOD), aumentando assim, o dano oxidativo (34).

Outro mecanismo pelo qual a toxina pode causar um desequilíbrio redox é a sua ação como um inibidor direto dos complexos I e IV da cadeia respiratória de elétrons mitocondrial, levando a deficiência na respiração mitocondrial e consequente morte celular (35). Apesar desses dois mecanismos de ação não estarem ligados, eles agem sinergicamente durante o processo

neurodegenerativo (36). Rodriguez-Palhares e colaboradores (25) sugeriram que a ativação microglial e a liberação de EROs da NADPH oxidase (Nox) constituem os eventos iniciais da neurodegeneração induzida pela 6-OHDA, além de atuarem em sinergia com a neurotoxina para induzir a morte celular de neurônios dopaminérgicos nos estágios iniciais da lesão.

A utilização do modelo de 6-OHDA para estudar a DP é vantajosa, visto que consiste em um procedimento pouco complexo e de baixo custo, bem como apresenta alta reprodutibilidade com reduzida variabilidade individual (37). Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a versatilidade, uma vez que pode ser induzida uma neurodegeneração completa e imediata quando são realizadas injeções de 6-OHDA na SN ou uma neurodegeneração parcial e progressiva quando a indução é no CPu. Ademais, a indução unilateral, também conhecida como modelo de hemiparkinsonismo, permite o estudo de intervenções terapêuticas e de mecanismos moleculares utilizando como controle o hemisfério intacto do mesmo animal (37). Entretanto, esse modelo não mimetiza algumas características clínicas e patológicas da DP em humanos, tais como: a não ocorrência da formação de corpos de Lewy; a ausência do comprometimento de outras áreas cerebrais como estruturas anteriores olfatórias; e a pouca recorrência de estudos reportando tremores em repouso em roedores, apesar de existirem relatos de acinesia e rigidez (36).

1.4. Microglia

O mecanismo que leva a progressão crônica das doenças neurodegenerativas ainda é inconclusivo. Entretanto, uma das características compartilhadas por vários tipos de doenças neurodegenerativas é a presença da neuroinflamação. Atualmente, a neuroinflamação é aceita como uma “faca de dois gumes” (38), uma vez que evidências apontam que a neuroinflamação exerce papéis prejudiciais nas doenças neurodegenerativas (39, 40), enquanto que outros estudos indicam que a inflamação é crucial para a recuperação em certas circunstâncias (41, 42). Gao e Hong (43) sugeriram que o processo inflamatório descontrolado é determinante para a progressão da DP e de outras doenças neurodegenerativas. Análises *post-mortem* de cérebros de pacientes com DP revelaram a presença de microglia ativada e aumento de mediadores

inflamatórios na SN, sugerindo assim, o envolvimento da inflamação na doença (44).

A microglia, um subtipo de célula glial, é o principal componente da defesa imune intrínseca no sistema nervoso central (SNC). No SNC totalmente desenvolvido, a microglia é numerosa e distribuída por todo o parênquima cerebral. Pio Del Rio Hortega foi o primeiro a reconhecer a importância dessa célula em condições patológicas, foi responsável por nomeá-la e também propôs que a microglia era originada da invasão de elementos mesodermais no SNC, tendo como potencial fonte as células mononucleares do sangue (45). Entretanto, foi proposto que as células progenitoras da microglia encontram-se no saco vitelino e que durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, células microgliais que expressam o marcador mitótico PCNA são responsáveis pela proliferação das microglias que ocuparão todo o parênquima cerebral (46). Outro estudo mostrou que durante o processo ontogenético embrionário, progenitores eritromielóides $CD45^-$ $c\text{-}Kit^+$ do saco vitelino são os precursores microgliais e essas células passam por maturação e diferenciação via estágios CX_3CR1^- e CX_3CR1^+. Além disso, o processo de desenvolvimento microglial requer metaloproteinases de matriz, como MMP-8 e MMP-9, importantes para a expansão microglial, bem como envolve a presença de Irf8 e Pu.1 (47).

A morfologia típica da microglia humana consiste em células com vários processos pequenos e finos que abrangem uma extensa área e que se prolongam no ambiente circundante, promovendo assim uma boa localização para detectar e monitorar as alterações do ambiente local, como a presença de patógenos ou dano celular (48). Essa morfologia, que é conhecida como “ramificada”, era identificada no passado como um estado inativo ou de “repouso” da célula glial (49). Entretanto, Nimmerjahn (50) mostrou que os processos da microglia estão em movimento em cérebros de camundongos, como se essas células estivessem constantemente monitorando o microambiente. Por outro lado, quando a microglia detecta a presença de corpos estranhos ou dano celular, ela torna-se ativada ou no estado “não-ramificado”, com retração dos processos para o corpo celular. A retração completa dos processos origina a forma nomeada como ameboide em que a microglia encontra-se com alta mobilidade e fagocítica (51).

Como a microglia apresenta muitas proteínas em comum com os macrófagos, sua identificação precisa no parênquima cerebral é uma das dificuldades de se estudar seu comportamento tanto em modelos saudáveis quanto em modelos de doenças. Dentre os marcadores microgliais mais utilizados atualmente destacam-se OX42 (CD11b), Iba-1, CD68 e TMEM119. CD11b é uma subunidade do receptor de complemento tipo 3, que está localizado na membrana plasmática de neutrófilos, fagócitos mononucleares e células NK (*natural killer*) (52). Apesar de essa proteína não ser específica para a microglia, é utilizada para detectar a forma ativada dessas células (52). Iba-1 (Molécula 1 adaptadora ligante de cálcio ionizado) é uma proteína de peso molecular de 17kb, com 147 aminoácidos e pertencente ao grupo de proteínas ligantes de cálcio. Pouco é conhecido sobre a função dessa proteína, mas parece estar relacionada com a reorganização do citoesqueleto e alteração da conformação de processos que ocorrem durante a fagocitose (52). Uma das vantagens desse anticorpo é a estabilidade entre espécies dos epítopos antigênicos (52) e a desvantagem consiste em não ser específico a microglia, marcando também macrófagos (53). Na microglia, esse anticorpo marca a forma ramificada, ativada e ameboide (53, 54). Já CD68 (*Cluster of differentiation* 68) reconhece a macrosialina de murinos, que é uma proteína transmembrana glicosilada de cadeia pesada e pertencente à família LAMP (*Lysosomal associated membrane glycoprotein*) (55). Essa proteína é expressa intracelularmente em endossomos tardios de macrófagos e da microglia (55, 56) e sua função está associada ao metabolismo lisossomal e à atividades fagocíticas (55, 57). É utilizada principalmente como marcador secundário de microglia ativada (52). TMEM119 é uma proteína transmembrana de função desconhecida e específica da superfície celular microglial, não sendo expressa em macrófagos ou outras células neuronais (58). Em um estudo com cérebros humanos, TMEM119 co-localizou com as células microgliais marcadas com Iba-1 e CD68 em amostras de indivíduos com DA, não sendo expressa nos macrófagos infiltrantes na presença de lesões desmielizantes da esclerose múltipla. Entretanto, essa proteína está relacionada com o fenótipo M0 (microglia residente), uma vez que o número de células TMEM119+ não se altera entre indivíduos com DA e sem a doença, além de não expressarem marcadores dos tipos de ativação microglial (M1 e M2)(59).

A microglia expressa diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *pattern-recognition receptors*), que podem ser classificados em: padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) que reconhecem moléculas de microorganismos, e padrões moleculares associados a dano tecidual ou DAMPs (*tissue damage–associated molecular patterns*) que reconhecem produtos liberados por células danificadas, agregados peptídicos, entre outros (60). Um dos principais PAMPs presentes na microglia são os TLRs (*Tool-like receptors*) que além de reconhecer moléculas de vírus e bactérias, reconhecem moléculas endógenas como produtos metabólicos e agregados de proteínas disfuncionais como o peptídeo beta-amilóide (60).

A partir do reconhecimento de determinado patógeno ou de moléculas provenientes de danos no tecido cerebral, a microglia altera seu estado de repouso (M0) para o estado de ativação. A classificação desses fenótipos de ativação é similar à dos macrófagos. A ativação pode ser classificada em dois tipos de fenótipos: M1 ou ativação clássica e M2 ou ativação alternativa (49, 61). Os macrófagos M1 e M2 diferem nos seguintes aspectos: tipos de receptores, expressão de citocinas e de quimiocinas, e funções efetoras (62).

A ativação clássica ou M1 é caracterizada pela resposta à presença de micro-organismos e é mediada por citocinas derivadas de células Th1, como por exemplo: IFN-γ (Interferon-γ), TNF-α (Fator de necrose tumoral α) e IL-1β. Sua ativação é responsável pela liberação de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, STAT3, IL-6, IL-12, IL-1β e IL-23, bem como ativação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), da Nox e liberação de intermediários tóxicos correspondentes, como EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (62, 63).Esse perfil de ativação é considerado neurotóxico e pró-inflamatório (64).

A ativação alternativa ou M2 descreve as atividades anti-inflamatórias e de cicatrização (64). É induzida por citocinas derivadas de células Th2 e pela regulação positiva de receptores de manose. O receptor de manose pode se ligar na superfície de vírus, bactérias e fungos, promovendo sua fagocitose. A ativação por citocinas de células Th2 está envolvida em uma variedade de processos patológicos e fisiológicos, como por exemplo: homeostase, inflamação, alergia, doenças malignas e reparo tecidual (49). Esse tipo de

ativação libera altos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4, IL-13, e TGF-β, e baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias. O tipo M2 pode ser classificado em: **M2a**, **M2b** e **M2c**. O tipo **M2a** é responsável pela resolução da inflamação e fagocitose. São induzidos pela IL-4, IL-13, YM1 (chitinase-like 3), e ARG1 (arginase-1). O tipo **M2b** é responsável pela degradação de EROs e ERNs liberadas durante a ativação M1 e são induzidas pela exposição combinada de complexos imunes e agonistas TLR ou IL-1R. Esse tipo expressa IL-10 e CCL1. O tipo **M2c** exerce importante função no reparo e no remodelamento tecidual (cicatrização), bem como na supressão de respostas imunes. São induzidos pela IL-10 e expressam CCL16, CCL17, CCL18, CXCL13, CCR2 e CCR5 (65).

Apesar da ativação microglial estar relacionada a aspectos deletérios da inflamação crônica no SNC, ela desempenha importantes papéis para a manutenção da homeostase cerebral. Durante o desenvolvimento embrionário, a ativação microglial é fundamental para a poda sináptica (66), a ocorrência da apoptose neuronal (67) e para a retirada de *debris* celulares. Além disso, é fundamental para a imunidade inata e defesa imunológica, bem como para algumas funções regulatórias, como: auxilia na orientação de células-tronco neurais para as áreas que apresentam danos celulares (68); exerce influência na diferenciação de células-tronco (68); regula a plasticidade sináptica (69) e promove o suporte neurotrófico (70).

Além disso, a classificação da ativação M1 e M2 vem sendo discutida atualmente, uma vez que essa classificação é importante para definir as atividades da microglia *in vitro*; entretanto, nos estudos *in vivo,* existe viés na identificação dos tipos de fenótipos (64). Estudos de transcriptoma mostraram que a ativação é variável e contexto dependente, sendo que em modelos de neurodegeneração, a microglia expressa tanto fatores neurotóxicos quanto neuroprotetores (71).

1.5. Ativação microglial na DP

A presença de depósitos de *debris* relacionados ao envelhecimento, bem como de agregados proteicos e proteínas disfuncionais nas doenças neurodegenerativas leva a ativação das PRRs na microglia (72). Além das PRRs, receptores purinérgicos podem ser ativados por nucleotídeos

extracelulares, como ATP e UTP, e por nucleosídeos que são liberados por células danificadas. A ativação da microglia leva a liberação de EROS e ERNs pela Nox, iNOS e mieloperoxidase (72).

A presença de microglia ativada na SNpc e no estriado em amostras *post-mortem* de pacientes com DP foi primeiro descrita por McGeer e colaboradoes em 1988 (44). Imamura e colaboradores (73) mostraram que microglias positivas para o MHC-II (*major histocompatibility complex class II*), que são importantes para a apresentação de antígenos para células T CD4+, estão distribuídas pelo sistema nigroestriatal, límbico e cortical de cérebros com DP. Além disso, esses autores verificaram que as microglias ativadas estavam associadas a corpos de Lewy e com neuritos danificados(73). Já o trabalho de Croisier e colaboradores (74) mostrou que não houve uma correlação entre a presença de microglias MHCII positivas e os parâmetros clínicos da doença, porém observou uma correlação negativa entre a presença de CD68 e a progressão da DP, sugerindo que o aumento da fagocitose no início da DP está associada à destruição tecidual.

Com relação aos diferentes fenótipos de ativação microglial em amostras cerebrais de DP, um estudo demonstrou aumento de iNOS, ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2) em microglias ameboides da SN (75), enquanto outro observou o aumento da expressão de CD23 em microglias da SN de cérebros de indivíduos com DP. Esta proteína é expressa quando há a liberação da citocina IFN-γ e potencializada com a presença de IL-1β e TNF-α. A expressão de CD23 resulta no aumento da produção de óxido nítrico (NO) gerada a partir da ativação de iNOS, que consequentemente regula a liberação de TNF-α e eleva a presença de ERNs, que são prejudiciais aos neurônios dopaminérgicos (76).

Por outro lado, a análise de diferentes interleucinas no soro ou no fluido cerebroespinal ventricular de indivíduos com DP mostrou um aumento significativo tanto de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-12,IL-10) quanto de pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α, INF-γ) nesses pacientes quando comparados com o grupo controle (77, 78).

Baseado nesses achados pode-se observar a dificuldade de definir o papel que os diferentes fenótipos microgliais desempenham na progressão da

DP, bem como sugerir que os tipos microgliais coexistem e que algumas alterações no seu perfil podem acelerar o processo de neurodegeneração (79).

5 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos nos dois capítulos desse trabalho, pode-se concluir que:

- A ausência da subunidade gp91^{phox} da Nox2 impediu a morte expressiva dos neurônios dopaminérgicos e, por conseguinte, protegeu os animais de um declínio motor. A partir dos resultados da ativação microglial em função do processo neurodegenerativo, pode-se afirmar que a ativação precoce da enzima iNOS conjuntamente com a da Nox2 na microglia dos animais selvagens aumenta os níveis de EROs, tornando o neurônio mais susceptível à morte celular causada pela 6-OHDA.

- Com relação ao estudo que verificou o impacto da depleção microglial por meio da inibição de CSF1R (PLX5622) no processo neurodegenerativo causado pela 6-OHDA, pode-se inferir que a ausência da microglia acelerou a morte dos neurônios dopaminérgicos, levando a um déficit motor significativo. Alguns dos fatores que podem ter contribuído para isso foram: a redução na comunicação entre microglia e astrócitos; e a diminuição do nível dos transcritos do gene MeCP2, que está relacionado a via nigroestriatal.

REFERÊNCIAS[1]

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2009 [updated 2009; cited 2013 02 de dezembro]; Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/indic_sociosaude/2009/indicsaude.pdf.

2. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. Lancet Neurol. 2016 Nov;15(12):1257-72.

3. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. Neurology. 2007 Jan 30;68(5):384-6.

4. de Lau LMLaB, M.B.M. Epidemiology of Parkinson's disease Lancet Neurology 2006;5:525-35.

5. Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MC, Guerra HL, Lima-Costa MF, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). Mov Disord. 2006 Jun;21(6):800-8.

6. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. Nat Rev Neurol. 2013 Jan;9(1):13-24.

7. Schapira AH. Science, medicine, and the future: Parkinson's disease. BMJ. 1999 Jan 30;318(7179):311-4.

8. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* Washington, D.C. : American Psychiatric Association; 1994 [cited.

9. Vajda FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. J Clin Neurosci. 2002 Jan;9(1):4-8.

10. Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. J Neuropathol Exp Neurol. 1996 Mar;55(3):259-72.

11. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 26;95(11):6469-73.

---

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals: sample references. 2003 [atualizado em 02 de maio de 2018]. Disponível em: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

12. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. J Neurosci. 1988 Aug;8(8):2804-15.
13. Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rub C, Liu Y, Magrane J, Becker D, et al. alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. J Neurosci. 2014 Jan 1;34(1):249-59.

14. Recasens A, Dehay B. Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. Front Neuroanat. 2014;8:159.

15. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. Lancet. 2015 Aug 29;386(9996):896-912.

16. Lesage S, Brice A. Role of mendelian genes in "sporadic" Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2011 Jan;18 Suppl 1:S66-70.

17. Taetzsch T, Block ML. Pesticides, microglial NOX2, and Parkinson's disease. J Biochem Mol Toxicol. 2013 Feb;27(2):137-49.

18. Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2000 Sep;62(1):63-88.

19. Oertel WH, Mugnaini E. Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. Neurosci Lett. 1984 Jun 29;47(3):233-8.

20. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. Nat Neurosci. 2014 Aug;17(8):1022-30.

21. Galvan A, Devergnas A, Wichmann T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. 2015 Front Neuroanat.9:5.

22. Surmeier DJ, Graves SM, Shen W. Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. Curr Opin Neurobiol. 2014 Dec;29:109-17.

23. Przedborski S, Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. Antioxid Redox Signal. 2005 May-Jun;7(5-6):685-93.

24. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2001 Oct;65(2):135-72.

25. Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Munoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH

oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. J Neurochem. 2007 Oct;103(1):145-56.

26. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur J Pharmacol. 1968 Dec;5(1):107-10.

27. Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. Neuroscience. 1994 Mar;59(2):401-15.

28. Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. Neurochem Res. 1993 Nov;18(11):1175-7.

29. Linert W, Herlinger E, Jameson RF, Kienzl E, Jellinger K, Youdim MB. Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen--their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta. 1996 Aug 23;1316(3):160-8.

30. Salonen T, Haapalinna A, Heinonen E, Suhonen J, Hervonen A. Monoamine oxidase B inhibitor selegiline protects young and aged rat peripheral sympathetic neurons against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. Acta Neuropathol. 1996;91(5):466-74.

31. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Munoz-Patino AM, Labandeira-Garcia JL. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. J Neurochem. 2000 Apr;74(4):1605-12.

32. Heikkila R, Cohen G. Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. Science. 1971 Jun 18;172(3989):1257-8.

33. Heikkila RE, Cohen G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. Science. 1973 Aug 3;181(4098):456-7.

34. Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. Brain Res Bull. 1992 Nov;29(5):699-701.

35. Glinka YY, Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. Eur J Pharmacol. 1995 Mar 16;292(3-4):329-32.

36. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. Cell Tissue Res. 2004 Oct;318(1):215-24.

37. Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. Parkinsonism Relat Disord. 2008;14 Suppl 2:S124-9.

38. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. Neuron. 2002 Aug 1;35(3):419-32.

39. Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. J Pharmacol Exp Ther. 2003 Jan;304(1):1-7.

40. Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Di Monte DA. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. Neurobiol Dis. 2007 Feb;25(2):392-400.

41. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. Neuroscience. 2007 Jul 29;147(4):867-83.

42. Schwartz M, Ziv Y. Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies. Trends Immunol. 2008 May;29(5):211-9.

43. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends Immunol. 2008 Aug;29(8):357-65.

44. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. Neurology. 1988 Aug;38(8):1285-91.

45. Wirenfeldt M, Babcock AA, Vinters HV. Microglia - insights into immune system structure, function, and reactivity in the central nervous system. Histol Histopathol. 2011 Apr;26(4):519-30.

46. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. Brain Res Dev Brain Res. 1999 Nov 18;117(2):145-52.

47. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. Nat Neurosci. 2013 Mar;16(3):273-80.

48. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci. 2007 Nov;10(11):1387-94.

49. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013 Feb;39(1):3-18.

50. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 2005 May 27;308(5726):1314-8.

51. Brown GC, Vilalta A. How microglia kill neurons. Brain Res. 2015 Dec 2;1628(Pt B):288-97.

52. Korzhevskii DE, Kirik OV. Brain microglia and microglial markers. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2016;46(3):284-90.

53. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 1;57(1):1-9.

54. Sasaki A. Microglia and brain macrophages: An update. Neuropathology. 2016 Oct;37(5):452-64.

55. Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. J Biol Chem. 1993 May 5;268(13):9661-6.

56. da Silva RP, Gordon S. Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. Biochem J. 1999 Mar 15;338 (Pt 3):687-94.

57. Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. J Neuroinflammation. 2011;8:174.

58. Bennett ML, Bennett FC, Liddelow SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Mar 22;113(12):E1738-46.

59. Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, et al. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. Neuropathology. 2015 Feb;36(1):39-49.

60. Saijo K, Crotti A, Glass CK. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. Glia. 2012 Jan;61(1):104-11.

61. Varnum MM, Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2012 Aug;60(4):251-66.

62. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. J Immunol. 2008 Sep 15;181(6):3733-9.

63. Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. Biochem Soc Trans. 2007 Nov;35(Pt 5):1119-21.

64. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017 Apr 26;35:441-68.

65. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004 Dec;25(12):677-86.

66. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science. 2011 Sep 9;333(6048):1456-8.

67. Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. Neuron. 2004 Feb 19;41(4):535-47.

68. Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15983-8.

69. Zhong Y, Zhou LJ, Ren WJ, Xin WJ, Li YY, Zhang T, et al. The direction of synaptic plasticity mediated by C-fibers in spinal dorsal horn is decided by Src-family kinases in microglia: the role of tumor necrosis factor-alpha. Brain Behav Immun. 2010 Aug;24(6):874-80.

70. Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM. Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. J Neurochem. 2004 Jul;90(1):89-101.

71. Wes PD, Holtman IR, Boddeke EW, Moller T, Eggen BJ. Next generation transcriptomics and genomics elucidate biological complexity of microglia in health and disease. Glia. 2015 Feb;64(2):197-213.

72. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. Annu Rev Physiol. 2016 Feb 10;79:619-43.

73. Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. Acta Neuropathol. 2003 Dec;106(6):518-26.

74. Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. J Neuroinflammation. 2005 Jun 3;2:14.

75. Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. Mol Cell Neurosci. 2000 Dec;16(6):724-39.

76. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, et al. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999 May 1;19(9):3440-7.

77. Brodacki B, Staszewski J, Toczylowska B, Kozlowska E, Drela N, Chalimoniuk M, et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. Neurosci Lett. 2008 Aug 22;441(2):158-62.

78. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1996 Jun 14;211(1):13-6.

79. Joers V, Tansey MG, Mulas G, Carta AR. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. Prog Neurobiol. 2016 Aug;155:57-75.

80. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007 Jan;87(1):245-313.

81. Cahill-Smith S, Li JM. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. Br J Clin Pharmacol. 2014 Sep;78(3):441-53.

82. Sorce S, Krause KH. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. Antioxid Redox Signal. 2009 Oct;11(10):2481-504.

83. Hernandes MS, Britto LR. NADPH oxidase and neurodegeneration. Curr Neuropharmacol. 2012 Dec;10(4):321-7.

84. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol. 2004 Mar;4(3):181-9.

85. Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, Kanterewicz BI, Wu GY, Quinn MT, et al. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. Mol Cell Neurosci. 2005 May;29(1):97-106.

86. Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. Antioxid Redox Signal. 2014 Jun 10;20(17):2815-37.

87. Ejlerskov P, Christensen DP, Beyaie D, Burritt JB, Paclet MH, Gorlach A, et al. NADPH oxidase is internalized by clathrin-coated pits and localizes to a Rab27A/B GTPase-regulated secretory compartment in activated macrophages. J Biol Chem. 2012 Feb 10;287(7):4835-52.

88. Lelli A, Gervais A, Colin C, Cheret C, Ruiz de Almodovar C, Carmeliet P, et al. The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial

chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. Glia. 2013 Sep;61(9):1542-55.

89. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. Front Aging Neurosci.2010 March; 2:12.

90. Lull ME, Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. Neurotherapeutics. 2010 Oct;7(4):354-65.

91. Gao HM, Liu B, Hong JS. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. J Neurosci. 2003 Jul 16;23(15):6181-7.

92. Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, et al. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):6145-50.

93. Hernandes MS, Cafe-Mendes CC, Britto LR. NADPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in parkinsonian mice. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:157857.

94. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, et al. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20766-71.

95. Hernandes MS, Santos GD, Cafe-Mendes CC, Lima LS, Scavone C, Munhoz CD, et al. Microglial cells are involved in the susceptibility of NADPH oxidase knockout mice to 6-hydroxy-dopamine-induced neurodegeneration. PLoS One. 2013;8(9):e75532.

96. Paxinos G, Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. New York Academic Press; 2007.

97. Mann A, Chesselet M. Chapter 8 - Techniques for Motor Assessment in Rodents Movement Disorders (Second Edition) 2014:139-57.

98. Lee CS, Sauer H, Bjorklund A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by instrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Neuroscience. 1996 Jun;72(3):641-53.

99. Tillerson JL, Cohen AD, Philhower J, Miller GW, Zigmond MJ, Schallert T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. J Neurosci. 2001 Jun 15;21(12):4427-35.

100. Scharllet T, Tillerson JL. Intervention Strategies for Degeneration of Dopamine Neurons in Parkinsonism: Optimizing Behavioral Assessment of Outcome. In: Emerich DFDI, R. L.; Sanberg, P. R., editor. Central Nervous System Diseases. New York Humana Press Inc; 2000.

101. Kovalenko OA, Santos JH. Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. Curr Protoc Hum Genet. 2009 Jul;Chapter 19:Unit 19 1.

102. Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res. 1986 Jul 2;377(1):147-54.

103. Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. J Neurochem. 2009 Aug;110(3):966-75.

104. Stott SR, Barker RA. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. Eur J Neurosci. 2014 Mar;39(6):1042-56.

105. Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. Antioxid Redox Signal. 2006 May-Jun;8(5-6):929-47.

106. Schappi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. Semin Immunopathol. 2008 Jul;30(3):255-71.

107. Pomilio C, Pavia P, Gorojod RM, Vinuesa A, Alaimo A, Galvan V, et al. Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Abeta internalization. Hippocampus. 2015 Feb;26(2):194-210.

108. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. Glia. 2000 Jan 1;29(1):1-13.

109. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(12).

110. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. Nat Med. 1999 Dec;5(12):1403-9.

111. Mander P, Brown GC. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. J Neuroinflammation. 2005 Sep 12;2:20.

112. Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. Brain Res. 1970 Dec 18;24(3):485-93.

113. Robinson TE, Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. Neuropharmacology. 2004;47 Suppl 1:33-46.

114. Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. Behav Brain Res. 2005 Jul 1;162(1):1-10.

115. Glajch KE, Fleming SM, Surmeier DJ, Osten P. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. Behav Brain Res. 2012 May 1;230(2):309-16.

116. Heuer A, Smith GA, Lelos MJ, Lane EL, Dunnett SB. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. Behav Brain Res. 2012 Mar 1;228(1):30-43.

117. Na SJ, DiLella AG, Lis EV, Jones K, Levine DM, Stone DJ, et al. Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Neurochem Res. 2010 May;35(5):761-72.

118. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Ore MV, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. Brain Behav Immun. 2013 Aug;32:70-85.

119. Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos Dos Santos R, Gaestel M, David S. TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. Neuron. 2014 Sep 3;83(5):1098-116.

120. Vasilevko V, Ghochikyan A, Holterman MJ, Agadjanyan MG. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD4+ T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA. DNA Cell Biol. 2002 Mar;21(3):137-49.

121. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. J Neuroimmune Pharmacol. 2009 Dec;4(4):399-418.

122. Choi SH, Aid S, Kim HW, Jackson SH, Bosetti F. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. J Neurochem. 2012 Jan;120(2):292-301.

123. Sanders LH, Timothy Greenamyre J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. Free Radic Biol Med. 2013 Sep;62:111-20.

124. Hegde ML, Gupta VB, Anitha M, Harikrishna T, Shankar SK, Muthane U, et al. Studies on genomic DNA topology and stability in brain regions of Parkinson's disease. Arch Biochem Biophys. 2006 May 15;449(1-2):143-56.

125. Sanders LH, McCoy J, Hu X, Mastroberardino PG, Dickinson BC, Chang CJ, et al. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 2014 Oct;70:214-23.

126. Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. PLoS One. 2011;6(10):e26317.

127. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat Immunol. 2012 Jun 24;13(8):753-60.

128. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. Science. 2008 May 09;320(5877):807-11.

129. Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. Neuron. 2014 Apr 16;82(2):380-97.

130. Dagher NN, Najafi AR, Kayala KM, Elmore MR, White TE, Medeiros R, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. J Neuroinflammation. 2015 Aug 01;12:139.

131. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MR, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-beta pathology. Brain. 2016 Apr;139(Pt 4):1265-81.

132. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. Brain Res. 2001 Aug 03;909(1-2):187-93.

133. Sriram K, Miller DB, O'Callaghan JP. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. J Neurochem. 2006 Feb;96(3):706-18.

134. Domercq M, Matute C. Neuroprotection by tetracyclines. Trends Pharmacol Sci. 2004 Dec;25(12):609-12.

135. Moller T, Bard F, Bhattacharya A, Biber K, Campbell B, Dale E, et al. Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor. Glia. 2016 Oct;64(10):1788-94.

136. Scheuer T, Brockmoller V, Blanco Knowlton M, Weitkamp JH, Ruhwedel T, Mueller S, et al. Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline. Glia. 2015 Oct;63(10):1825-39.

137. Keller AF, Gravel M, Kriz J. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. Exp Neurol. 2010 Mar;228(1):69-79.

138. Rice RA, Pham J, Lee RJ, Najafi AR, West BL, Green KN. Microglial repopulation resolves inflammation and promotes brain recovery after injury. Glia. 2017 Mar 02.

139. Molina-Luna K, Pekanovic A, Rohrich S, Hertler B, Schubring-Giese M, Rioult-Pedotti MS, et al. Dopamine in motor cortex is necessary for skill learning and synaptic plasticity. PLoS One. 2009 Sep 17;4(9):e7082.

140. Mann A, Chesselet M. Chapter 8 - Techniques for Motor Assessment in Rodents. Moviment Disorders (Second Edition). 2014:139-57.

141. Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. J Neurosci Methods. 1997 Apr 25;73(1):45-8.

142. Neely KM, Green KN, LaFerla FM. Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a gamma-secretase-independent manner. J Neurosci. 2011 Feb 23;31(8):2781-91.

143. Elmore MR, Lee RJ, West BL, Green KN. Characterizing newly repopulated microglia in the adult mouse: impacts on animal behavior, cell morphology, and neuroinflammation. PloS one. 2015;10(4):e0122912.

144. Rabinowitz SS, Gordon S. Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. J Exp Med. 1991 Oct 1;174(4):827-36.

145. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. Nat Neurosci. 2014 Jan;17(1):131-43.

146. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. J Neurochem. 2011 Aug 24.

147. Kalogeropulou AF, Zhao J, Bolliger MF, Memou A, Narasimha S, Molitor TP, et al. P62/SQSTM1 is a novel leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) substrate that enhances neuronal toxicity. Biochem J. 2018 Apr 9;475(7):1271-93.

148. Fleming SM, Salcedo J, Fernagut PO, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, et al. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. J Neurosci. 2004 Oct 20;24(42):9434-40.

149. Yang X, Ren H, Wood K, Li M, Qiu S, Shi FD, et al. Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP. FASEB J. 2018 Jun;32(6):3336-45.

150. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. J Neurosci Methods. 2006 Dec 15;158(2):219-23.

151. Tillerson JL, Caudle WM, Reveron ME, Miller GW. Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Exp Neurol. 2002 Nov;178(1):80-90.

152. Sanchez-Guajardo V, Febbraro F, Kirik D, Romero-Ramos M. Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. PLoS One. 2010 Jan 20;5(1):e8784.

153. Rappold PM, Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. Neurotherapeutics. 2010 Oct;7(4):413-23.

154. Niranjan R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. Mol Neurobiol. 2014 Feb;49(1):28-38.

155. Morales I, Sanchez A, Rodriguez-Sabate C, Rodriguez M. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. PLoS One. 2017;12(10):e0185989.

156. Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 24;109(4):E197-205.

157. Schanen NC. Molecular approaches to the Rett syndrome gene. J Child Neurol. 1999 Dec;14(12):806-14.

158. Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. Neuron. 2007 Nov 8;56(3):422-37.

159. Gantz SC, Ford CP, Neve KA, Williams JT. Loss of Mecp2 in substantia nigra dopamine neurons compromises the nigrostriatal pathway. J Neurosci. 2011 Aug 31;31(35):12629-37.

160. Samaco RC, Mandel-Brehm C, Chao HT, Ward CS, Fyffe-Maricich SL, Ren J, et al. Loss of MeCP2 in aminergic neurons causes cell-autonomous defects in neurotransmitter synthesis and specific behavioral abnormalities. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 22;106(51):21966-71.

161. Xie T, Zhang J, Yuan X, Yang J, Ding W, Huang X, et al. Is X-linked methyl-CpG binding protein 2 a new target for the treatment of Parkinson's disease. Neural Regen Res. 2013 Jul 25;8(21):1948-57.

162. Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SB, Guyenet PG, et al. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. Nature. 2012 Mar 18;484(7392):105-9.