



Universidade da Beira Interior

Faculdade Ciências da Saúde



Controlo da activação microglial pelos astrócitos mesencefálicos: quais os mediadores solúveis envolvidos?

Diana Patrícia da Cunha Branco

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Carla Sofia Pais Fonseca, Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e co-orientação da Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar, Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Agradecimentos

Neste momento em que chega ao fim tão importante etapa do meu percurso académico, gostaria de agradecer a todos aqueles, que directamente ou indirectamente, me apoiaram.

À Prof. Doutora Carla Fonseca, por toda a sua ajuda, compreensão, paciência, capacidade de encorajamento, inúmeros conselhos que se revelaram fundamentais para a conclusão dos objectivos que nos tínhamos proposto alcançar e uma enorme disponibilidade manifestada na orientação deste trabalho.

À Prof. Doutora Graça Baltazar, pelo apoio, empenho e espírito crítico no desenrolar do trabalho experimental.

À Doutora Ana Clara Cristovão, pela cooperação e grande incentivo que foram cruciais para a execução deste trabalho e principalmente pelos ensinamentos valiosos transmitidos.

A todos os meus colegas de laboratório, que sempre se prontificaram a ajudar e a esclarecer dúvidas.

Aos meus pais, pela enorme dedicação, estímulo e apoio incondicional ao longo de toda a minha vida.

Ao meu namorado, pelo incentivo, motivação e compreensão nas horas difíceis.

Resumo

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda selectiva de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta*. A origem desta doença não é completamente compreendida e têm sido propostas diversas hipóteses em relação à perda dos neurónios dopaminérgicos. Entre elas, a neuroinflamação é cada vez mais reconhecida como o factor principal na patogénese da doença de Parkinson, e inúmeras evidências sugerem que as células microgliais são a fonte predominante de inflamação contribuindo para a neurodegeneração dopaminérgica. Os astrócitos desempenham funções vitais na manutenção da função normal do cérebro e diversos estudos sugerem que estes podem actuar como reguladores fisiológicos prevenindo as respostas microgliais inflamatórias excessivas. No entanto, pouco se sabe como os astrócitos modulam a activação microglial. Devido à relevância das interacções astrócitos-microglia na regulação da inflamação cerebral, é importante identificar os mediadores envolvidos neste processo, os quais podem actuar como agentes anti-inflamatórios naturais no cérebro.

No presente trabalho, o nosso objectivo foi o estudo dos efeitos de mediadores solúveis libertados pelos astrócitos na activação microglial induzida pelo agente inflamatório Zymosan A, assim como a identificação da natureza desses mediadores. Para a determinação do efeito destas moléculas na actividade microglial, as culturas de microglia do mesencéfalo ventral foram previamente expostas, a meio condicionado pelos astrócitos (ou meio de cultura – controlo), e tratadas com diferentes concentrações de Zymosan A (0.5 e 5 µg/mL). Ambas as concentrações, na ausência de condicionamento pelos astrócitos, aumentaram a actividade fagocítica microglial, com um maior efeito para a concentração mais alta de Zymosan A. A pré-incubação com o meio condicionado pelos astrócitos foi capaz de prevenir o aumento da actividade fagocítica induzida pelo Zymosan A, em ambas as concentrações utilizadas, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo. Para avaliar a natureza dos mediadores solúveis libertados pelos astrócitos que previnem a activação microglial induzida pelo Zymosan A, foram preparadas fracções de diferentes pesos moleculares (<3 kDa, <10 kDa, <30 kDa e < 50 kDa) do meio condicionado e o seu efeito na actividade microglial induzida por diferentes concentrações de Zymosan A foi testada. Os mediadores solúveis derivados dos astrócitos com pesos moleculares <3 kDa foram

capazes de prevenir completamente a activação microglial induzida por 0.5 µg/mL de Zymosan A. No entanto, os mediadores solúveis libertados pelos astrócitos com pesos moleculares superiores a 10 kDa, especialmente com pesos moleculares entre 10 e 30 kDa, parecem ter um papel mais relevante na prevenção da activação microglial induzida pela concentração mais alta de Zymosan A (5 µg/mL). O factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia e a proteína metalotioneína I/II, moléculas expressas pelos astrócitos, parecem ter um papel importante na comunicação astrócitos-microglia, estando envolvidos na prevenção pelos astrócitos, da activação microglial induzida por 5 e 0.5 µg/mL de Zymosan A, respectivamente.

Estes resultados poderão, no futuro, contribuir para a identificação de possíveis moléculas solúveis derivadas dos astrócitos que possam mediar as interacções astrócitos-microglia e modular as respostas inflamatórias microgliais.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Neuroinflamação; Microglia; Astrócitos

Abstract

Parkinson's disease is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*. The aetiology of this disease is not completely understood and several hypotheses have been advanced regarding the loss of dopaminergic neurons. Among them, neuroinflammation has been increasingly recognized as a major factor in the pathogenesis of Parkinson's disease, and increasing evidence suggests that microglial cells are the predominant source of inflammation contributing to dopaminergic neurodegeneration. Astrocytes play vital roles in the maintenance of normal brain function and several evidences suggest that they could act as physiological regulators preventing excessive inflammatory microglial responses. However, little is known regarding how astrocytes may modulate microglial activation. Due to the relevance of astrocyte-microglia interactions in the regulation of brain inflammation, it is important to identify the mediators involved in this process, which could act as natural anti-inflammatory agents in the brain.

In the present work we aimed at studying the effect of soluble mediators released by astrocytes on microglial activation induced by the inflammatory agent Zymosan A, and at evaluating the molecular nature of those mediators. To assess the effect of those molecules on microglial activity, ventral midbrain microglia cultures were previously exposed, to media conditioned by astrocytes (or culture medium – control), and treated with different concentrations of Zymosan A (0.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$). Both concentrations, in the absence of conditioning by astrocytes, increased microglial phagocytic activity, with a higher effect for the highest Zymosan A concentration. The pre-incubation with the astrocyte conditioned media was able to prevent the increase in phagocytic activity induced by Zymosan A at both concentrations used, keeping the number of phagocytic cells at control levels. To assess the nature of the soluble mediators released by astrocytes that prevent microglial activation induced by Zymosan A, different molecular weight fractions (<3 kDa, <10 kDa, <30 kDa and <50 kDa) of the conditioned media were prepared and their effect on microglial activity induced by different concentrations of Zymosan A was tested. The soluble mediators derived from astrocytes with molecular weight <3 kDa were able to completely prevent microglial activation induced by 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ZyA. However, the soluble mediators released by astrocytes with molecular weights higher than 10 kDa seem to have a relevant role in the prevention of microglial activation induced by the highest concentration of Zymosan A (5 $\mu\text{g/mL}$).

The glial cell line-derived neurotrophic factor and the protein metallothionein I/II, both expressed by astrocytes, appear to have an important role in the crosstalk astrocytes-microglia, being involved in prevention by astrocytes of microglial activation induced by 5 and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Zymosan A, respectively.

The present results will contribute, in the future, to the identification of other astrocyte-derived soluble molecules that may mediate astrocyte-microglia interactions and modulate microglial inflammatory responses.

Keywords: Parkinson's disease; Neuroinflammation; Microglia; Astrocytes

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Índice Geral	vii
Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xii
Lista de abreviatura e Símbolos	xiii

1. Introdução

1.1. Microglia	1
1.1.1. Morfologia microglial	2
1.1.2. Activação microglial	4
1.1.2.1. Sinais para a activação da microglia	5
1.1.2.2. Respostas biológicas na microglia activada	7
1.1.2.2.1. Migração	8
1.1.2.2.2. Proliferação	8
1.1.2.2.3. Fagocitose	9
1.1.2.2.4. <i>Burst</i> respiratório e a produção de óxido nítrico	9
1.1.2.2.5. Secreção de factores difusíveis	10
1.2. Astrócitos	13

1.2.1. Factores libertados pelos astrócitos	15
1.2.1.1. GDNF	15
1.2.1.2. Metalotioneínas	17
1.3. Regulação do estado de activação microglial	18
1.3.1. Regulação da activação microglial pelos astrócitos	19
1.3.2. Regulação do estado de activação microglial pelos neurónios	20
1.3.3. Regulação da activação microglial por citocinas anti-inflamatórias	21
1.3.4. Regulação da activação microglial por enzimas antioxidantes	23
1.4. Neuroinflamação e doenças neurodegenerativas	24
1.4.1. Doença de Parkinson	25
1.4.2. Activação da microglia e a DP	26
2. Objectivos	29
3. Materiais e Métodos	
3.1. Materiais	30
3.2. Culturas de células gliais do mesencéfalo ventral	30
3.3. Obtenção do MCA	32
3.4. Fraccionamento do MCA e DMEM	33
3.5. Tratamento das culturas de microglia	33
3.6. Adição dos anticorpos anti-GDNF e anti-MT às culturas de microglia	34
3.7. Avaliação da actividade fagocítica da microglia	34
3.8. Avaliação da pureza das culturas de microglia	35
3.9. Medição dos níveis de EROs	35
3.10. Extracção de RNA total	36

3.11. Síntese de cDNA	37
3.12. RT-PCR	37
3.13. Análise de dados e estatística	40
4. Resultados	
4.1. Efeito do MCA na actividade fagocítica da microglia induzida pelo agente inflamatório ZyA	41
4.2. Medição dos níveis de EROs	43
4.3. Efeito de fracções de diferentes pesos moleculares do MCA na actividade fagocítica da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA	44
4.4. Efeito de fracções de diferentes pesos moleculares do MCA na actividade fagocítica da microglia induzida por 5 µg/mL de ZyA	47
4.5. Avaliação da expressão de GDNF, BDNF, MT-I, IIA e III, NT-4, TGF-β1, MANF e CDNF pelos astrócitos	50
4.6. Avaliação da função desempenhada pelo GDNF e pela MT-I/II na prevenção da activação microglial pelos astrócitos	52
5. Discussão	55
6. Conclusões	68
7. Perspectivas Futuras	69
8. Referências Bibliográficas	70

Índice de figuras

1. Comparação da microglia em repouso ou ramificada com extensa pseudopodia (A) e microglia activada (B)	3
2. Manutenção da quiescência microglial sob condições fisiológicas normais no SNC	21
3. Neuropatologia da doença de Parkinson	26
4. Representação da secção coronal do cérebro de rato que define a zona pretendida para dissecação – o mesencéfalo ventral	31
5. Esquema representativo do tratamento das culturas de astrócitos	33
6. Esquema representativo do tratamento das culturas de microglia	34
7. Efeito do MCA na actividade fagocítica microglial após exposição a diferentes concentrações de ZyA	42
8. Medição dos níveis de EROs através da adição de DCFDA	43
9. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <50 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA	44
10. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <30 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA	45
11. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <10 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA	46

12. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <3 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA	46
13. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <50 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 5 µg/mL de ZyA	48
14. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <30 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 5 µg/mL de ZyA	48
15. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <10 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA	49
16. Análise por RT-PCR da expressão do GDNF, BDNF, MT-I, MT-IIA, MT-III, NT-4, TGF-β1, MANF e CDFN pelos astrócitos	51
17. Avaliação da contribuição do GDNF na prevenção pelos astrócitos, da activação microglial induzida pela concentração de 5 µg/mL de ZyA	53
18. Avaliação da contribuição da MT-I/II na prevenção, pelos astrócitos, da activação microglial induzida pela concentração de 0.5 µg/mL de ZyA	54

Índice de tabelas

1. Características dos primers específicos para o GDNF, BDNF, MANF, MT-I, MT-IIA, MT-III, NT-4, TGF- β 1, CDNF e GAPDH, usados para as reacções de RT-PCR

38

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Aβ	β -amilóide
\cdotOH	Radical hidroxilo
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
Ara-C	Citocina β -D-arabinofuranosida
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
bp	Pares de base
CAT	Catalase
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementar
CDNF	Factor neurotrófico dopaminérgico conservado
CO	Monóxido de carbono
CR3	Receptor 3 do complemento
d\cdotNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatados
DA	Doença de Alzheimer
DCFDA	2,7'-Diacetato de diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-Diclorofluoresceína
DCFoxi	2',7'-Diclorofluoresceína oxidado
DEPC	Dietil pirocarbonato
DIV	Dias in vitro
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DP	Doença de Parkinson
DTT	Ditiotreitol
EM	Esclerose múltipla
ERNs	Espécies reativas de nitrogénio
EROs	Espécies reativas de oxigénio
FBS	Soro fetal bovino
Fe²⁺	Ião ferroso
GAPDH	Desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato
G-CSF	Factores estimuladores de colónia de granulócitos
GDNF	Factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factores estimuladores de colónia de macrófagos/granulócitos
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio

HNO₂	Ácido nitroso
HNO₃	Ácido nítrico
HO-1	Heme oxigenase-1
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferão
IL	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor da IL-1
iNOS	Isoforma indutível da sintase do NO
IP	Proteína induzível por IFN
LFA-1	Antigénio associado à função dos linfócitos
LPS	Lipopolissacárido
MANF	Factor neurotrófico derivado dos astrócitos mesencefálicos
MCA	Meio condicionado por astrócitos
MCP	Proteína quimioatractante de monócitos
M-CSF	Factores estimuladores de colónia de macrófago
MEDAs	Matriz extracelular derivada de astrócitos
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIP	Proteína inflamatória dos macrófagos
M-MLV RT	Transcritase reversa do vírus da leucemia de murino <i>moloney</i>
MMP-3	Metaloproteinase 3 da matriz
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
mRNA	Acido ribonucleico mensageiro
MT	Metalotioneína
NADPH	Forma reduzida do dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato
NGF	Factor de crescimento neuronal
NO	Óxido nítrico
NO²⁻	Anião nitrito
NO₂	Dióxido de nitrogénio
NO³⁻	Anião nitrato
NQO	Oxidoreductase da quinona-NADPH
NT	Neurotrofina
O₂⁻	Anião superóxido
OD	Densidade óptica
ONOO⁻	Anião peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Prostaglandina

RT-PCR	Reacção de cadeia polimerase via transcriptase reversa
S.E.M.	Erro padrão da média
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido da dismutase
TGF	Factor de crescimento e transformador
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Factor de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
ZyA	Zymosan A

1. Introdução

1.1. Microglia

Os primeiros anos de pesquisa acerca da natureza da microglia são notáveis devido às espantosas observações de muitos anatomistas e neuropsiquiatras ilustres, incluindo Gluge que em 1841 identificou as células fagocíticas de origem mesodérmica no cérebro lesado e Virchow que em 1846 constatou que os fagócitos contribuíam para o progresso de uma doença referida como encefalite congénita (revisto por Rezaie et al., 2002). Em 1890 His descreveu corpúsculos mesodérmicos amebóides que invadiam o cérebro em desenvolvimento do embrião humano no segundo mês, colonizando a substância cinzenta e branca e emitindo radiações protoplásmicas; em 1899 Nissl sugeriu que as células da glia no cérebro tinham funções similares às dos macrófagos em outros tecidos e em 1900 Robertson distinguiu “neuroglia” e “mesoglia”, sendo as últimas células derivadas da mesoderme e que exibiam actividade fagocítica em condições patológicas tais como degeneração crónica do cérebro (revisto por Rezaie et al., 2002). Em 1904 Alzheimer afirmou que as células gliais se tornavam amebóides em certas infecções agudas e que tinham como função o combate da infecção e Cajal reconheceu em 1913 a mesoglia como o “terceiro elemento” do sistema nervoso central (SNC) (revisto por Rezaie et al., 2002). No entanto, foi o neuroanatomista espanhol Pio del Rio-Hortega, que em 1932 obteve o título de “pai da biologia da microglia” e que após os seus estudos em cérebros de animais jovens, através do uso do seu método de coloração de carbonato de prata, demonstrou que a microglia era um tipo celular separado dos astrócitos e oligodendrócitos (del Rio Hortega, 1927). Ele foi o primeiro a demonstrar que a mesoglia era constituída pela microglia, a qual tinha origem mesodérmica, e os oligodendrócitos, juntamente com os astrócitos e os neurónios, eram de linhagem neuroectodermal (revisto por Rock et al., 2004). Actualmente, a ideia geral é de que a microglia deriva de monócitos circulantes ou células precursoras na linhagem macrófagos-monócitos que é originada na medula óssea. Estas células precursoras invadem o cérebro em desenvolvimento durante os estágios embrionário, fetal ou perinatal, transformando-se progressivamente de uma forma amebóide fagociticamente

activa na forma ramificada da microglia em repouso no SNC maduro normal (Ling et al., 1980; revisto por Barron, 1982; Perry et al., 1985; Hickey e Kimura, 1988), sendo o fenótipo ramificado representativo da microglia totalmente diferenciada (revisto por Ling e Wong, 1993).

O termo “microglia” refere-se às células que residem dentro do parênquima do SNC e que partilham muitas das propriedades dos macrófagos em outros tecidos; porém no seu estado não activado ou de repouso têm uma morfologia ramificada característica, que não é exibida pelos macrófagos residentes de outros sistemas de órgãos (revisto por Rock et al., 2004). A microglia encontra-se distribuída por todo o SNC como uma rede de células imunocompetentes constituindo aproximadamente 10% da população total de células gliais no cérebro (McGeer e McGeer, 2008). Além de serem consideradas as células imunitárias do SNC, as microglias podem ter também um papel activo no suporte da homeostase cerebral, através da absorção de substâncias tóxicas e do excesso de iões K^+ do espaço extracelular (Bordey e Spencer, 2003; Eder et al., 1999).

1.1.1. Morfologia microglial

A microglia foi descrita como uma população celular distinta com uma morfologia característica que a diferencia das outras células gliais e dos neurónios. Estas células têm um tamanho pequeno e o diâmetro do seu corpo celular não excede os 5-10 μm (Kurpius et al., 2006). Os estudos de ultraestrutura celular mostram que estas células têm normalmente um citoplasma electrodense, contendo uma pequena quantidade de organelos. Uma característica evidente da microglia é a presença de numerosas ramificações filopódicas que circundam a superfície celular, os corpos densos bem desenvolvidos, lisossomas e uma grande quantidade de vesículas, que comprovam a capacidade da microglia para a actividade fagocítica (revisto por Kim e de Vellis, 2005).

As células da microglia dividem-se em vários subtipos de acordo com as suas propriedades funcionais: a microglia que é encontrada no estado de repouso tem uma distribuição uniforme por todo o cérebro e tem uma forma ramificada (Figura 1A), com corpos celulares escassamente visíveis (revisto por Pivneva, 2008). Apesar do vasto conhecimento acerca da microglia activada na patogénese de doenças neurológicas, pouco se sabe sobre o papel da microglia em repouso no SNC normal. Dois grupos de

investigação independentes, usando microglia que expressa a proteína verde fluorescente (GFP), descreveram que estas células patrulham o SNC (Davalos et al., 2005; Fetler e Amigorena, 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Numa escala de tempo de minutos, as ramificações microgliais finas e elaboradas, reorganizam-se constantemente e exploram o microambiente neuronal no SNC. No entanto, os sinais responsáveis por esta constante remodelação da citoarquitettura microglial no SNC normal permanecem desconhecidos (revisto por Garden e Möller, 2006).

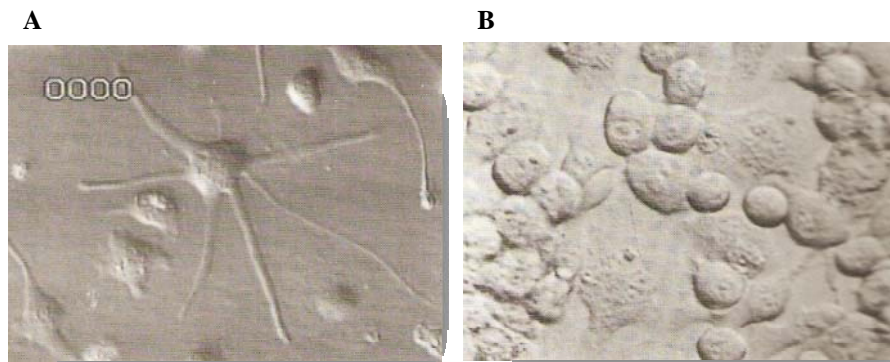


Fig. 1. Comparação da microglia em repouso ou ramificada com extensa pseudopodia (A) e microglia activada (B). Estas são linhas celulares de murino BV-2 com um diâmetro de corpo celular de aproximadamente 20 μm (retirado de Wood, 1998).

Como resposta a alterações no ambiente que as rodeia, particularmente a danos neuronais ou à presença de agentes patogénicos, as células da microglia exibem acentuadas mudanças morfológicas, proliferam, tornam-se fagocíticas e sobre-expressam um grande número de moléculas tais como citocinas, moléculas de adesão, receptores membranares e factores de transcrição (Saura et al., 2003). Elas retraem as suas ramificações filopódicas para recuperarem uma forma celular oval (Figura 1B) sendo estas células conhecidas como microglia reactiva (Stagaard et al., 1987). Este processo, chamado de activação microglial, é uma resposta fisiológica destinada a proteger o tecido neuronal afectado (Saura et al., 2003). No entanto, é também esta acção defensiva eficiente que as torna células potencialmente deletérias. Devido à sua capacidade de produzir espécies altamente neurotóxicas, as células microgliais cronicamente activadas podem participar na patogénese de doenças neurodegenerativas tais como a doença de Parkinson (DP) ou doença de Alzheimer (DA) (Saura et al., 2003). Por outro lado, a microglia amebóide tem uma função de captura crítica no

desenvolvimento do cérebro através da remoção de um grande número de células no neocórtex que morrem no curso do desenvolvimento normal do cérebro fetal (revisto por Voyvodic, 1996). Estas células têm uma maior actividade fagocítica, o que lhes permite remover eficientemente fragmentos celulares neuronais e resíduos de mielina (Elkabes et al., 1996; revisto por Kreutzberg, 1996; revisto por Liu e Hong, 2003), sendo também benéficas para a sobrevivência neuronal no SNC danificado através da produção de factores neurotróficos (revisto por Giulian e Corpuz, 1993; Elkabes et al., 1996; revisto por Kreutzberg, 1996).

1.1.2. Activação microglial

A microglia em repouso parece ser altamente sensível a muitas formas de perturbação dentro do microambiente do cérebro e pode rapidamente tornar-se activada quando ocorrem eventos patológicos, tais como infecção e inflamação, com uma resposta resultante característica e graduada (revisto por Wojtera et al., 2005). No seu estado de repouso, a microglia exhibe no cérebro saudável uma baixa expressão de receptores de membrana, que são necessários para a mediação das funções normais de macrófagos (revisto por Kreutzberg, 1996). Foi demonstrado que a activação inicial da microglia, após 24 horas de exposição ao estímulo, leva a uma reactividade da imunoglobulina IgG microglial elevada, uma sobre-regulação de CD1 e moléculas de adesão celular, tais como o antigénio associado à função dos linfócitos (LFA-1), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) (revisto em Orr et al., 2002). Quando o estímulo activador continua a estar presente, a microglia adere aos neurónios, directamente, através de quimiocinas, tais como a proteína quimioattractante de monócitos (MCP) - 1 e a proteína induzível por interferão (IFN) (IP) - 10, que são expressas pelos neurónios (revisto por Aloisi et al., 2000; revisto por Aloisi, 2001). Para além disso, quando activada, o citoesqueleto interno da microglia modifica-se, o corpo celular alarga-se, exibindo uma aparência tipo-macrófago, e ocorre também um aumento no número de células (revisto por Raivich et al., 1999). Com uma presença continuada do estímulo indutor, a microglia mantém esta alteração funcional com uma sobre-regulação das moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) da classe II e glicoproteínas inflamatórias,

tais como CD40, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que fornecem um estímulo poderoso para a activação de células imunitárias (revisto por Aloisi et al., 2000). Foi no entanto sugerido, que mesmo neste ponto o número de células microgliais pode diminuir e perder os seus marcadores de activação, retornando ao estado de repouso, se o estímulo activador desaparecer. Porém, se o estímulo patológico persistir, ocorre um aumento substancial nos marcadores de activação e moléculas de adesão celular e finalmente a microglia activada aglomera-se à volta dos neurónios e torna-se fagocítica (Bronstein et al., 1995; Banati et al., 1998; McGeer, 1998). A combinação dos factores libertados e da adesão à superfície dos neurónios leva a uma morte celular neuronal progressiva e irreversível, que é agravada pela libertação de quimioattractantes pelos neurónios danificados, de modo a induzir uma maior infiltração na região pela microglia activada (revisto por Aloisi, 2001; revisto por Kim e de Vellis, 2005; Sriram et al., 2006).

1.1.2.1. Sinais para a activação da microglia

As substâncias libertadas por células lesadas do SNC accionam a activação microglial, levando conseqüentemente a mudanças a longo prazo na expressão de genes e reorganização do fenótipo celular (revisto por Kreutzberg, 1996; revisto por Streit, 2002). As células da microglia detectam as mudanças no seu ambiente através da expressão de um grande número de receptores de superfície celular e receptores nucleares, que desempenham um papel crítico na iniciação e/ou modulação das suas respostas imunitárias. Estes incluem receptores para factores tais como o complemento, imunoglobulinas, moléculas de adesão celular, esteróides, produtos bacterianos, proteínas *misfolded*, citocinas e quimiocinas (revisto por Hanisch, 2002; revisto por Möller, 2002; revisto por van Rossum e Hanisch, 2004).

A activação das células microgliais pode ser feita através de sinais microbianos. A activação da microglia pelo lipopolissacárido (LPS) foi uma das primeiras a ser descrita na literatura (Hetier et al., 1988). O LPS é uma endotoxina derivada de bactérias Gram-negativas, sendo um potente activador das células da microglia (Kim et al., 2000), as quais respondem activamente ao LPS com a conseqüente libertação de uma grande variedade de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO) e proteases. Estes efeitos são mediados pelo receptor *toll-like* (TLR) 4, um membro da família de receptores *toll-like*, envolvidos na detecção de infecções microbianas (revisto por

Takeda et al., 2003). Foi também demonstrado que a injeção intranigral de LPS causa uma forte activação microglial e degeneração selectiva dos neurónios dopaminérgicos, na *substantia nigra* (SN) e estriado (Hererra et al., 2000). Visto que acciona as respostas microgliais para a maioria dos parâmetros de activação microglial (isto é, proliferação, migração, produção de NO e libertação de citocinas), é frequentemente usado como controlo positivo em experiências *in vitro* e *in vivo* (revisto por Rivest, 2003).

Um dos estímulos inflamatórios extracelulares selectivo para a microglia é o Zymosan, uma substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo composta por cadeias polissacáridas de vários pesos moleculares, contendo aproximadamente 73% de polissacáridos, 15% de proteínas e 7 % de lípidos e componentes inorgânicos (Fitzpatrick e DiCarlo, 1964), sendo as partículas de Zymosan constituídas por resíduos de manose- α e glucano- β (Lombard et al., 1994). O Zymosan é um activador poderoso do mecanismo denominado *burst* respiratório, capaz de estimular as células da microglia através da subunidade CD11b do receptor 3 do complemento (CR3) (Le Cabec et al., 2000), resultando num aumento no consumo de oxigénio e na geração de espécies reactivas que são tóxicas para os neurónios (McGeer et al., 1994). O CR3 é um membro da família $\beta 2$ das integrinas expresso na membrana plasmática dos fagócitos dos mamíferos e células *natural killer*. O Zymosan, quando injectado em animais, provoca inflamação através da indução da libertação de uma ampla gama de mediadores inflamatórios. Estes incluem componentes activos do sistema do complemento (Pillemer e Ecker, 1941), prostaglandinas e leucotrienos (Humes et al., 1982), factores de agregação plaquetária (Roubin et al., 1982), radicais de oxigénio (Nauseef et al., 1983) e enzimas lisossomais (Bonney et al., 1978). Para além disso, o Zymosan activa directamente os macrófagos (Underhill, 2003), estando os TLR2 envolvidos na sinalização induzida pelo Zymosan (Sato et al., 2003). Após ser fagocitado, os macrófagos libertam enzimas lisossomais (Kelly e Carchman, 1987), espécies reactivas de oxigénio (EROs), ácido araquidónico (Daum e Rohrbach, 1992) e o factor de necrose tumoral (TNF) - α (Sanguedolce et al., 1992). Devido ao facto do Zymosan não ser degradável, a sua fagocitose pelos macrófagos resulta numa resposta inflamatória prolongada (revisto por Volman et al., 2005).

Outros dos sinais activadores da microglia são as proteínas patológicas. Em doenças neurodegenerativas associadas com proteinopatia, tal como a DA, doença de Huntington ou a forma familiar de esclerose lateral amiotrófica, a activação microglial

observada sugere que a microglia é activada por proteínas anormais. O caso que se encontra melhor documentado é acerca da DA, onde as proteínas β -amilóides (A β) foram consideradas como activadoras potentes da microglia, levando à sua proliferação e libertação de citocinas (revisto por Rogers et al., 2002).

O ATP extracelular tem sido reconhecido nos últimos anos como um dos principais activadores da microglia, sendo os seus efeitos mediados por receptores P2. A expressão funcional destes receptores é regulada durante a activação microglial e a activação do receptor P2 acciona diversos efeitos, tais como aumento da concentração de cálcio intracelular, proliferação e libertação de citocinas (revisto por Inoue, 2006).

Uns dos factores também implicados na activação microglial são os factores do soro. O soro contém um grande número de factores envolvidos na resposta a danos vasculares, o que tem um impacto fisiológico na microglia quando este entra em contacto com o parênquima do SNC. Após a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), um conjunto virtualmente ilimitado de factores do soro inunda o parênquima do SNC e serve como sinal de activação para as células microgliais (revisto por Garden e Möller, 2006). A microglia demonstra responder a factores do soro, tais como o ácido lisofosfatídico (Möller et al., 2001), a esfingosina 1-fosfato (Tham et al., 2003), imunoglobulinas (Stangel e Compston, 2001), complemento (Möller et al. 1997; McGeer e McGeer, 2002), e trombina (Weinstein et al., 2005). Os efeitos são mediados por receptores acoplados a proteínas G e accionam várias respostas tais como proliferação, migração e libertação de citocinas (revisto por Garden e Möller, 2006).

1.1.2.2. Respostas biológicas na microglia activada

As respostas biológicas nas células microgliais activadas incluem a migração da microglia para o sítio da lesão ou inflamação, proliferação, aumento da capacidade fagocítica, produção de EROS e /ou espécies reactivas de nitrogénio (ERNs) e da libertação de factores difusíveis.

1.1.2.2.1. Migração

Uma das primeiras respostas da microglia a um estímulo fisiológico activador é a migração para o local da lesão ou inflamação. Os danos a tecidos no SNC resultam na libertação de factores quimiotácticos que estimulam a migração da microglia para o local da lesão neuronal. Já foi demonstrado que a microglia migra ao longo de gradientes de quimiocinas *in vitro* e esta parece ser estimulada a mover-se no SNC em desenvolvimento via os mesmos gradientes quimiotácticos observados nos modelos de lesão (revisto por Cartier et al., 2005). O ATP e o ADP extracelular libertados após danos traumáticos ou isquémicos no SNC estimulam também a migração da microglia (Honda et al., 2001) e para além disso estas células também migram em direcção a alguns factores tróficos tais como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Forstreuter et al., 2002).

1.1.2.2.2. Proliferação

A microglia é capaz de entrar no ciclo celular em resposta a uma variedade de estímulos. Lesões traumáticas ou isquémicas, neoplasias e regiões de degeneração neuronal ou axonal expõem a microglia a fortes sinais para a proliferação. À medida que as microglias residentes invadem a região lesada no SNC em resposta a gradientes de quimiocinas e mudanças na matriz extracelular, elas produzem citocinas que estimulam a divisão microglial incluindo a interleucina (IL) - 1 β , IL-4 e IFN- γ (revisto por Kim e de Vellis, 2005). Os factores mitogénicos microgliais *in vitro* mais potentes são os factores estimuladores de colónia de macrófago (M-CSF), que podem ser secretados por astrócitos activados (revisto por Kim e de Vellis, 2005), e factores estimuladores de colónia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF), que actuam em conjunto com a tirosina cinase CD45 para estimular a activação microglial (Suh et al., 2005). Para além disso, factores neurotróficos tais como o factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) e a neurotrofina (NT) - 3 são libertados pela microglia activada e actuam via acção parácrina como mitogénios microgliais (Elkabes et al., 1996).

1.1.2.2.3. Fagocitose

A característica funcional mais relevante e importante da microglia no SNC normal é a de vigilância. Este papel é claramente análogo às funções desempenhadas pelas células do sistema imunitário, tais como macrófagos e linfócitos, no resto do corpo. Com a microglia, a evolução encontrou uma maneira de atingir compatibilidade entre o poder destrutivo do sistema imunitário e a relativa vulnerabilidade do SNC a danos e doença. Funcionalmente, a microglia pode ser vista como um tipo de célula híbrida que combina características de uma célula neuronal com alguns dos atributos dos macrófagos e linfócitos (Kettenmann e Ransom, 2005). A microglia sendo o fagócito predominante no SNC tem a capacidade de fagocitar agentes patogénicos e de apresentar as proteínas fagocitadas como antígenos às células T que circulam para dentro e para fora do SNC para estimularem uma resposta imunitária adaptativa. Para além da vigilância do SNC para agentes patogénicos e proteínas patológicas, a fagocitose pela microglia é o principal meio de remoção de células apoptóticas e detritos celulares no SNC. *In vivo*, as microglias fagocitam os detritos celulares durante os estádios pré-natal e no início do estágio pós-natal do desenvolvimento cerebral (Ashwell, 1990; Pearson et al., 1993). Ainda não é completamente compreendido como a microglia reconhece os elementos celulares como apropriados para fagocitose, mas foram identificados vários sinais importantes. Estes incluem a exposição de fosfatidilserina na superfície de células apoptóticas e as interações com o receptor vitronectina e o receptor CD36 na microglia (Witting et al., 2000; Stolzing e Grune, 2004).

1.1.2.2.4. Burst respiratório e a produção de óxido nítrico

As células da linhagem monocítica são a primeira linha de defesa contra patogénios invasores. A geração pela microglia de radicais livres, tais como as EROs e ERNs, são um importante mecanismo de defesa do sistema nervoso contra microorganismos intracelulares e também de potencial dano para os neurónios quando estas moléculas tóxicas são libertadas para o espaço extracelular (revisto por Rock et al., 2004). As microglias têm a capacidade de produzir um *burst* respiratório, sendo que inúmeras EROs de elevada toxicidade são produzidas durante este processo, entre elas o

anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo ($\bullet OH$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (revisto por Babior, 2000). O anião $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 são produzidos via a enzima oxidase da forma reduzida do dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato (NADPH), tendo já sido provado que as células microgliais em cultura sobre-expressam esta enzima em resposta a danos (Green et al., 2001).

As microglias geram também NO, capaz de gerar ERNs (revisto por Condliffe et al., 1998). Parte da toxicidade do NO é devido à sua capacidade de reacção com o oxigénio molecular. Esta reacção desencadeia a formação de várias espécies reactivas altamente oxidantes como o dióxido de nitrogénio (NO_2), ácido nitroso (HNO_2) e nítrico (HNO_3) em equilíbrio com os respectivos aniões nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). A alta toxicidade do NO também pode ser atribuída à sua rápida reacção com o anião $O_2^{\bullet-}$, gerando o anião peroxinitrito ($ONOO^-$), sendo esta molécula capaz de produzir danos oxidativos no DNA dos organismos patogénicos que estejam na proximidade (Possel et al., 1997). Na microglia, o NO é produzido pela isoforma indutível da sintase do NO (iNOS). Muitos dos estímulos para a activação microglial, assim como uma grande variedade de danos neurológicos ou modelos de doenças estão associados com a indução da iNOS microglial e a geração de NO (revisto por Rock et al., 2004). As culturas microgliais humanas são distintas dos modelos de roedores padrão, pois a microglia isolada do cérebro de rato e ratinho produz quantidades substanciais de NO quando activada (Jana et al., 2001; Moss e Bates, 2001), o mesmo não acontecendo com as microglias humanas. Quando estimuladas com citocinas e LPS, estas células libertam poucas quantidades de NO (revisto por Brosnan et al., 1994; Ding et al., 1997; Janabi et al., 1996; Peterson et al., 1994), facto que é consistente com a não responsividade do gene iNOS humano relatada noutras populações de fagócitos mononucleares humanos (revisto por Rock et al., 2004).

1.1.2.2.5. Secreção de factores difusíveis

Uma das maiores funções da microglia é a libertação de sinais para outras células que irão regular a resposta inflamatória após a exposição a um insulto específico ou infecção. Quatro classes principais de moléculas são responsáveis pelos sinais de comunicação entre a microglia e células vizinhas e leucócitos invasores. Estas incluem

citocinas, quimiocinas, factores neurotróficos e pequenas moléculas mediadoras de inflamação tais como as prostaglandinas (revisto por Garden e Möller, 2006).

As citocinas são péptidos imunomodulatórios que participam numa ampla gama de respostas biológicas, incluindo crescimento, desenvolvimento e modulação da inflamação e respostas imunitárias, e regulação da homeostase. Apesar de vários tipos de células incluindo células imunitárias infiltradas no tecido, neurónios, microglia e astrócitos terem sido identificados como fontes de citocinas no SNC, a microglia parece ser a principal fonte de citocinas reguladoras e inflamatórias. As culturas de microglia humanas expressam ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para IL-1 α/β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 e TNF- α (revisto por Kim e de Vellis, 2005), enquanto que estudos adicionais documentaram a expressão de IL-3, IL-18, IFNs e TNF- α na microglia de roedores (revisto por Hanisch, 2002). A activação microglial geralmente origina um aumento na expressão de citocinas, e as citocinas pró-inflamatórias são as primeiras a ser libertadas e tendem a ter efeitos tóxicos nas células circundantes (revisto por Kongsman et al., 2002). A microglia também expressa receptores para a maioria das citocinas o que resulta em *loops* de regulação autócrinos que são críticos para a eventual sub-regulação da resposta inflamatória. A IL-1 e o TNF- α são as principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pela microglia durante a inflamação do SNC. Os agentes patogénicos ou componentes de patogénios como o LPS podem induzir rapidamente em culturas de microglia e *in vivo*, a produção de IL-1 e TNF- α (Appel et al., 1995; Buttini e Boddeke, 1995). Tem sido demonstrado que estas citocinas estão envolvidas no desenvolvimento da inflamação do SNC através da ruptura da BHE, da indução da libertação de moléculas de adesão e quimiocinas dos astrócitos e células endoteliais, o que facilita a infiltração de leucócitos para o SNC (Oh et al., 1999; revisto por Sedgwick et al., 2000). Apesar de no passado os estudos terem estado focados na produção microglial de citocinas pró-inflamatórias, recentemente, um grande número de evidências tem suportado a noção de que a microglia também produz citocinas com actividade anti-inflamatória, como o factor de crescimento e transformador (TGF) - β , a IL-10 e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). O IL-1ra contrabalança o efeito biológico da IL-1 através da ligação ao receptor da IL-1 sem iniciar a transdução de sinal (O'Keefe et al., 1999). A IL-10 e o TGF- β inibem a activação da microglia através da sua capacidade de inibir a apresentação antigénica e libertação de citocinas

pró-inflamatórias, quimiocinas e intermediários reactivos de oxigénio pela microglia (Frei et al., 1994; Aloisi et al., 1999; O'Keefe et al., 1999).

Outras das moléculas libertadas pelas microglias são as quimiocinas que constituem uma superfamília de citocinas pró-inflamatórias pequenas (8-10 kDa) e induzíveis, estando envolvidas em várias respostas inflamatórias e imunitárias, actuando principalmente como quimioattractantes e activadores de tipos específicos de leucócitos (revisto por Kim e de Vellis, 2005). As culturas microgliais expostas a antigénios bacterianos, citocinas ou A β , expressam e libertam quimiocinas tais como a proteína inflamatória dos macrófagos (MIP) - 1 α , MIP-1 β , MIP-2, MCP-1, IP-10, e IL-8 (revisto por Hanisch, 2002). A microglia também expressa receptores para muitas das quimiocinas elaboradas por ela própria, o que sugere que uma das principais funções da libertação de quimiocinas é atrair microglias adicionais para o local da lesão (revisto por Garden e Möller, 2006).

Os factores tróficos que promovem a sobrevivência neuronal são frequentemente sintetizados e libertados pela microglia. As neurotrofinas clássicas, tais como o factor de crescimento neuronal (NGF), BDNF, NT-3, e também o factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF), são sintetizados pelas microglias (Presta et al., 1995; Elkabes et al., 1996; Honda et al., 1999). O GDNF, em conjunto com o BDNF, podem ser responsáveis pela orientação da regeneração axonal após uma lesão (Batchelor et al., 2002). Para além de fornecerem suporte trófico para os neurónios circundantes, os factores tróficos da microglia também podem actuar de uma maneira autócrina para regular a capacidade da microglia em manter o estado anti-inflamatório. Por exemplo, o tratamento com NGF causa uma redução na expressão de moléculas MHC de classe II na microglia (Neumann et al., 1998).

A microglia activada liberta ainda pequenas moléculas lipídicas que são mediadores inflamatórios que incluem o ácido araquidónico, as prostaglandinas (PGs) D₂, E₂ e F₂ α , o factor activador de plaquetas, o tromboxano B₂ e o leucotrieno B₄ (Minghetti e Levi, 1998). Resumindo, vários estudos demonstraram que a microglia desempenha um importante papel nas condições inflamatórias no SNC como a principal fonte de mediadores imunitários reguladores e inflamatórios (revisto por Garden e Möller, 2006).

1.2. Astrócitos

Durante décadas, as células gliais eram referidas simplesmente como “células de revestimento” do cérebro e eram largamente ofuscadas pela complexidade e importância funcional das células neuronais no SNC humano. No entanto, os astrócitos têm-se tornado o foco de atenção recente devido ao reconhecimento de algumas funções anteriormente desconhecidas (revisto por Volterra e Meldolesi, 2005; Diamond, 2006). Os astrócitos estão normalmente em maior número que os neurónios no cérebro humano, constituindo até 20-50% do volume cerebral. Eles são conhecidos pelos seus prolongamentos fibrosos e grande complexidade estrutural. Estas células são também caracterizadas por uma densa matriz de ramificações, algumas das quais contactam e envolvem paredes vasculares locais, o que auxilia na formação de um importante componente do cérebro, a BHE. Para além disso, os astrócitos estão também envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e acoplamento neurovascular, assim como no suporte de mecanismos de defesa imunitários através da produção de várias citocinas imunoactivas (revisto por Kim et al., 2006; revisto por Koehler et al., 2006). Os astrócitos funcionam estruturalmente e funcionalmente como sensores e reguladores do microambiente local no SNC humano (revisto por Nedergaard et al., 2003). Eles mantêm um controlo apertado da concentração iónica extracelular, homeostase de pH, níveis de glucose e fornecem substratos metabólicos (revisto por Gee e Keller, 2005). Como zeladores eficientes, os astrócitos captam produtos residuais neuronais, incluindo subprodutos metabólicos e neurotransmissores libertados durante a transmissão na fenda sináptica (revisto por Nedergaard et al., 2003). Várias evidências sugerem que estas células executam uma gama mais alargada de funções, do que aquelas anteriormente reconhecidas. Estas funções incluem diferenciação neuronal, regulação da orientação axonal, formação de sinapses (sinaptogénese), neurogénese, plasticidade cerebral e comunicação (revisto por Mosley et al., 2006).

Como foi já referido, os astrócitos são células dinâmicas que mantêm a homeostase no SNC não danificado. Estas células expressam numerosos receptores que lhes permitem responder a virtualmente todos os compostos neuroactivos, incluindo neurotransmissores, neuropéptidos, factores de crescimento, citocinas, pequenas moléculas e toxinas. Dado o seu importante papel em estabelecer e manter a homeostase no SNC, é esperada uma resposta adaptativa pelos astrócitos a danos teciduais. De facto,

quando os astrócitos percebem que a homeostase do cérebro ou da medula espinhal foi alterada, a sua actividade metabólica aumenta, assim como a produção de factores tróficos e de crescimento, atribuindo-lhes uma maior capacidade em proteger outras células no cérebro da depleção energética, e de uma sobrecarga de radicais livres tóxicos, amónia, metais e cálcio (revisto por Mosley et al., 2006).

As características mais frequentemente associadas com a resposta astrocítica a lesões envolvem hipertrofia celular, proliferação, extensão das ramificações e uma produção aumentada da proteína acídica fibrilar glial (GFAP), da vimentina e da nestina. Este conjunto de respostas, que os patologistas classificam como gliose anisomórfica, é a consequência de danos teciduais e resulta na formação de margens gliais altamente compactadas, denominado de cicatriz glial (revisto por Norton et al., 1992; revisto por Norenberg, 1994; Bignami e Dahl, 1995). Estes astrócitos reactivos exacerbam os danos teciduais através da libertação de citocinas pró-inflamatórias e metabolitos de ácido araquidónico, NO e EROs, que podem afectar adversamente a sobrevivência celular após danos no SNC (Dayton e Major, 1996). Dependendo do contexto da doença, a astrogliose pode ser vista como um evento benéfico para a promoção da sobrevivência neuronal através da produção de factores de crescimento e neurotrofinas que suportam o crescimento neuronal, ou pode ser prejudicial para a função neuronal devido à formação das cicatrizes gliais (revisto por Dong e Benveniste, 2001). As funções específicas exercidas por astrócitos reactivos não estão bem definidas (revisto por Sofroniew, 2005). Várias evidências sugerem que estas células estão envolvidas em funções neuroprotectoras e neurodegenerativas (revisto por Liberto et al., 2004). Em cérebros humanos *postmortem*, foi encontrada uma correlação negativa entre a perda de neurónios dopaminérgicos e a astrogliose, sugerindo um possível papel neuroprotector dos astrócitos (Damier et al., 1993). Estudos anteriores também sugeriram que os astrócitos conseguem proteger os neurónios contra danos induzidos por EROs/ERNs, através da secreção de factores solúveis e insolúveis (Tanaka et al., 1999b), e podendo também, indirectamente, regular os danos neuronais pela modulação da inflamação através da diminuição da expressão de mediadores inflamatórios microgliais (Vincent et al., 1996, Vincent et al., 1997; Aloisi et al., 1997; Pyo et al., 2003).

1.2.1. Factores libertados pelos astrócitos

A expressão de citocinas e quimiocinas pelos astrócitos é limitada no SNC normal. No entanto uma expressão anómala de tais factores ocorre em doenças do SNC, tais como a DA, a esclerose múltipla (EM), a DP e traumas ou danos cerebrais. Estudos *in vitro* e *in vivo* documentaram a capacidade dos astrócitos em produzirem IL1- α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IFN- α e β , TNF- α e TGF- β , factores estimuladores de colónia de granulócitos (G-CSF), GM-CSF, M-CSF e quimiocinas incluindo a IL-8, MCP-1 e IP-10. Como potentes fontes de citocinas e quimiocinas imunologicamente relevantes, os astrócitos desempenham um papel crítico no tipo e extensão das respostas imunitárias e inflamatórias do SNC (revisto por Dong e Benveniste, 2001). Para além das citocinas, os astrócitos da substância branca (Penkowa, 2006) expressam as isoformas I e II da metalotioneína (MT), proteínas que exibem acções neuroprotectoras no sistema nervoso periférico e central, e os astrócitos corticais expressam a isoforma III da MT (Uchida et al., 1991), apesar de esta ser particularmente expressa nos neurónios (Carrasco et al., 2003). Os astrócitos secretam também vários factores solúveis conhecidos como neurotrofinas, estando estas envolvidas na sobrevivência, maturação, diferenciação e desenvolvimento das células neuronais (revisto por Seth e Koul, 2008). Dentro do conjunto de factores neurotróficos secretadas pelos astrócitos encontram-se o GDNF, o BDNF, o NFG, a NT-3, a NT-4/5 e a NT-6 (Hefti, 1997).

A acção dos factores neurotróficos na sobrevivência neuronal ocorre quer durante o desenvolvimento quer após lesões cerebrais (Thoenen, 1995; revisto por Lindvall et al., 1994; Tucker et al., 2001). Várias evidências sugerem que alterações na expressão de factores neurotróficos podem contribuir para a neurodegeneração. De facto, neurónios que não recebem factores neurotróficos em quantidades suficientes entram num processo apoptótico (revisto por Thoenen et al., 1987).

1.2.1.1. GDNF

O GDNF, pertencente à superfamília do TGF- β , foi originalmente isolado de uma linha celular glial e funciona como factor trófico para os neurónios dopaminérgicos, assim como para os neurónios não dopaminérgicos, incluindo os

neurónios motores da medula espinhal e gânglios periféricos (Lin et al., 1993). Trata-se de uma proteína homodimérica, heterogeneamente glicosilada e com massa molecular entre os 33 e 45 kDa (Lin et al., 1994), que pode ser expressa em astrócitos (Schaar et al., 1993) e em neurónios (Schmidt-Kastner et al., 1994). O GDNF está presente em vários sistemas neuronais, e essa localização depende da actividade local e do estágio de desenvolvimento do indivíduo (Del Fiacco et al., 2002). Há níveis detectáveis de GDNF no tálamo, hipocampo, cerebelo, córtex, medula espinhal e SN, entre outros locais do sistema nervoso (Choi-Lundberg et al., 1995; Del Fiacco et al., 2002).

Os estudos em culturas primárias do mesencéfalo ventral *in vitro* mostraram que o GDNF aumenta o número de células positivas para tirosina hidroxilase, a sua complexidade morfológica e maturação funcional e neuronal (Schaller et al., 2005), exercendo ainda efeitos potentes no desenvolvimento dos neurónios embrionários *in vitro* (Lin et al., 1993). Esta molécula desempenha também um papel crucial na manutenção da função e sobrevivência de neurónios dopaminérgicos *in vivo*, quer no cérebro intacto quer após lesão da via nigroestriatal (Granholt et al., 1997). O GDNF parece ser o factor trófico mais potente na protecção dos neurónios dopaminérgicos contra a degeneração induzida por várias toxinas, assegurando a sobrevivência destes neurónios em modelos animais da DP, como a degeneração induzida pelo 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) ou pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos e macacos (Rosenblad et al., 1998). Sendo assim, pensa-se que esta molécula é um potencial agente terapêutico para várias doenças neurológicas do SNC (revisto por Airaksinen e Saarma, 2002), tais como hipoxia/isquémia cerebral (Ikeda et al., 2000) e DP (Gash et al., 1996).

Apesar do efeito neurotrófico do GDNF nos neurónios ser bem conhecido, a sua acção na actividade microglial permanece por esclarecer. No estudo realizado por Chang e seus colaboradores (2006), verificou-se que o GDNF não tem efeito na produção microglial de TNF- α e IL-1 β , aumentando no entanto os metabolitos do NO, a produção de moléculas de adesão e a capacidade fagocítica da microglia, assim como a actividade da superóxido dismutase (SOD) microglial, activando o sistema antioxidante endógeno da microglia (Chang et al., 2006).

1.2.1.2. Metalotioneínas

As metalotioneínas são uma família de proteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa) com capacidade de ligação a iões metálicos através dos 20 grupos de cisteína que constituem parte da sua estrutura (Dabrio et al., 2002). Foram até agora isoladas nos mamíferos quatro isoformas da proteína (MT-I, MT-II, MT-III e MT-IV). A MT-I e a MT-II são expressas coordenadamente, de uma forma ubíqua, na maioria dos tecidos incluindo o SNC, enquanto a MT-III se encontra principalmente no SNC e a MT-IV no epitélio escamoso estratificado (Giralt et al., 2002). Devido ao facto das isoformas MT-I e MT-II partilharem uma grande homologia de sequências e perfis de expressão similares, elas são funcionalmente consideradas como uma única isoforma denominada MT-I/II. Em relação às funções biológicas, a MT-I/II desempenha um papel importante no metabolismo e homeostase de metais essenciais, armazenamento e destoxificação de metais não essenciais, apoptose, captura de radicais livres e modulação do balanço redox intracelular (revisto por Penkowa, 2006; revisto por West et al., 2004). Para além disso as isoformas I e II desta proteína exibem também acções neuroprotectoras no sistema nervoso periférico e central (Hidalgo et al., 2001). O papel cerebral da MT-III é menos óbvio, tendo sido reportados vários efeitos tais como protecção do SNC contra a neurotoxicidade do glutamato (Montoliu et al., 2000) ou capacidade de estimular directamente a diferenciação neuronal e sobrevivência dos neurónios corticais *in vitro* (Ambjørn et al., 2008). No entanto, ao contrário da MT-I/II, a MT-III não afecta as respostas inflamatórias provocadas por criolesão no SNC, nem desempenha um papel importante como antioxidante (Carrasco et al., 2003).

Dentro do cérebro, a isoforma mais abundante é a MT-I/II, encontrada principalmente nos astrócitos, apesar de haver alguns relatos de níveis vestigiais de expressão em alguns neurónios (revisto por Hidalgo et al., 2001). Os níveis elevados de expressão de MT nos astrócitos sugerem que estes podem actuar como moduladores de metais no SNC e conferir protecção contra os danos relacionados com stress oxidativo gerado por metais pesados. As MTs estão intimamente relacionadas com a resposta dos astrócitos após danos no SNC, sendo que a expressão destas proteínas pelos astrócitos reactivos promove a recuperação do SNC de lesões (revisto por Hidalgo et al., 2001; West et al., 2004). No entanto, as funções neurobiológicas precisas e o impacto neuroregenerativo de cada isoforma da MT não são ainda muito claras. Têm sido referidas várias correlações entre a MT-I/II e o início e progressão de doenças

neurodegenerativas. Por exemplo, foi observada uma expressão aumentada da MT-I/II em casos da DA, DP, EM e doenças neuronais motoras (revisto por Hidalgo et al., 2001; revisto por Penkowa, 2006; West et al., 2004). Isto pode reflectir níveis de zinco alterados ou stress oxidativo e/ou um mecanismo de resposta neuroprotectora durante a progressão destas doenças degenerativas. Observações similares foram assinaladas em modelos animais dessas doenças degenerativas, como por exemplo, em modelos de morte de neurónios dopaminérgicos, como o modelo do MPTP, para a DP (revisto por Ebadi et al., 2005) e a encefalomielite auto imune experimental, o modelo da EM (Penkowa e Hidalgo, 2003). Para além disso, a incapacidade dos ratinhos em expressarem a MT-I/II resulta numa neurodegeneração acelerada no modelo animal da EM (Penkowa e Hidalgo, 2003). Também há uma forte correlação entre o trauma cerebral físico e a expressão de MT. A este respeito, a MT-I/II é uma das proteínas que é altamente sobre-regulada após várias formas de danos cerebrais experimentais, como por exemplo após isquémia cerebral e danos corticais induzidos por criolesão cortical (revisto por Penkowa, 2006; West et al., 2004).

Vários estudos em animais transgénicos têm sido elucidativos acerca do papel protector desempenhado pela MT-I/II no cérebro lesado. Penkowa e seus colaboradores (1999) relataram que ratinhos *knockout* para a MT-I/II possuíam uma falha na recuperação da lesão após uma criolesão cortical, realçada pelo aumento significativo na apoptose neuronal (Penkowa et al., 1999). Após estes estudos, têm sido notadas recuperações neuronais deficientes em ratinhos *knockout* em MT-I/II após vários traumas experimentais no SNC, incluindo lesões com ácido caínico (Carrasco et al., 1998) e isquémia focal (Trendelenburg et al., 2002), enquanto ratinhos que sobre-expressam a MT-I/II mostram uma recuperação mais eficiente de lesões (van Lookeren Campagne et al., 1999; Giralt et al., 2002).

1.3. Regulação do estado de activação microglial

A inflamação no cérebro lesado tem um efeito dual, uma vez que protege o cérebro da infecção mas também agrava as lesões ocorridas. Para além disso, a inflamação cerebral é considerada um factor de risco para doenças neurodegenerativas, tais como a DP e a DA (revisto por Yang et al., 2007). Vários estudos referem que a

inflamação cerebral é iniciada por factores libertados por neurónios lesados e células da glia e/ou por componentes infiltrantes do sangue resultantes de danos na BHE (Taupenot et al., 1996; Pyo et al., 1999; Ryu et al., 2000, Ryu et al., 2002; Siao e Tsirka, 2002; Min et al., 2003). Durante a inflamação, ocorre a activação de mecanismos reguladores negativos, de forma a prevenir um processo inflamatório prolongado. Um dos mecanismos que modula a inflamação cerebral envolve a expressão de reguladores negativos, tais como citocinas anti-inflamatórias e enzimas antioxidantes (revisto por Yang et al., 2007). Os astrócitos e neurónios têm também a capacidade de modular a inflamação cerebral, através da supressão da activação microglial (Kim e Joh, 2006), conforme descrito nas secções seguintes.

1.3.1. Regulação da activação microglial pelos astrócitos

As interacções que ocorrem entre os astrócitos e a microglia após danos no SNC são complexos e largamente inexplorados. É no entanto conhecido, que citocinas e factores de crescimento são importantes mediadores da comunicação inter-glial. A descoberta dos mecanismos moleculares precisos responsáveis pelas interacções microglia-astrócitos têm sido difíceis de obter através do uso de modelos de lesão *in vivo*, e conseqüentemente, a maioria dos dados experimentais têm sido gerados por estudos *in vitro*. Foi já demonstrado que a morfologia microglial é influenciada pelos astrócitos, que desempenham um papel regulador importante na diferenciação e desactivação microglial (Streit et al., 1999). Vários autores descreveram o papel dos astrócitos no processo de ramificação da microglia, apesar de ser uma questão controversa se são os factores astrocíticos solúveis (Suzumura et al., 1990; Eder et al., 1997; Eder et al., 1999) ou insolúveis (Liu et al., 1994; Tanaka e Maeda, 1996; Tanaka et al., 1999a), que causam as mudanças na morfologia microglial. Dados da literatura mostram que as células da microglia de rato modificam a sua morfologia de amebóide para ramificada, quando cultivadas numa monocamada de astrócitos (Liu et al., 1994; Tanaka e Maeda, 1996). No entanto, não conseguiram detectar mudanças na morfologia microglial quando as células da microglia foram expostas ao meio condicionado por astrócitos (MCA). A proliferação microglial também pode ser regulada através de factores estimuladores de colónias, tais como o M-CSF e GM-CSF, que são produzidos pelos astrócitos (Giulian e Ingeman, 1988; Malipiero et al., 1990; Sawada et al., 1990;

Théry et al., 1992; Lee et al., 1994; Kloss et al., 1997). Estas células conseguem ainda suprimir a fagocitose microglial (DeWitt et al., 1998) e a produção da citocina pró-inflamatória IL-12 (Aloisi et al., 1997) e iNOS (Vincent et al., 1997; Aloisi et al., 1997; Pyo et al., 2003; Min et al., 2006). Recentemente foi reportado por Min e seus colaboradores (2006) que os factores solúveis libertados por astrócitos capazes de suprimir as respostas inflamatórias microgliais induzidas pelo IFN- γ , através da expressão de heme oxigenase-1 (HO-1), são sensíveis ao calor e que se encontram enriquecidos numa fracção do MCA mais pequena que 3 kDa (Min et al., 2006).

Apesar da maioria dos estudos apontarem para uma relação meramente unidireccional, a maioria das interacções astrócitos-microglia são provavelmente recíprocas. Por exemplo, foi proposto que a IL-1 derivada da microglia regula a proliferação dos astrócitos (Giulian et al., 1988) e que a microglia pode expressar moléculas da matriz extracelular, tais como a laminina (Rabchevsky e Streit, 1997), expressão essa que pode ser regulada pelos astrócitos.

1.3.2. Regulação da activação microglial pelos neurónios

Os neurónios regulam a activação microglial numa maneira dual. Os gangliósidos existentes nas membranas neuronais e libertados em situação de lesão (Derry e Wolfe, 1967) induzem a expressão/libertação de mediadores inflamatórios, tais como a IL-1 β , TNF- α e iNOS pela microglia (Pyo et al., 1999; Min et al., 2004). A metaloproteinase 3 da matriz (MMP-3) libertada por neurónios apoptóticos também leva à sobre-expressão da IL-1 β , IL-6 e TNF- α na microglia e subsequentemente exacerba a degeneração neuronal (Kim et al., 2005). No entanto, outros estudos referem efeitos anti-inflamatórios dos neurónios apoptóticos uma vez que estes reduzem a produção de TNF- α e NO, mas aumentam os níveis de TGF- β na microglia (De et al., 2003).

Os neurónios libertam também sinais que mantêm a microglia no seu estado de repouso e vigilância (revisto por Hanisch e Kettenmann, 2007). Estudos recentes demonstraram que os neurónios sob condições fisiológicas têm a capacidade de suprimir a activação microglial em coordenação com os astrócitos no SNC (Hoek et al., 2000). Uma glicoproteína, CD200 expressa na superfície dos neurónios, mantém a

quiescência microglial através da ligação com o seu receptor CD200R na microglia (Hoek et al., 2000). Foi observado em ratinhos *knockout* para a CD200, que a microglia era activada espontaneamente levando ao aumento da expressão do CD11b e CD45, assim como à perda da morfologia ramificada (Hoek et al., 2000). A actividade eléctrica e factores solúveis libertados de neurónios intactos mantêm também a quiescência microglial, levando à supressão de moléculas MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias para a apresentação antigénica (Figura 2) (Wei e Jonakait, 1999; revisto por Neumann, 2001). Quando a integridade do parênquima do SNC é perturbada, a microglia é rapidamente activada, provavelmente como resultado da perda da inibição pelos neurónios ou por sinalização de activação directa pelos neurónios (Kim e Joh, 2006).

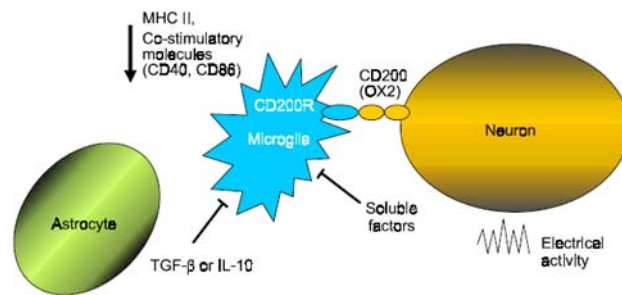


Fig. 2. Manutenção da quiescência microglial sob condições fisiológicas normais no SNC. A activação da microglia é suprimida pelos neurónios ou astrócitos sob condições normais. A activação destas células é inibida pela ligação da CD200, uma glicoproteína expressa na superfície dos neurónios, e ao seu receptor na microglia. A actividade eléctrica normal e os factores solúveis libertados pelos neurónios (neurotransmissores e factores neurotróficos) também suprimem a molécula MHC de classe II microglial e os factores co-estimulatórios tais como o CD40 e CD86. O TGF- β e a IL-10 secretados pelos astrócitos também inibem a activação microglial (retirado de Kim e Joh, 2006).

1.3.3. Regulação da activação microglial por citocinas anti-inflamatórias

As funções da microglia podem ser reguladas por citocinas anti-inflamatórias (Sawada et al., 1999). A IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β são as citocinas anti-inflamatórias mais amplamente caracterizadas, estando aumentadas na presença de vários estímulos

inflamatórios. Por exemplo, o LPS e a trombina estimulam a produção de IL-4, IL-10 e IL-13 nos astrócitos e/ou microglia (Mizuno et al., 1994; Kim et al., 2002; Shin et al., 2004; Park et al., 2005). As funções anti-inflamatórias destas citocinas têm sido reportadas no cérebro assim como em outros tecidos (Sawada et al., 1999; Schilling et al., 2001).

A IL-10 é uma citocina produzida por uma grande diversidade de tipos celulares tais como as células Th2, células B, macrófagos e mastócitos, tendo variadíssimas funções, como por exemplo a inibição da produção de NO e da actividade da iNOS em macrófagos murinos, bloqueando também a capacidade dos macrófagos agirem como células apresentadoras de antígenos (revisto por Moore et al., 1993). Foi descrito por Mizuno e seus colaboradores (1994), que as células no SNC, nomeadamente a microglia, também produzem IL-10. No estudo realizado por Sawada e seus colaboradores (1999), foram investigados os efeitos da IL-10 nas funções microgliais tais como na produção de citocinas, produção do anião $O_2^{\cdot-}$ e proliferação dependente de factores de crescimento. Verificou-se que a IL-10 inibe a produção de TNF- α e IL-1 β induzida pelo LPS, a actividade lisossomal e a produção do anião $O_2^{\cdot-}$ numa maneira dependente da concentração, mas não afecta a proliferação da microglia dependente de GM-CSF (Sawada et al., 1999).

A citocina anti-inflamatória TGF- β é uma citocina pleiotrópica com propriedades neurotróficas e imunossupressoras (Makwana et al., 2007). Foi comprovado por Schilling e seus colaboradores (2001) que o TGF- β é um dos factores solúveis libertados pelos astrócitos responsável pela indução da ramificação microglial (Schilling et al., 2001). Outros estudos onde usaram microglia ramificada crescida numa monocamada de astrócitos, demonstraram o forte efeito inibitório do TGF- β 1 na proliferação da microglia (Jones et al., 1998), o que coincide com experiências *in vivo* que sugerem que o TGF- β 1 é responsável pela sub-regulação da resposta microglial após a ocorrência de lesões (Kiefer et al., 1993; Morgan et al., 1993).

Estas citocinas anti-inflamatórias podem ainda regular a produção de EROs e ERNs microglial, através da expressão de enzimas antioxidantes e de arginase. A IL-10 e o TGF- β induzem a expressão da HO-1 (Kutty et al., 1994; Lee e Chau, 2002), enquanto a IL-4 e IL-13 originam a sobre-expressão da arginase-1 (Rutschman et al., 2001). A arginase transforma a arginina em ornitina e ureia, o que origina a depleção de arginina, um dos substratos da iNOS, resultando na inibição da geração de NO a partir

de macrófagos activados e microglia (Rutschman et al., 2001). A IL-4 e IL-13, também exercem os seus efeitos anti-inflamatórios através da indução da morte de células inflamatórias, como por exemplo as microglias (revisto por Yang et al., 2007).

1.3.4. Regulação da activação microglial por enzimas antioxidantes

A geração pela microglia de EROs são um importante mecanismo de defesa do sistema nervoso contra microorganismos intracelulares e também de potencial dano para os neurónios quando estas moléculas tóxicas são libertadas para o espaço extracelular. A activação microglial induzida por vários estimuladores inflamatórios, incluindo a proteína A β , plasminogénio, gangliósidos, IFN- γ e LPS, origina a produção de EROs (Kang et al., 2001; Min et al., 2003; Min et al., 2004; Min et al., 2006; Qin et al., 2004). As enzimas antioxidantes, tais como a HO-1, a oxidoreductase da quinona-NADPH (NQO) e a SOD, diminuem as respostas inflamatórias através da redução dos níveis intracelulares de EROs (revisto por Yang et al., 2007). Entre estas enzimas antioxidantes, o papel anti-inflamatório da HO-1, que catalisa a conversão do grupo heme a biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ião ferroso (Fe²⁺), tem sido caracterizado em detalhe (revisto por Maines, 1988). A descoberta de que em modelos de encefalomielite autoimune experimental, a bilirrubina, convertida em biliverdina, atenua os danos oxidativos no sítio da lesão, confirma que a HO-1 desempenha uma função anti-inflamatória no cérebro (revisto por Liu et al., 2003). Recentemente foram descritos os papéis anti-inflamatórios e antioxidantes da HO-1 na microglia (Min et al., 2006; Bani-Hani et al., 2006). Todos os produtos da HO-1 suprimem a expressão de iNOS induzida pelo IFN- γ e /ou a produção de TNF- α na microglia (Min et al., 2006; Bani-Hani et al., 2006).

Os estímulos inflamatórios activam a expressão de enzimas antioxidantes, juntamente com a produção de EROs. Sendo assim, estas enzimas previnem um aumento prolongado dos níveis intracelulares de EROs, o que por sua vez regula a expressão de mediadores inflamatórios e mantém a homeostase (revisto por Yang et al., 2007).

1.4. Neuroinflamação e doenças neurodegenerativas

Inflamação é a primeira resposta do sistema imunitário do nosso corpo a agentes patogénicos ou irritação. Em condições agudas, esta protege o tecido contra agentes invasores e promove a sua recuperação. Por outro lado, quando mantida cronicamente pode causar sérios danos ao tecido do próprio hospedeiro (Kim e Joh, 2006). Os astrócitos e a microglia são os representantes cerebrais do sistema imunitário, e conseguem actuar sob condições patológicas como células competentes imunitárias. Após activação, as células gliais reactivas adquirem várias competências potencialmente neurotóxicas, como por exemplo, através da libertação de mediadores promotores de inflamação e radicais oxidativos. Desde que esses factores se mantenham sobre um controlo restrito, as células gliais reactivas desempenham um papel benéfico na defesa e reparação do SNC. No entanto, uma crescente activação glial patológica, que envolve a microglia e os astrócitos, pode contribuir para danos secundários nas células nervosas (revisto por Markiewicz e Lukomska, 2006).

A inflamação cerebral está associada ao desenvolvimento de um grande número de doenças neurológicas, existindo várias evidências que demonstram o seu envolvimento activo na patogénese de doenças tais como a DP, a EM, a DA e a demência associada com o VIH (Banati et al., 1998; McGeer et al., 1988). A principal característica da neuroinflamação é a activação da microglia (Kim et al., 2000). A capacidade da microglia em responder selectivamente a moléculas envolvidas na neurotransmissão permite-lhes permanecer no seu estado de repouso de forma a registarem continuamente a integridade fisiológica do seu microambiente e reagirem rapidamente no caso de distúrbios patológicos (revisto por Yang e tal., 2007). Elas respondem não só a mudanças na integridade do parênquima cerebral mas também a pequenas alterações no seu microambiente, tais como desequilíbrios na homeostase iónica que precede mudanças patológicas (Gehrmann et al., 1993). Apesar de desempenharem um papel crítico na defesa do hospedeiro através da remoção de microorganismos invasores e células neoplásicas, ou através da secreção de factores neurotróficos, a microglia pode agravar os efeitos da inflamação e causar degeneração neuronal (Kim e Joh, 2006). Através da libertação de moléculas tóxicas ou através da fagocitose de células vizinhas, a microglia activada pode formar um ciclo auto-contínuo de degeneração neuronal. Assim, a intervenção nos processos de activação microglial

poderá ser um promissor alvo terapêutico para o tratamento de um grande número de doenças neurodegenerativas (Kim e Joh, 2006).

1.4.1. Doença de Parkinson

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada por anomalias motoras incapacitantes, tais como tremores, fraqueza muscular, rigidez, bradicinésia, escassez de movimentos voluntários e instabilidade postural (Fahn e Przedborski, 2000). Epidemiologicamente, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum nos idosos, a seguir à DA, com uma prevalência de cerca de 360 por 100.000 e uma incidência de 18 por 100.000, sendo responsável por 80% dos parkinsonismos. Em relação à etiopatogenia da DP, actualmente, a hipótese que é mais aceite, corroborada por estudos com grande número de pacientes, é a de que a DP é uma doença multifactorial com determinantes genéticos, ambientais e/ou relacionados com o envelhecimento (Shannon, 2004).

As características patológicas desta doença incluem a degeneração dos neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) com a consequente perda das fibras que projectam para o estriado, associada a inclusões citoplasmáticas neuronais conhecidas como corpos de Lewy (revisto por Olanow e Tatton, 1999), formados principalmente pela proteína neuronal α -sinucleína (Koo et al., 2008). Esses agregados proteicos acumulam-se nos neurónios, onde ao ultrapassar um determinado limiar acarretam neurotoxicidade com consequente morte neuronal e concomitante redução da aferência dopaminérgica para o estriado (Koo et al., 2008).

Sob o aspecto neuroquímico, observa-se na DP que a degeneração de neurónios dopaminérgicos da via nigroestriatal, como se pode verificar na Figura 3, leva a uma intensa redução dos níveis de dopamina no estriado, bem como em outros núcleos da base (Gerlach e Riederer, 1996). Correlações entre análises clínicas e bioquímicas mostram que os sintomas característicos da DP começam a aparecer quando aproximadamente 60% e 80% dos conteúdos de dopamina na SNpc e no putamen, respectivamente, são perdidos (revisto por Dauer e Przedborski, 2003).

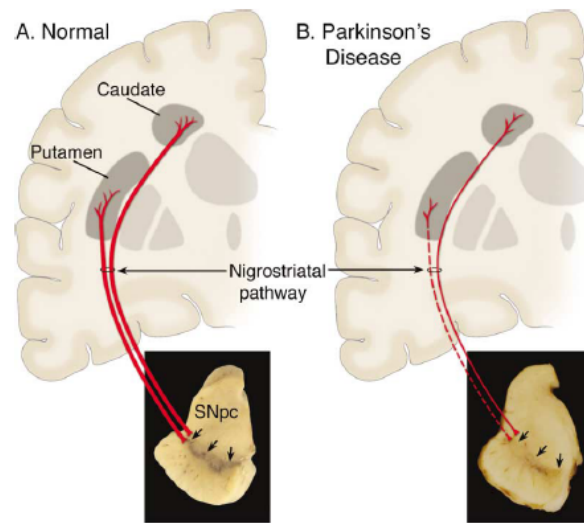


Fig. 3. Neuropatologia da doença de Parkinson. Representação ilustrativa da via nigrostriatal normal (A) e na DP (B) (retirado de Dauer e Przedborski, 2003).

1.4.2. Activação da microglia e a DP

A presença de stress oxidativo, actividade inflamatória e uma proliferação significativa da microglia, bem como um aumento do estado de activação destas células, são as características patológicas mais significativas da DP (Kim e Joh, 2006). A microglia está presente em grandes quantidades dentro do cérebro, no entanto esta não se encontra distribuída com uma densidade ou morfologia uniformes em todas as regiões do cérebro. Esta heterogeneidade pode implicar uma sensibilidade desigual à neurotoxicidade mediada pela microglia em diferentes regiões do cérebro (Lawson et al., 1990). Foi demonstrado por Kim e seus colaboradores (2000), que, no encéfalo, a SN tem a mais alta densidade celular microglial, e que após danos cerebrais, induzidos por injeção de LPS, a microglia se torna activa, o que provoca neurodegeneração nesta área (Kim et al., 2000). Os dados obtidos neste estudo provaram que os neurónios mesencefálicos são significativamente mais susceptíveis do que os neurónios corticais ou do hipocampo a processos de neurodegeneração mediada pela inflamação, e esta neurotoxicidade diferenciada pode ser atribuída, pelo menos em parte, às diferenças na abundância da microglia dentro desta região específica do cérebro. Para além da SN ser

uma região relativamente rica em microglia comparativamente a outras regiões cerebrais (Lawson et al., 1990; Kim et al., 2000), os neurónios dopaminérgicos na SN possuem um nível reduzido de glutathiona intracelular, tendo assim uma baixa capacidade antioxidante, o que os torna significativamente mais susceptíveis a uma grande variedade de danos, incluindo stress oxidativo e danos mediados pela microglia activada (Kim et al., 2000). Sendo assim, os neurónios dopaminérgicos residem num ambiente rico em microglia potencialmente perigoso, o que pode desempenhar um papel activo na neurodegeneração selectiva característica da DP (revisto por McGeer et al., 2001).

A maior questão acerca da vigilância imunitária do cérebro e a sua contribuição para as doenças neurodegenerativas está relacionada com o balanço delicado entre citocinas pró- e anti-inflamatórias libertadas pelo ambiente glial. A avaliação *ex vivo* do fluido cerebrospinal de doentes de Parkinson ou EM revelou um predomínio de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Mogi et al., 1996; revisto por Navikas e Link, 1996; Tarkowski et al., 1999; Vawter et al., 1996). Estas observações levaram à hipótese de que a desregulação da expressão e secreção de citocinas derivadas da microglia, possa estar envolvida na etiopatogénese de várias doenças neurodegenerativas (revisto por Rosenstiel et al., 2001).

A degeneração neuronal dopaminérgica mediada pela microglia activada foi também demonstrada em estudos recentes através do uso de modelos animais. Foi provado que a microglia desempenha um importante papel na degeneração neuronal dopaminérgica induzida por rotenona (Gao et al., 2003) e foi também demonstrado que a inibição da activação microglial previne a perda neuronal dopaminérgica em ratinhos tratados com MPTP (Wu et al., 2003). Este modelo da DP utiliza a neurotoxina MPTP para induzir neurodegeneração nos neurónios dopaminérgicos, de forma a se estudar a patogénese da doença e testar estratégias neuroprotectoras.

Em resumo, a activação microglial é principalmente tencionada para a protecção neuronal fazendo parte do processo regenerativo. No entanto, em várias neuropatologias, onde a inflamação crónica está presente, os produtos inflamatórios derivados da microglia activada podem também contribuir para a perda neuronal (revisto por Streit et al., 2008). Uma vez que os astrócitos são um dos principais reguladores da activação microglial, um maior conhecimento dos possíveis factores libertados por estas células que previnam a passagem de um estado anti-inflamatório da microglia para um estado pró-inflamatório, pode possibilitar novas abordagens no

estudo das interacções astrócitos-microglia e no controlo da neuroinflamação em situações patológicas.

2. Objectivos

O objectivo geral do presente estudo foi investigar o efeito de mediadores solúveis libertados pelos astrócitos na activação microglial induzida pelo agente inflamatório Zymosan A (ZyA) e avaliar a natureza desses mediadores. Especificamente, os objectivos foram analisar a actividade fagocítica microglial, induzida por diferentes concentrações de ZyA (0.5 e 5 µg/mL) e os níveis celulares de EROs após exposição a 5 µg/mL de ZyA; investigar o efeito do MCA não fraccionado ou diferentes fracções desse MCA (<3 kDa, <10 kDa, <30 kDa e <50 kDa) na actividade fagocítica microglial e níveis de EROs; avaliar a expressão de moléculas tais como o GDNF, BDNF, MT-I, MT-II, MT-III, TGF-β1, NT-4, MANF e CDFN pelos astrócitos e averiguar qual a importância do GDNF e da MT-I/II na modulação da activação microglial pelos astrócitos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os frascos de cultura foram obtidos da BD Falcon e as placas de cultura da Nunc. Os tubos de fraccionamento com membranas de poros de diferentes tamanhos foram adquiridos à Centricon, Millipore (<3kDa), e à Vivaspin, Sartorius (<10 kDa, <30kDa e <50kDa). O anticorpo primário anti-CD11b de ratinho foi obtido da Chemicon, o anticorpo primário anti-GFAP de galinha e o anticorpo anti-GDNF de coelho foram adquiridos à Santa Cruz Biotechnology e o anticorpo anti-MT-I/II de ratinho na Dako. O soro fetal bovino (FBS) foi obtido da Biochrom AG. O Hoescht, o TRI, os deoxinucleótidos trifosfatados (d´NTPs), os *Random Primers*, o tampão *First-Strand* 5x, o ditioneitol (DTT) e a enzima Transcriptase reversa do vírus da leucemia de murino *moloney* (M-MLV RT), as microesferas de poliestireno, o 2,7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) e o anticorpo secundário Alexa Fluor® 546, cabra anti-ratinho e o Alexa Fluor® 488, cabra anti-galinha foram obtidos na Invitrogen. O MgCl₂, o tampão A 10x, os d´NTPs utilizados para a reacção de cadeia polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e a *Taq* DNA Polymerase foram adquiridos à Vivantis e os *primers* à Stab Vida. O *loading buffer* 10x foi adquirido na Takara. Todos os outros reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich ou Merck.

3.2. Culturas de células gliais do mesencéfalo ventral

Os animais foram manipulados de acordo com os requisitos éticos nacionais para a investigação animal, e de acordo com a Convenção Europeia para a Protecção de Animais Vertebrados Usados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos. Foram preparadas culturas de células da glia do mesencéfalo ventral baseadas em protocolos previamente descritos (Culbert et al., 2006; McCarthy e de Vellis 1980; Saura et al., 2003). Brevemente, o mesencéfalo ventral (Figura 4) foi obtido a partir de cérebros de ratos Wistar recém-nascidos com 3-5 dias e colocado em tampão fosfato salino (PBS: NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7.4) frio.

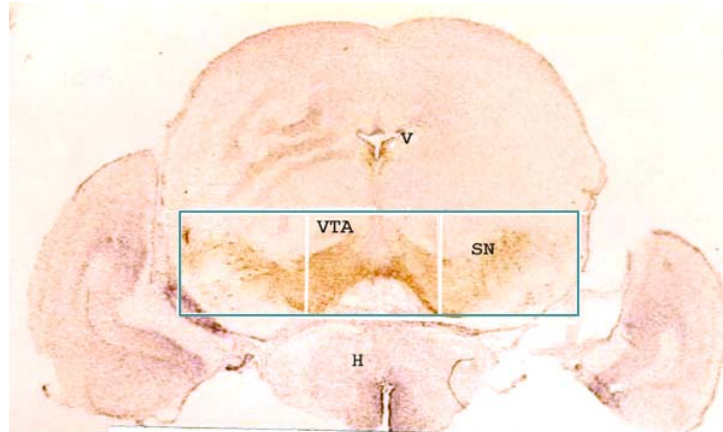


Fig. 4. Representação da secção coronal do cérebro de rato que define a zona pretendida para dissecação – o mesencéfalo ventral. SN: substantia nigra; VTA: área tegmental ventral (retirado de Staal et al., 2007).

Seguidamente foram retiradas cuidadosamente as meninges, e o mesencéfalo ventral foi mecanicamente dissociado por ressuspensão utilizando uma pipeta de 5 mL, seguido de 5-10 passagens sequenciais através de pontas estéreis com orifícios de tamanho 20G, 21G e 25G. Finalmente a suspensão celular foi passada através de um filtro de nylon com poro de 70 μm , e centrifugada durante 10 min a 230 x g à temperatura ambiente (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glucose suplementado com 10% de FBS, 100 unidades/mL penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina. Fez-se uma diluição 1:1 da suspensão celular obtida com azul de tripano a 0,4% em NaCl a 0,9%. A utilização desta solução baseia-se no princípio de que células viáveis apresentam membranas intactas, que evitam a entrada do corante, enquanto membranas de células mortas metabolicamente inactivas (não viáveis) não conseguem evitar a penetração do corante na célula. A partir dessa diluição contaram-se as células viáveis (não coradas) ao microscópio óptico utilizando uma câmara de Neubauer. Após as diluições necessárias em DMEM, as células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm^2 , previamente revestidos com poli-D-lisina, numa densidade de 13.33×10^3 células/ cm^2 . As culturas foram mantidas numa incubadora a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar. O meio de cultura foi mudado a cada 3-4 dias, sendo as primeiras mudanças realizadas com troca de apenas metade do volume total por meio

novo, e a última mudança feita com troca de todo o meio por meio novo, de forma a remover detritos celulares resultantes do processo de isolamento.

Após 9-10 dias *in vitro* (DIV), as culturas foram agitadas a 160-200 rpm (AGITORB200, Aralab) durante 2 horas a 37°C, de modo a separar as células da microglia para o sobrenadante, permanecendo os astrócitos na monocamada aderente ao frasco de cultura. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado durante 8 min a 230 x g, à temperatura ambiente (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). O sedimento resultante foi ressuscitado em DMEM (9 mL por cada frasco de cultura de 75 cm²) e as microglias foram cultivadas em placas de 24 (contendo lamelas) ou 48 poços, previamente revestidas com poli-D-lisina, e mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, durante 13 DIV. O meio foi mudado a cada 3-4 dias, sendo todas as mudanças realizadas com troca de metade do volume total por meio novo.

Após o processo de agitação, os astrócitos foram mantidos em DMEM durante 1-3 dias numa incubadora a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, até atingirem a confluência. Nesta fase, e para inibir a divisão celular astrocítica foi adicionado citocina β-D-arabinofuranosida (Ara-C) de forma a obter uma concentração final de 10 μM.

3.3. Obtenção do MCA

Vinte e quatro horas após a adição de Ara-C procedeu-se ao condicionamento dos astrócitos através da aspiração de todo o meio em cada frasco de cultura, sendo substituído por 10 mL de DMEM. As células foram mantidas na incubadora e depois de 24 horas, recolheu-se o MCA e procedeu-se ao seu armazenamento a -80°C. Na Figura 5 encontra-se esquematizado o tratamento das culturas de astrócitos para obtenção do MCA.

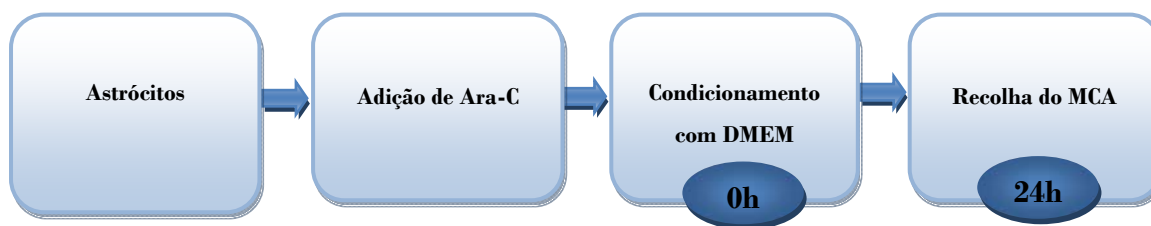


Fig. 5. Esquema representativo do tratamento das culturas de astrócitos.

3.4. Fraccionamento do MCA e DMEM

O fraccionamento do MCA e DMEM (controlo) foi feito em tubos de fraccionamento contendo membranas com poros de diferentes tamanhos, permitindo a passagem de moléculas com diferentes pesos moleculares (até 3 kDa, 10 kDa, 30kDa e 50kDa). Os tubos de fraccionamento foram previamente esterilizados em etanol 70% durante duas horas, lavados com H₂O Mili-Q estéril. O MCA e DMEM foram colocados nestes tubos e centrifugados durante 15 minutos a 2157 x g (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges) para os tubos de fraccionamento de 10 kDa, 30kDa e 50kDa, ou durante 8 horas a 2028 x g (Heraeus Multifuge 1S-R Centrifuga, Thermo Electron Corporation) para os tubos de fraccionamento de 3 kDa. Após o fraccionamento, o MCA ou DMEM foi aplicado às culturas de microglia, conforme descrito na secção 3.5.

3.5. Tratamento das culturas de microglia

As microglia do mesencéfalo ventral permaneceram em cultura até ao 13^o DIV, altura em que foram expostas a DMEM (controlo) ou MCA não fraccionado ou a fracções destes meios com diferentes pesos moleculares (<3 kDa, <10 kDa, <30kDa e <50kDa). Após 24 horas foi aplicado o estímulo inflamatório, ZyA, numa concentração de 0.5 ou 5 µg/mL, e passadas 24 horas avaliou-se a actividade fagocítica da microglia, conforme descrito na secção 3.7. Na Figura 6 está resumido o tratamento das culturas da microglia.

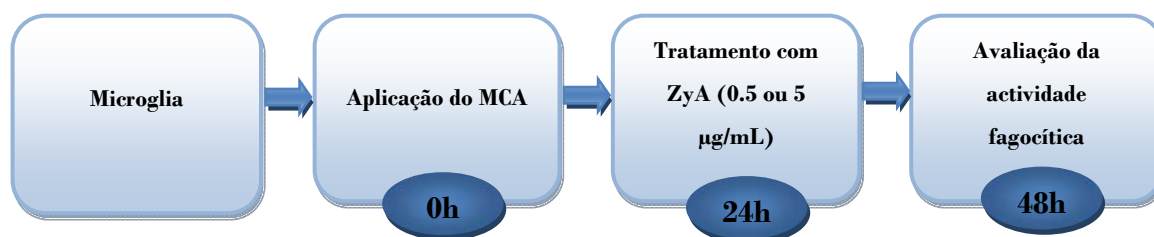


Fig. 6. Esquema representativo do tratamento das culturas de microglia.

3.6. Adição dos anticorpos anti-GDNF e anti-MT às culturas de microglia

Para a averiguação do papel desempenhado pelo GDNF e pela MT-I/II na modulação da actividade fagocítica microglial pelos astrócitos, foi adicionado ao MCA o anticorpo anti-GDNF de coelho (1:1000) ou anti-MT-I/II de ratinho (1:1000). Após uma incubação de 15 min, à temperatura ambiente, o MCA foi adicionado às culturas de microglia conforme descrito na secção 3.5. As culturas foram então tratadas com 0.5 µg/mL de ZyA nas experiências com anti-MT ou 5 µg/mL de ZyA para as experiências usando anti-GDNF.

3.7. Avaliação da actividade fagocítica da microglia

A fim de avaliar a resposta fagocítica das culturas de microglia, depois da exposição ao MCA (ou DMEM) e ao ZyA, as células foram incubadas com 0.01% de microesferas de poliestireno (1 µm) durante 15 min. As células foram depois lavadas com DMEM para remover as microesferas que não foram encapsuladas e foram então fixadas em paraformaldeído a 4%, durante 20 min. De seguida procedeu-se à marcação dos núcleos com o corante fluorescente Hoescht. Para isso, as células foram permeabilizadas com PBS contendo 1% de Triton X-100 durante 5 min e incubadas com Hoescht, dissolvido em PBS contendo 0.1% de Tween-20 (PBS-T) a uma concentração final de 2 µM, durante 10 min. A esta incubação seguiram-se três lavagens sequenciais com PBS-T. As células com aparência fluorescente fortemente pontuada, células fagocíticas, e o número total de células foram contadas num

microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss), com uma ampliação de 63x. Em cada experiência independente, foram analisados 80 campos e o número de células fagocíticas foi apresentado como percentagem relativamente ao número total de células.

3.8. Avaliação da pureza das culturas de microglia

A pureza das culturas primárias de microglia foi avaliada por imunocitoquímica, utilizando anticorpos específicos para CD11b (marcador de microglia) e GFAP (marcador de astrócitos). Para tal, as microglias foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 20 min antes da permeabilização com PBS contendo 1% de Triton X-100 durante 5 min à temperatura ambiente. Após aspiração da solução de permeabilização, foi adicionada a solução de bloqueio (PBS-T contendo 20% de FBS) durante 3 horas à temperatura ambiente. Depois da lavagem com PBS-T, as células foram então incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários (diluídos em PBS-T contendo 1% de FBS): anti-CD11b de ratinho (1:150) e anti-GFAP de galinha (1:800). Depois de seis lavagens sequenciais com PBS-T, de modo a remover o excesso de anticorpo primário, as células foram incubadas durante 1 hora com os anticorpos secundários (diluídos em PBS-T contendo 1% de FBS) apropriados conjugados a Alexa Fluor® 546, cabra anti-ratinho (1:1000), ou Alexa Fluor® 488, cabra anti-galinha (1:1000). As células positivas para CD11b e GFAP foram contadas em 80 campos diferentes utilizando um microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss), com uma ampliação de 63x.

3.9. Medição dos níveis de EROs

Para se detectar a produção de EROs, foi utilizado o composto DCFDA. O princípio deste ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente DCFDA no interior das células, originando o substrato oxidável 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH). O DCFDA é um composto estável, não fluorescente e lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células (Robinson, 1998). Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFDA para formar o DCFH o qual, devido à

sua polaridade, fica confinado no citoplasma. As EROs geradas durante o *burst* respiratório oxidam o DCFH formando o 2',7'-diclorofluoresceína oxidado (DCFoxi), que possui fluorescência verde, cujo espectro apresenta um pico para um comprimento de onda de excitação a 485 nm e de emissão a 535 nm. A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular torna-se uma medida dos metabolitos oxidativos produzidos pelas células, em particular do H₂O₂ (Bass et al., 1983). As células expostas ao ZyA durante 24 horas foram incubadas com 10 µM de DCFDA (preparado em DMEM), 2 horas a 37°C, antes do final do tempo de incubação. A fluorescência emitida foi lida no espectrofluorímetro (FluoroMax®-4; Horiba) utilizando um comprimento de onda de excitação a 485 nm e de emissão a 535 nm.

3.10. Extração de RNA total

Após recolha do MCA, os astrócitos foram lisados com o reagente TRI (0.1 mL/cm²), de acordo com o protocolo do fabricante, para a extração de RNA total. De seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio por cada mL de TRI utilizado para a extração do RNA, após o qual se procedeu a uma centrifugação a 12000 x g, durante 15 min a 4°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), de modo a causar a separação da mistura em três fases: uma fase orgânica inferior vermelha onde se encontram as proteínas, a interface onde está o DNA e uma fase aquosa superior incolor onde reside o RNA. Esta última fase foi recolhida para um novo tubo, onde se adicionou 500 µL de isopropanol por cada mL de TRI utilizado, de modo a precipitar o RNA. Após uma centrifugação a 12000 x g, durante 15 min a 4°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), removeu-se o sobrenadante, e lavou-se o sedimento de RNA através da adição de etanol 75% a -20°C (1 mL por cada mL de TRI usado). Depois de uma última centrifugação a 7500 x g durante 10 min a 4°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen), o sobrenadante foi eliminado e o sedimento foi seco ao ar durante 5-10 min. O sedimento contendo o RNA foi ressuscitado em 20 µL de água tratada com 0.01 % de dietil pirocarbonato (DEPC) e foi aquecido a 60°C durante 4-5 min. Os níveis de RNA total foram quantificados através do uso do espectofotómetro UV/Vis NanoPhotometer™ (Implen), onde foi lida a densidade óptica (OD) a 260 e 280 nm. A

concentração de RNA total foi calculada com base na OD₂₆₀ e no coeficiente de extinção para o RNA, tendo em conta o factor de diluição utilizado. A integridade do RNA foi analisada através da razão A₂₆₀/ A₂₈₀, onde valores entre 1,7 e 2 foram considerados adequados.

3.11. Síntese de cDNA

Para a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) a partir de RNA total de astrócitos, foram preparadas duas misturas (*mix*₁ e *mix*₂), cujo volume é referente ao número de amostras utilizadas mais uma (n+1). A *mix*₁ consistiu em *Random Primers* (concentração final 0.3 µg/µL) e d’NTPs (concentração final 1.0 mM), e a *mix*₂ em 4 µL de tampão *First-Strand* 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8.3 à temperatura ambiente), KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM], DTT (concentração final 0.025 M), M-MLV RT (concentração final 20U/µL) e água DEPC. Foi utilizado, para cada amostra, 10 µL da *mix*₁, juntamente com o volume de RNA total correspondente a 1µg. Esta mistura foi incubada no termociclador (My CyclerTM, thermal cycler, Biorad) durante 5 min a 65°C. De seguida os tubos foram retirados do termociclador e foram-lhes adicionados 8 µL da *mix*₂, sendo novamente incubados no termociclador 10 seg a 25°C, 60 min a 37°C e 15 seg a 75°C.

3.12. RT-PCR

Os primers para o GDNF, o BDNF, o factor neurotrófico derivado dos astrócitos mesencefálicos (MANF), a MT-I, a MT-IIA, e a MT-III foram obtidos a partir dos seguintes artigos (Hashimoto et al., 2005; Zhao et al., 2004, Tadimalla et al., 2008; Liu et al., 2007; Sogawa et al., 2001, respectivamente). Os primers para a NT-4, o TGF-β1, o factor neurotrófico dopaminérgico conservado (CDNF) e para a desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH) foram desenhados através do software Beacon Designer 7.2 (Premier Biosoft), tendo-se obtido as seguintes sequências apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos primers específicos para o GDNF, BDNF, MANF, MT-I, MT-IIA, MT-III, NT-4, TGF- β 1, CDFN e GAPDH, usados para as reacções de RT-PCR.

Primer	Sequências	Tamanho do produto RT-PCR	Ciclo PCR
GDNF	<p>Forward 5' ATTCTGGCGTTACCTTG 3'</p> <p>Reverse 5' CTGTATTCCGTCCTTGG 3'</p>	368 pares de bases (bp)	<p>95 °C 5' } 95 °C 40'' } 45 59°C 30'' } ciclos 72°C 40' } 72°C 5' }</p>
BDNF	<p>Forward 5' CGTGATCGAGGAGCTGTTGG 3'</p> <p>Reverse 5' CTGCTTCAGTTGGCCTTTCG 3'</p>	343bp	<p>95°C 5' } 95°C 40'' } 45 57°C 30'' } ciclos 72°C 40' } 72°C 5' }</p>
MT-III	<p>Forward 5' CGTGATCGAGGAGCTGTTGG 3'</p> <p>Reverse 5' CTGCTTCAGTTGGCCTTTCG 3'</p>	236bp	<p>95°C 2' } 94°C 30'' } 40 60°C 30'' } ciclos 72°C 30' } 72°C 5' }</p>
MANF	<p>Forward 5' TGCAAAGGCTGTGCAGAGAAG 3'</p> <p>Reverse 5' ATGAACTGCTGTTCCCTCCG 3'</p>	130bp	<p>95°C 5' } 95°C 40'' } 45 57°C 30'' } ciclos 72°C 40' } 72°C 5' }</p>
MT-IIA	<p>Forward 5' TGTGCCACAGATGGATCCT 3'</p> <p>Reverse 5' GCAGCCCTGGGAGCACTT 3'</p>	126bp	<p>95°C 2' } 94°C 30'' } 40 52°C 30'' } ciclos 72°C 30' } 72°C 5' }</p>
MT-I	<p>Forward 5' TGTGCCTGAAGTGACGAACAG 3'</p> <p>Reverse 5' TTCACATGCTCGGTAGAAAACG 3'</p>	122bp	<p>95°C 2' } 94°C 30'' } 40 53°C 30'' } ciclos 72°C 30' } 72°C 5' }</p>
NT-4	<p>Forward 5' GGATGGCTCGACTGCTCTAC 3'</p> <p>Reverse 5' AAACCCCATTTGGTTTCCTC 3'</p>	120bp	<p>95°C 5' } 95°C 40'' } 45 60°C 30'' } ciclos 72°C 40' } 72°C 5' }</p>

TGF-β1	<p>Forward 5' ATTCCTGGCGTTACCTTG 3'</p> <p>Reverse 5' CTGTATCCGTCCTTGG 3'</p>	116bp	<p>95°C 5'</p> <p>95°C 40''</p> <p>59°C 30''</p> <p>72°C 40'</p> <p>72°C 5'</p>	40 ciclos
CDNF	<p>Forward 5' GATTCTACAACCTTGCTAAC 3'</p> <p>Reverse 5' GCTCTTCCTCTATGGTATCG 3'</p>	63bp	<p>95°C 5'</p> <p>95°C 40''</p> <p>58°C 30''</p> <p>72°C 40'</p> <p>72°C 5'</p>	40 ciclos
GAPDH	<p>Forward 5' ATCACCATCTTCCAGGAGCG 3'</p> <p>Reverse 5' GATGGCATGGACTGTGGTCA 3'</p>	325bp	<p>95°C 5'</p> <p>95°C 40''</p> <p>60°C 30''</p> <p>72°C 40'</p> <p>72°C 5'</p>	45 ciclos

Foi preparada uma mistura com os *primers* adequados (concentração final de 0.02 pmol/μL para os todos os primers, com a excepção dos primers para a MT, com uma concentração final de 1 pmol/μL), MgCl₂ (concentração final 2 mM), 5 μL de tampão A 10x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.1 a 20°C, e 0.1% TritonTM X-100), d'NTPs (concentração final 0.2 mM), *Taq* DNA Polymerase (concentração final 2U/μL) e água DEPC até perfazer um volume final de 49μL, aos quais se adicionou 1μL de cDNA. O RT-PCR foi efectuado com cinco amostras biológicas, através do uso do termociclador (My CyclexTM, thermal cyclex, Biorad). Os níveis de expressão relativos de mRNA foram normalizados utilizando-se o GAPDH como controlo interno e foi usado como controlo negativo da reacção uma mistura com os *primers* adequados, sem adição de cDNA. Os produtos de RT-PCR amplificados foram submetidos a uma electroforese em gel de 1% agarose para o GDNF, BDNF e MT-III ou em gel de 2% agarose para o TGF-β1, NT-4, MANF, CDNF, MT-I e MT-II sendo depois visualizados sob luz ultravioleta. O *loading buffer* 10x foi utilizado a uma concentração final de 0.25 μg/μL, sendo constituído por dodecilsulfato de sódio (SDS) 1%, 0.05 % de azul de bromofenol e 50% de glicerol.

3.13. Análise de dados e estatística

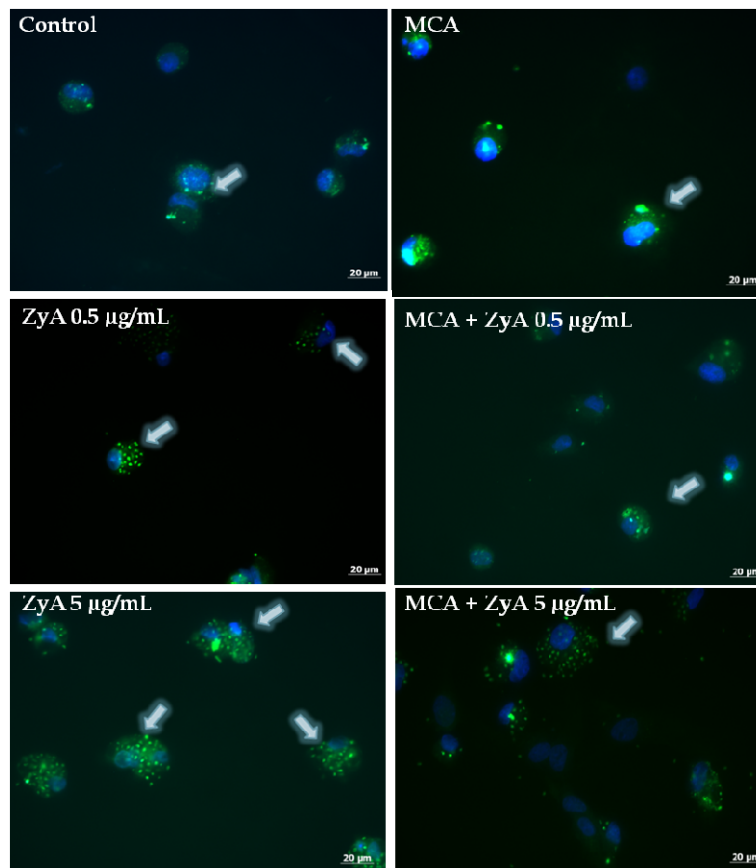
Os dados foram expressos como percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, ou como percentagem relativamente aos valores obtidos em condições controlo (conforme indicado) e representam a média \pm o erro padrão da média (S.E.M.) de pelo menos três experiências, realizadas em triplicado, em culturas de células independentes. A análise dos dados obtidos foi efectuada com o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA. A análise estatística foi efectuada usando o teste one-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's Multiple Comparison. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. Efeito do MCA na actividade fagocítica da microglia induzida pelo agente inflamatório ZyA

A determinação da pureza das culturas primárias de microglia, avaliada por imunocitoquímica, conforme descrito na secção 3.8, revelou uma pureza microglial de aproximadamente 80%. Para a determinação do efeito do MCA na actividade fagocítica microglial induzida por ZyA, as culturas de microglia do mesencéfalo ventral, foram expostas a MCA (ou DMEM – controlo), e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de ZyA (0.5 e 5 µg/mL). Foi realizada a quantificação das células com aparência fluorescente fortemente ponteadada, referidas como células fagocíticas, e o número total de células. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 7.

A)



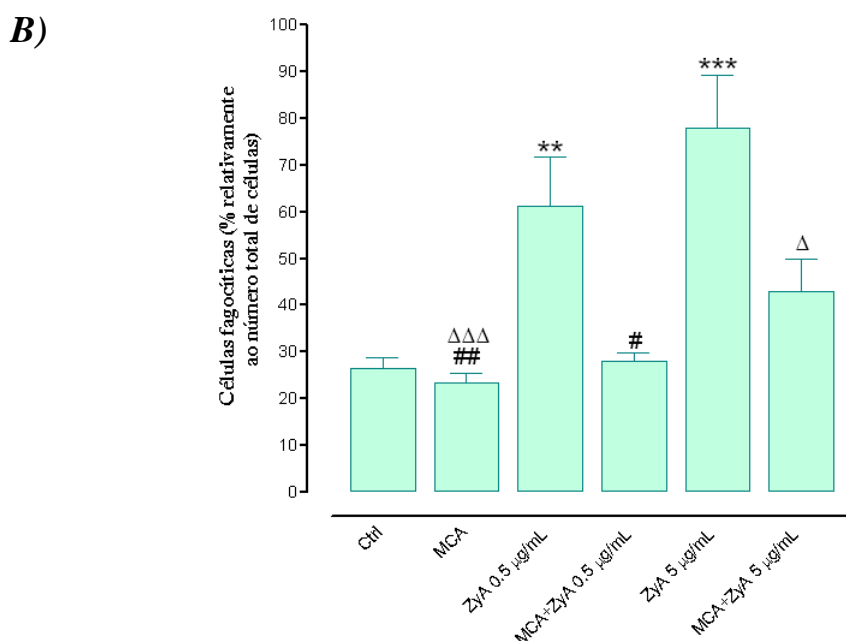


Fig. 7. Efeito do MCA na actividade fagocítica microglial após exposição a diferentes concentrações de ZyA. A. Imagens de fluorescência representativas das culturas microgliais pré-condicionadas durante 24h com DMEM (controlo-Ctrl) ou MCA, expostas a 0.5 ou 5 µg/mL de ZyA por um período adicional de 24h e posteriormente incubadas com microesferas fluorescentes. As imagens foram obtidas através de um microscópio de fluorescência invertido Zeiss (Axiobserver Z1, Zeiss); ampliação 63x, escala: 20 µm. B. Quantificação das células fluorescentes ponteadas brilhantes (setas em A) após exposição a DMEM ou MCA e 0.5 ou 5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células e representam a média ± SEM de 7 experiências independentes realizadas em triplicado. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, # $P < 0.05$ e ### $P < 0.01$ quando comparado com 0.5 µg/mL de ZyA, $^{\Delta}P < 0.05$ e $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$ quando comparado com 5 µg/mL de ZyA.

Os resultados mostram que ambas as concentrações de ZyA, com meio não condicionado pelos astrócitos, aumentaram a actividade fagocítica microglial, com um maior efeito para a concentração mais alta de ZyA (26.44 ± 2.27, 61.28 ± 10.49 e 77.96 ± 11.30% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições controlo, 0.5 e 5 µg/mL ZyA, respectivamente). Como se pode verificar na Figura 7, com a concentração de 0.5 µg/mL houve um aumento no número de células microgliais fagocíticas de 131.7%, enquanto que para a concentração de 5 µg/mL, o efeito foi mais pronunciado, com um aumento de 194.9%, relativamente à situação controlo. A pré-incubação com o MCA foi capaz de prevenir o aumento da actividade fagocítica induzida pelo ZyA, em ambas as concentrações utilizadas, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo (27.75 ± 1.89 e 42.89 ± 6.95% de células fagocíticas,

relativamente ao número total de células, para as condições MCA com 0.5 µg/mL de ZyA e MCA com 5 µg/mL ZyA, respectivamente). Verificou-se também que a presença de MCA, por si só, não influencia a actividade fagocítica da microglia, quando comparada com a situação controlo.

4.2. Medição dos níveis de EROs

Foi ainda avaliado outro marcador funcional do estado de activação da microglia, os níveis de EROs, através da utilização do composto DCFDA. Assim, os níveis de EROs foram medidos após incubação da microglia com DMEM (controlo) ou MCA e posterior exposição a 5 µg/mL de ZyA. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 8.

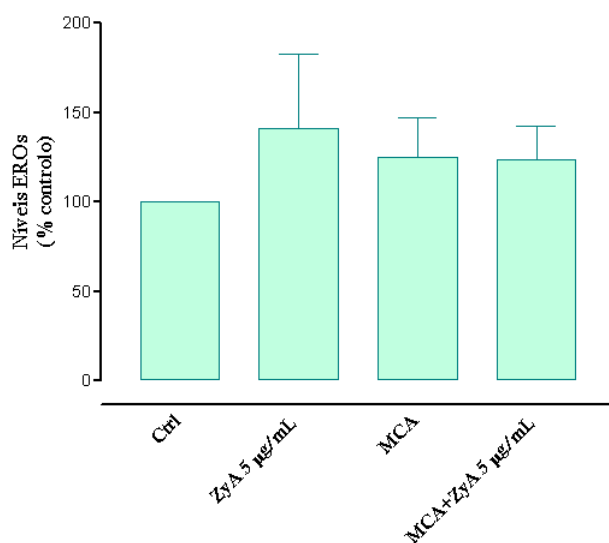


Fig. 8. Medição dos níveis de EROs através da adição de DCFDA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de controlo (Ctrl) e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado.

Não se observaram aumentos significativos na produção microglial de EROs na presença de 5 µg/mL de ZyA, quando comparado com as culturas controlo, para os tempos de incubação utilizados ($140.92 \pm 41.36\%$, relativamente ao controlo). A adição de MCA previamente à incubação das células microgliais com o estímulo inflamatório não causou diferenças significativas nos níveis de EROs relativamente à situação

controlo e à presença de 5 µg/mL de ZyA ($123.45 \pm 18.66\%$, relativamente ao controlo).

4.3. Efeito de fracções de diferentes pesos moleculares do MCA na actividade fagocítica da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA

Como tentativa de restringir os possíveis factores solúveis libertados pelos astrócitos com capacidade de modulação da actividade fagocítica da microglia, foram inicialmente preparadas fracções de MCA (ou DMEM) com pesos moleculares <50 kDa. As culturas de microglia foram então expostas a estas fracções de MCA (ou DMEM), e tratadas posteriormente com 0.5 µg/mL de ZyA. O número de células fagocíticas, assim como o número total de células foram contados. Os resultados encontram-se representados na Figura 9.

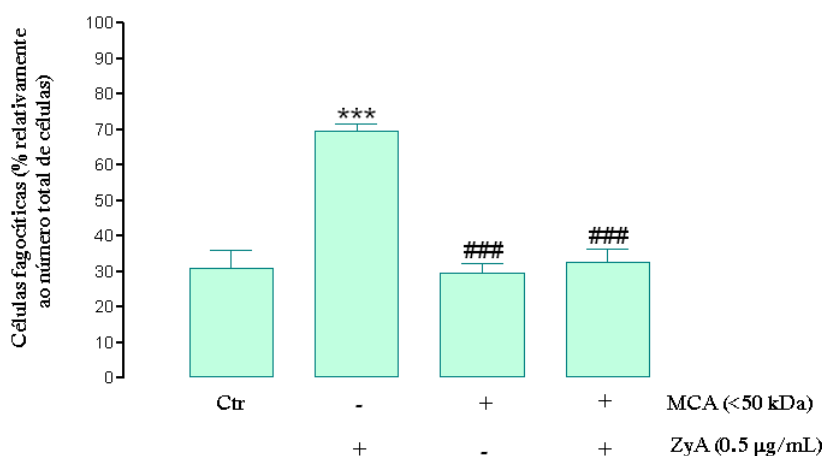


Fig. 9. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <50 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, ### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA.

Verificou-se que com uma concentração de 0.5 µg/mL de ZyA, na ausência de condicionamento pelos astrócitos, ocorreu um aumento na actividade fagocítica microglial para a fracção <50 kDa de DMEM ($30.84 \pm 5.03\%$ e $69.64 \pm 1.96\%$ de

células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições controlo e 0.5 µg/mL de ZyA, respectivamente). Verificamos assim que, nestas condições, houve um aumento de 125.8% no número de células fagocíticas, relativamente à situação controlo, como se pode verificar na Figura 9. A fracção <50 kDa de MCA impediu a activação da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo ($32.48 \pm 3.72\%$ de células fagocíticas, relativamente ao número total de células). Sendo assim, foi decidido testar fracções de MCA com menores pesos moleculares (<30 kDa, <10 kDa e <3 kDa) e verificar o seu efeito na actividade fagocítica da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA, como representado nas Figuras 10, 11 e 12.

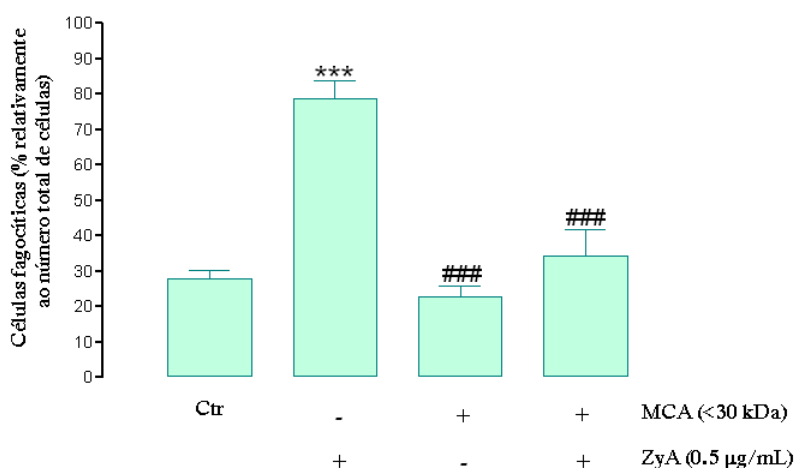


Fig. 10. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <30 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, ### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA.

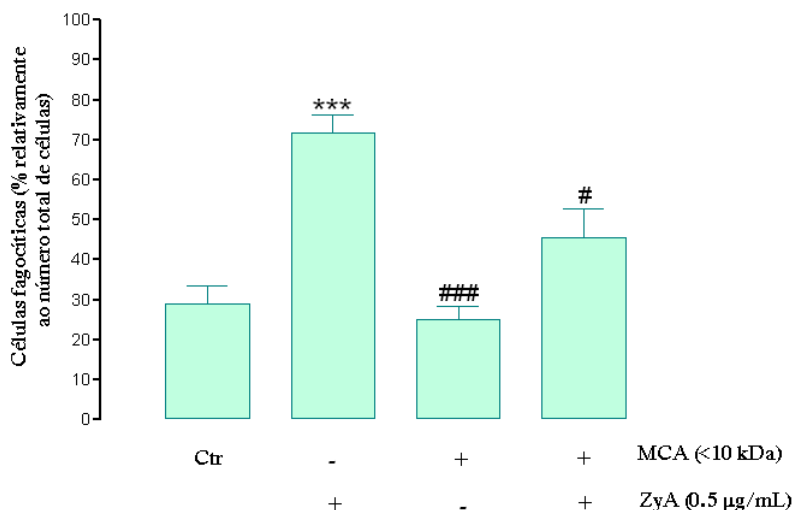


Fig. 11. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <10 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, # $P < 0.05$ e ### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA.

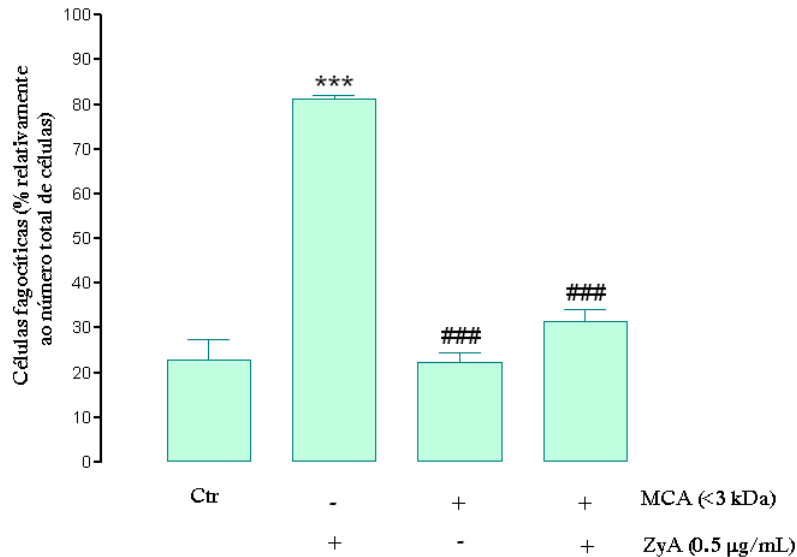


Fig. 12. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <3 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, ### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA.

Os resultados obtidos mostram que com uma concentração de 0.5 µg/mL de ZyA, na ausência de condicionamento pelos astrócitos, houve um aumento na actividade fagocítica microglial em todas as fracções de DMEM testadas (81.28 ± 0.74 ; 71.57 ± 4.52 e $78.78 \pm 4.93\%$ de células fagocíticas, relativamente ao número total de células fagocíticas, para as condições tratadas com ZyA, para as fracções de peso molecular inferiores a 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa de DMEM, respectivamente). Nas situações controlo, para as fracções de DMEM inferiores a 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa, a percentagem de células fagocíticas foi de 22.86 ± 4.56 ; 28.77 ± 4.70 e $27.66 \pm 2.47\%$, respectivamente. Podemos assim verificar que houve um aumento de 255.6%, 148.8% e 184.8%, na actividade fagocítica da microglia na presença de 0.5 µg/mL de ZyA, relativamente à situação controlo, para as fracções de peso molecular inferiores a 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa, respectivamente. Todas as fracções testadas de diferentes pesos moleculares do MCA impediram a activação da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo (31.48 ± 2.66 ; 45.52 ± 7.32 e $34.35 \pm 7.46\%$ de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as fracções inferiores a 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa, respectivamente). O efeito observado parece dever-se essencialmente, à presença de moléculas no MCA com peso molecular inferior a 3 kDa.

4.4. Efeito de fracções de diferentes pesos moleculares do MCA na actividade fagocítica da microglia induzida por 5 µg/mL de ZyA

Para se examinar o efeito de fracções do MCA com diferentes pesos moleculares na regulação da actividade fagocítica microglial induzida por um estímulo inflamatório mais intenso, 5 µg/mL de ZyA, foram preparadas fracções de MCA (ou DMEM-controlo) de distintos pesos moleculares (<50 kDa, <30 kDa e <10 kDa) e foram aplicadas nas culturas de microglia, sendo estas posteriormente activadas com 5 µg/mL de ZyA. As células fagocíticas assim como o número total de células foram contados. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras 13,14 e 15.

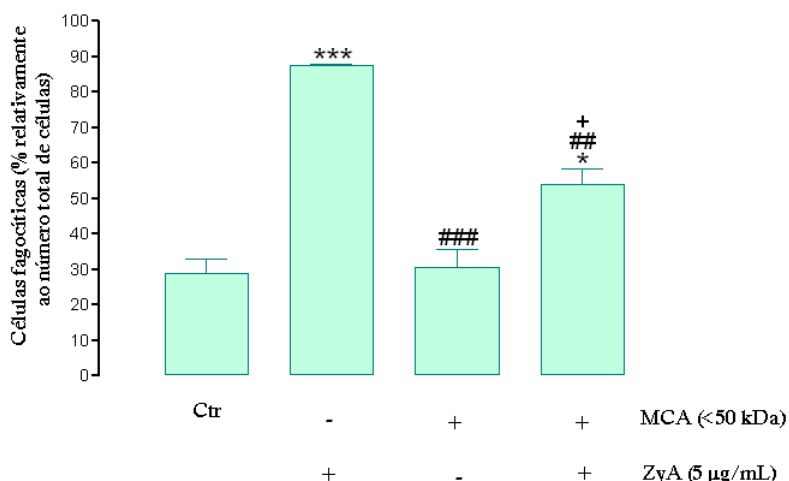


Fig. 13. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <50 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, ### $P < 0.01$ e #### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA, + $P < 0.05$ quando comparado com o MCA.

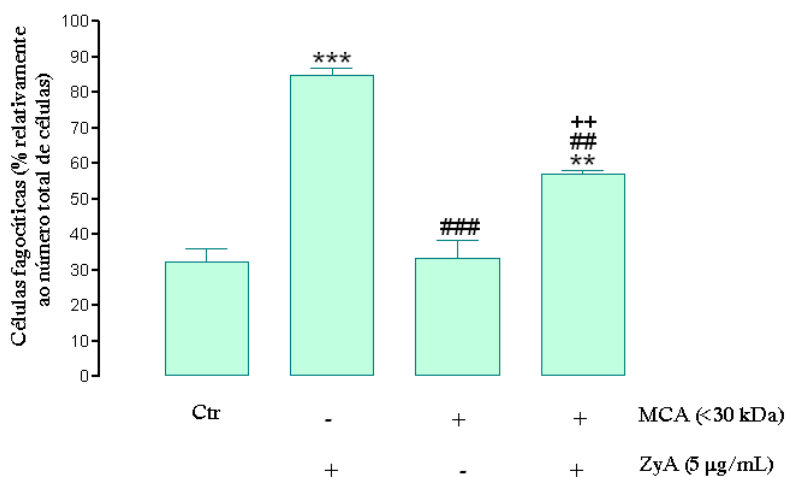


Fig. 14. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <30 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, ### $P < 0.01$ e #### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA, ++ $P < 0.01$ quando comparado com o MCA.

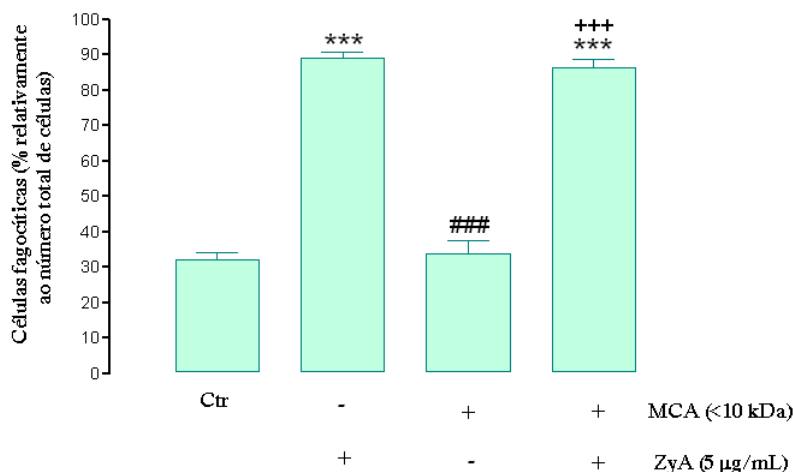


Fig. 15. Número de células fagocíticas nas culturas de microglia do mesencéfalo ventral expostas à fracção de peso molecular <10 kDa do MCA ou DMEM (controlo-Ctr) e posteriormente incubadas com 0.5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células, e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado. *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo, ### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA, +++ $P < 0.001$ quando comparado com o MCA.

Os resultados apresentados demonstram que com uma concentração de 5 µg/mL de ZyA, na ausência de condicionamento pelos astrócitos, houve um aumento na actividade fagocítica microglial para todas as fracções de DMEM testadas (88.93 ± 1.80; 84.72 ± 2.22 e 87.48 ± 0.42% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as fracções de peso molecular inferiores a 10 kDa, 30 kDa e 50 kDa de DMEM, respectivamente). Nas situações controlo, para estas mesmas fracções, a percentagem de células fagocíticas foi de 31.99 ± 2.0, 32.06 ± 3.8 e 28.83 ± 4.0, respectivamente. Como se pode observar nas Figuras 13 a 15, ocorreu um aumento de 178.0%, 164.3% e 203.4%, relativamente à situação controlo, para as fracções <10 kDa, <30 kDa e <50 kDa de DMEM, respectivamente, na presença de ZyA. As moléculas no MCA com peso molecular <10 kDa não parecem contribuir para a prevenção da activação da microglia pelos astrócitos. Para esta fracção do MCA, e na presença de 5 µg/mL de ZyA, a percentagem de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, foi de 86.38 ± 2.46%, semelhante à obtida na ausência de condicionamento pelos astrócitos (88.93 ± 1.80%).

As fracções de MCA inferiores a 30 e 50 kDa, parecem ter um papel mais relevante na prevenção da activação microglial pelos astrócitos, pois a percentagem de

células fagocíticas relativamente ao número total de células, foi de 57.12 ± 0.81 e 53.94 ± 4.38 , para as condições MCA <30 kDa juntamente com ZyA e MCA <50 kDa com ZyA, respectivamente, estatisticamente inferiores às obtidas com meio não condicionado por astrócitos. No entanto, como para as fracções com um peso molecular inferior a 50 kDa, não se obtêm níveis de controlo, certamente existe também a contribuição de moléculas com peso molecular superior a 50 kDa, para o efeito do MCA não fraccionado na activação microglial. Parece assim que a prevenção da activação da microglia pelos astrócitos, na presença de 5 µg/mL de ZyA, se deve principalmente, à presença de moléculas no MCA com peso molecular superior a 10 kDa.

4.5. Avaliação da expressão de GDNF, BDNF, MT-I, IIA e III, NT-4, TGF-β1, MANF e CDFN pelos astrócitos

Com o objectivo de identificar um grupo de possíveis moléculas candidatas, envolvidos no efeito do MCA na activação microglial induzida por ZyA, foi necessário avaliar a sua expressão pelos astrócitos do mesencéfalo ventral. A avaliação da expressão de moléculas tais como o GDNF, BDNF, MT-I, MT-IIA, MT-III, TGF-β1, NT-4, MANF e CDFN pelos astrócitos, através da utilização de *primers* específicos, foi realizada por RT-PCR. A escolha destas moléculas foi feita com base em dados bibliográficos que descrevem a acção anti-inflamatória e comentem a presença em astrócitos, para a maioria das moléculas referidas (Makwana et al., 2007; Schilling et al., 2001; Raivich et al., 1999; Morgan et al., 1993; Howells et al., 2000; Petrova et al., 2003; Lindholm et al., 2007; Riley et al., 2004: revisto por Hidalgo et al., 2001). A Figura 16 mostra os produtos de RT-PCR submetidos a electroforese em gel de agarose, sendo posteriormente visualizados sob luz ultravioleta.

Amostras (n)

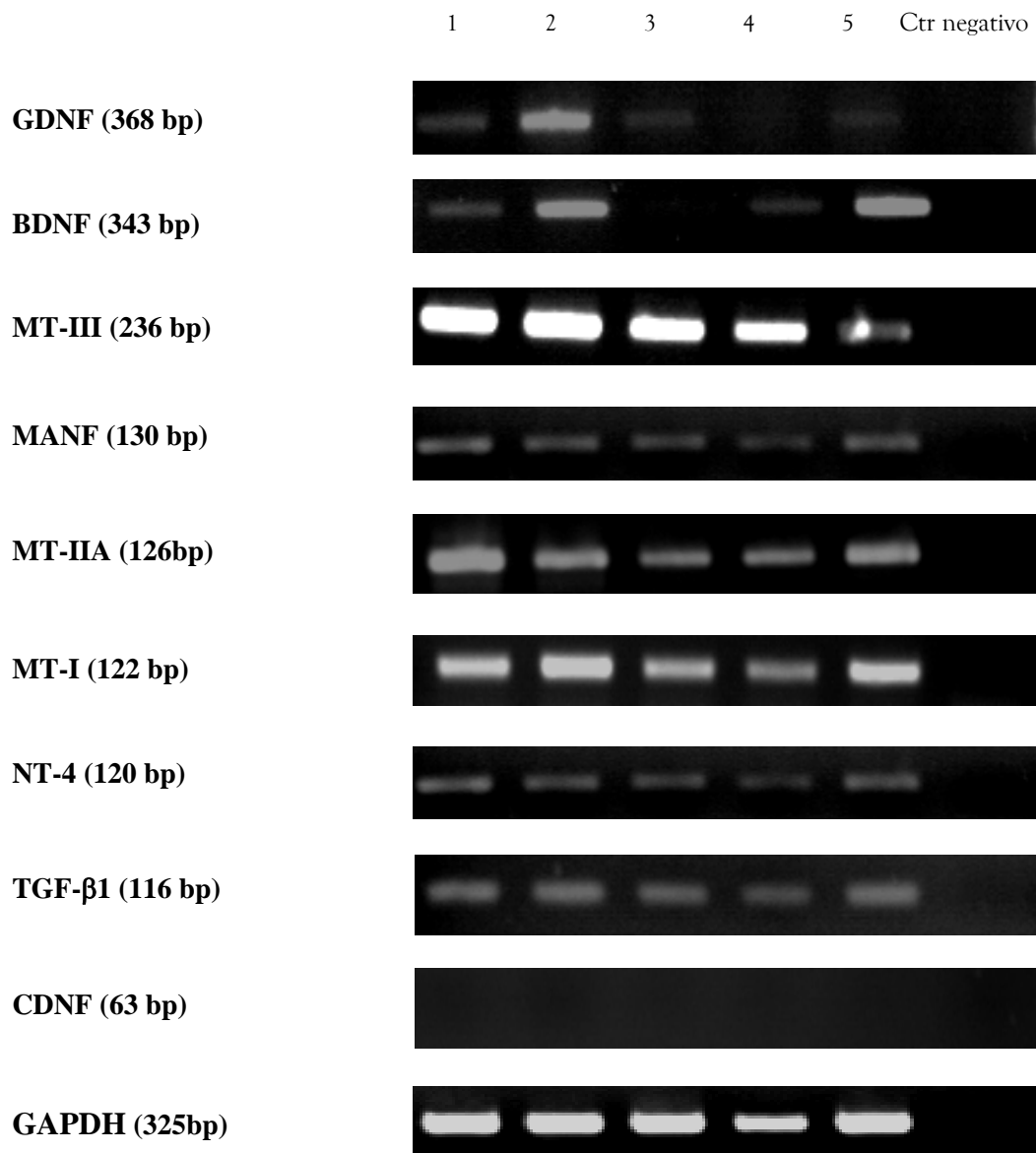


Fig. 16. *Análise, por RT-PCR, da expressão de GDNF, BDNF, MT-I, MT-IIA, MT-III, NT-4, TGF-β1, MANF e CDFN pelos astrócitos. Os produtos de RT-PCR foram submetidos a uma electroforese em gel de 1% agarose para o GDNF, BDNF, MT-III e GAPDH ou em gel de 2% agarose para o TGF-β1, NT-4, MANF, CDFN, NGF, MT-I e MT-II sendo depois visualizados sob luz ultravioleta. As amostras 1 a 5 representam cinco experiências realizadas independentemente e foi usado como controlo negativo da reacção uma mistura com os primers adequados, sem adição de cDNA.*

Os resultados mostram que os astrócitos expressam o mRNA para os factores neurotróficos GDNF, BDNF, NT-4 e MANF, para a citocina anti-inflamatória TGF-β1 e para as proteínas MT-I, IIA e III, não se observando expressão para o factor

neurotrófico CDNF. Como se pode observar na Figura 16, após optimização das condições de PCR para cada molécula, obtivemos bandas específicas de 368 bp, 343 bp, 130 bp, 120 bp, 116 bp, 122 bp, 126 bp e 236 bp, para o GDNF, BDNF, MANF, NT-4, TGF- β 1, MT-I, IIA e III, respectivamente, conforme esperado, sem a ocorrência de bandas inespecíficas. Nos produtos de RT-PCR do GDNF e BDNF existe alguma variabilidade entre as amostras utilizadas, não se observando bandas em algumas amostras. O CDNF não é expresso pelos astrócitos, pois o seu produto de RT-PCR não exibiu uma banda de 63 bp (tamanho esperado do produto de RT-PCR para o CDNF), após ter sido feita a optimização das condições de PCR, onde foram testadas as várias temperaturas de emparelhamento aconselhadas pelo fabricante (53°C, 58°C e 59°C) e também vários números de ciclos de amplificação (38, 40 e 45 ciclos).

4.6. Avaliação da função desempenhada pelo GDNF e pela MT-I/II na prevenção da activação microglial pelos astrócitos

De modo a averiguar o papel desempenhado pelo GDNF e pela MT-I/II, ambos expressos pelos astrócitos do mesencéfalo ventral, na prevenção da activação microglial pelos astrócitos, foram adicionados ao MCA anticorpos anti-GDNF ou anti-MT-I/II, de modo a bloquear as acções desempenhadas por estas moléculas, através da ligação dos anticorpos com as respectivas proteínas. Este MCA contendo o respectivo anticorpo, foi adicionado às culturas de microglia e posteriormente a microglia foi estimulada com 0.5 μ g/mL de ZyA (nas experiências com anti-MT-I/II) ou com 5 μ g/mL de ZyA (para as experiências com anti-GDNF). A actividade fagocítica microglial foi avaliada conforme descrito na secção 3.7., e os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 17.

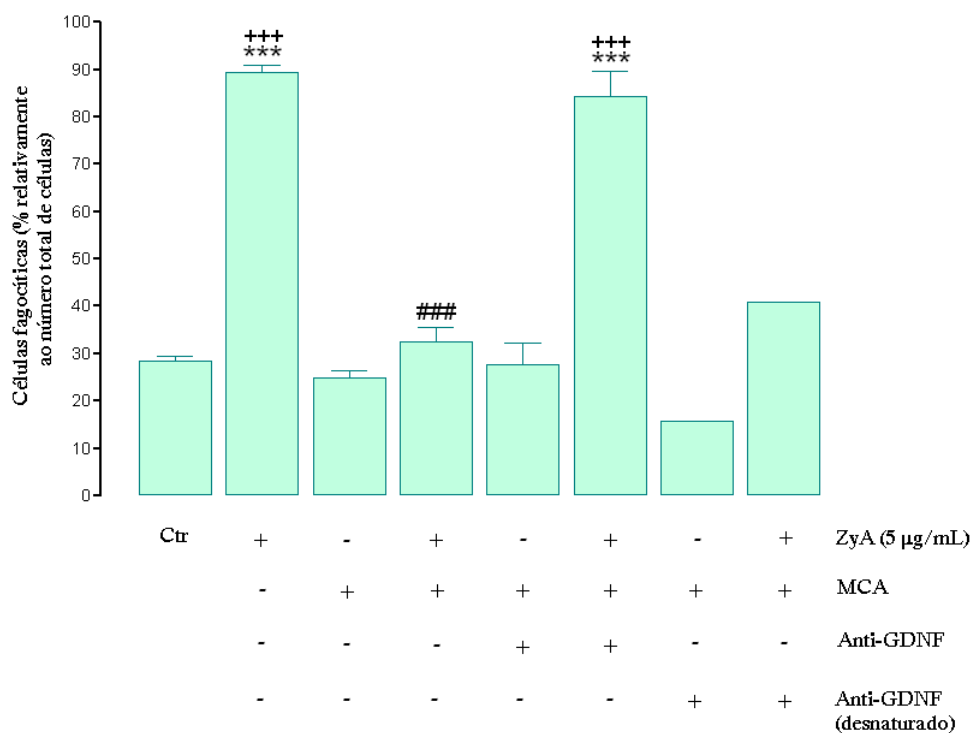


Fig. 17. Avaliação da contribuição do GDNF na prevenção pelos astrócitos, da activação microglial induzida pela concentração de 5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado (excepto para as experiências utilizando anti-GDNF desnaturado, onde os resultados apresentados correspondem a uma experiência realizada em duplicado, *** $P < 0.001$ quando comparado com o controlo (Ctr), ### $P < 0.001$ quando comparado com o ZyA, +++ $P < 0.001$ quando comparado com o MCA).

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram que ocorreu um aumento de 213.3%, relativamente ao controlo, no número de células fagocíticas microgliais, quando incubadas com 5 µg/mL de ZyA (28.50 \pm 0.81 e 89.28 \pm 1.66% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições controlo e ZyA, respectivamente). Como esperado, a adição de MCA previamente à incubação com o ZyA, impediu a activação microglial, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo (32.58 \pm 2.87% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para a condição MCA com ZyA). Quando a acção do GDNF no MCA foi bloqueada por adição do anticorpo anti-GDNF a este meio, o número de células fagocíticas permaneceu semelhante ao observado para a situação contendo ZyA (84.18 \pm 5.41% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para a condição MCA incubado com ZyA e anticorpo anti-GDNF). O anticorpo anti-GDNF desnaturado foi usado como controlo negativo, de modo a anular o efeito específico de

ligação ao GDNF. Nesta condição, obteve-se uma percentagem de células fagocíticas, relativamente ao número total de células (n=1) de 40.86%. Estes valores mostram que a percentagem elevada de células fagocíticas observada na presença de MCA e anti-GDNF é efectivamente devida ao bloqueio da acção do GDNF no MCA.

As experiências preliminares (n=1) realizadas através da adição do anticorpo anti-MT ao MCA, previamente à incubação com 0.5 µg/mL de ZyA (Figura 18), sugerem que o bloqueio da acção da MT-I/II no MCA não previne a activação microglial induzida pelo ZyA. Na presença de 0.5 µg/mL de ZyA, ocorreu um aumento de 222.8% no número de células fagocíticas, relativamente à situação controlo (26.50 e 85.53% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições de controlo e ZyA, respectivamente). A aplicação do MCA contendo o anticorpo anti-MT, previamente à aplicação do ZyA, não alterou a percentagem de células fagocíticas, quando comparado com a situação utilizando apenas ZyA (85.53 e 84.71% de células fagocíticas, relativamente ao número total de células, para as condições de ZyA e de MCA com ZyA e anticorpo anti-MT, respectivamente). Estes resultados sugerem que a MT-I/II pode ser um mediador importante na comunicação astrócitos-microglia, estando envolvida na modulação pelos astrócitos, da activação microglial induzida pela menor concentração de ZyA.

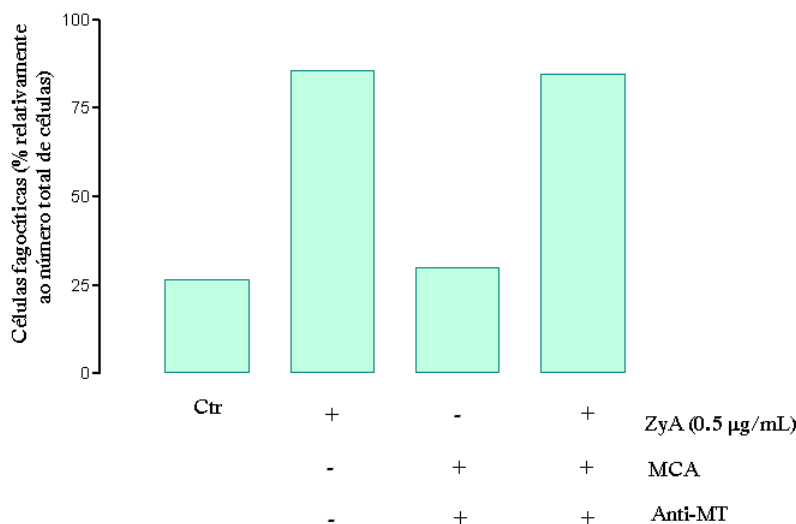


Fig. 18. Avaliação da contribuição da MT-I/II na prevenção, pelos astrócitos, da activação microglial induzida pela concentração de 0.5 µg/mL de ZyA. Os dados apresentados são expressos em percentagem de células fagocíticas relativamente ao número total de células em fagocitose e representam a média de uma experiência realizada em triplicado (Ctr-controlo).

5. Discussão

Com este trabalho experimental pretendeu-se averiguar o efeito dos mediadores solúveis libertados por astrócitos do mesencéfalo ventral na activação da microglia *in vitro* induzida pelo agente inflamatório Z_YA, assim como determinar a natureza das moléculas envolvidas nesta comunicação astrócitos-microglia.

Devido ao facto da microglia desempenhar um papel crítico na resposta inflamatória do cérebro, os estudos que determinem a sua função na propagação ou atenuação de eventos pró-inflamatórios no cérebro são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes a muitas patofisiologias no SNC. As culturas primárias de microglia de roedores forneceram, em particular, um meio reprodutível de estudo deste tipo celular (Floden e Combs, 2007). O isolamento de células da microglia para cultura pode ser obtido por vários métodos, incluindo a utilização do gradiente de Percoll (Ford et al., 1995) ou através de privação nutricional (Hao et al., 1991). O protocolo mais utilizado é o método de agitação descrito simultaneamente por Giulian e Baker (1986) e Frei e seus colaboradores (1986). Com este método, as células da microglia do córtex cerebral foram separadas das culturas gliais mistas confluentes de roedores recém-nascidos, por agitação num agitador orbital. Este método permite a preparação de culturas ricas em microglia (pureza superior a 95%) (Giulian e Baker, 1986; Frei et al., 1986), mas o rendimento obtido é baixo (Saura et al., 2003). Outros estudos em relação ao isolamento da microglia conseguiram obter culturas puras de microglia do hipocampo (Dalmau et al., 2003; Frank et al., 2006), córtex cerebral (Dalmau et al., 2003; Floden e Combs, 2007; Min et al., 2006; Saura et al., 2003), encéfalo anterior (Majed et al., 2006; Milner e Campbell, 2002), substância branca subcortical (Dalmau et al., 2003; de Groot et al., 2001), corpo caloso, córtex pré-frontal, temporal e occipital (de Groot et al., 2001) e de cérebro total (Giulian e Baker, 1986; Park et al., 2007; Wang et al., 2007). Os resultados obtidos no nosso trabalho experimental, mostram uma pureza microglial menor, de aproximadamente 80%, uma vez que apesar de termos otimizado o processo de isolamento e agitação das culturas gliais mistas, por vezes ocorria contaminação com astrócitos, devido a estes se soltarem durante o processo de agitação, e/ou contaminação com células endoteliais,

provavelmente por dificuldades em eliminar completamente as meninges durante a dissecação do mesencéfalo ventral.

Os protocolos iniciais do isolamento da microglia permitiram constatar que existem populações distintas de fenótipos microgliais numa cultura glial mista. Uma célula com um fenótipo amebóide exibe propriedades similares aos macrófagos, incluindo a capacidade de fagocitose, secreção de citocinas e EROs, e capacidade de proliferação *in vitro*. Por outro lado, uma população ramificada tem uma capacidade fagocítica diminuída e uma reduzida velocidade de proliferação (Giulian e Baker, 1986). As células amebóides tipicamente repousam em cima de uma monocamada de astrócitos e podem surgir como agregados ou colónias, o que sugere uma expansão clonal de alguma célula individual ou precursora. As células ramificadas estão debaixo da camada de astrócitos e o número de células ramificadas aumenta com o tempo em cultura, à medida que a microglia se integra na camada astrocítica (Kalla et al., 2003; Tanaka et al., 1999a). Apesar de existirem dois fenótipos distintos, as microglias em cultura podem rapidamente se modificar de uma forma para a outra (Kalla et al., 2003). Para além disso, estes dois fenótipos correspondem, aproximadamente, aos fenótipos que foram definidos *in situ*. Ou seja, as células amebóides são abundantes na embriogénese tardia, diminuindo após o nascimento e aumentando de novo após a ocorrência de lesões (Murabe and Sano, 1983; Tseng et al., 1983).

As culturas de microglia primárias exibem usualmente uma morfologia amebóide activada, possivelmente induzida pelo procedimento do isolamento, que por si só constitui um forte estímulo para a microglia, induzindo a sua activação e consequentemente a sua morfologia amebóide (Fujita et al., 1996; Giulian and Baker, 1986). No entanto, o uso de microglia ramificada em repouso é um pré-requisito para as investigações moleculares da activação microglial, de modo a descrever correctamente o processo de transformação de células quiescentes para células activas inflamatórias (revisto por Rosenstiel et al., 2001).

No presente trabalho experimental, de forma a se estudar o efeito dos astrócitos na regulação da actividade fagocítica da microglia, foi necessário o uso de culturas microgliais em repouso, que se obtêm após 13 DIV depois do processo de isolamento. No estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo, foi possível estabelecer e caracterizar, pela primeira vez, culturas primárias de microglia do mesencéfalo ventral de rato. Estas culturas foram caracterizadas através de estudos morfológicos, da identificação de marcadores microgliais e pela resposta destas culturas ao estímulo pró-

inflamatório ZyA (Cristovão et al., 2009). Através da avaliação da evolução morfológica da microglia em cultura com o tempo, foi observado que nos primeiros 10 DIV, a microglia em cultura exibia predominantemente uma morfologia amebóide característica de um estado activado. A partir do 13º DIV a microglia em cultura assumiu principalmente uma morfologia ramificada, uma característica do estado quiescente da microglia. Esta evolução morfológica foi acompanhada pela diminuição dos níveis de expressão de CD68 (marcador de microglia activada) ao longo do tempo, realçando a correlação entre a morfologia e o estado celular activado/em repouso (Cristovão et al., 2009). Os resultados apresentados pelo nosso grupo indicam assim que a microglia obtida a partir do mesencéfalo ventral de ratos recém nascidos, necessita de permanecer *in vitro* pelo menos 13 dias após o processo de agitação, de forma a readquirir o seu estado ramificado e de repouso, tornando possível o seu uso em estudos futuros como um modelo *in vitro* de microglia em repouso. Estas observações estão de acordo com os dados apresentados por Tanaka e seus colaboradores (1999a), onde são necessários 13 DIV para o aparecimento da maioria das células ramificadas.

No presente estudo, foram usadas duas concentrações de ZyA (0.5 e 5 µg/mL) de forma a activar as células da microglia e a avaliar a resposta fagocítica destas células ao ZyA. Foi seleccionado o ZyA como estímulo inflamatório devido à sua selectividade para a microglia, não existindo nenhum efeito reportado nos astrócitos ou neurónios dopaminérgicos (Fitch et al., 1999; Sweitzer et al., 1999). Ambas as concentrações de ZyA, na ausência de condicionamento pelos astrócitos, aumentaram a actividade fagocítica microglial, com um maior efeito para a concentração mais alta de ZyA. Estas concentrações do agente inflamatório foram escolhidas com base em resultados anteriormente obtidos pelo nosso grupo. Nesse estudo, foi examinada a capacidade da microglia em fagocitar microesferas de poliestireno fluorescentes quando estimuladas com diferentes concentrações de ZyA durante 24 horas (Cristovão et al., 2009). A quantificação das células que incorporaram as microesferas fluorescentes revelou que o tratamento com 0.5 ou 5 µg/mL de ZyA aumentou a actividade fagocítica da microglia, quando comparado com o controlo (Cristovão et al., 2009). Este aumento da actividade fagocítica da microglia é dependente da concentração de ZyA, estando estes resultados de acordo com outros estudos onde foi utilizado o mesmo agente pró-inflamatório (Uryu et al., 2002; Young et al., 2001; Petrova et al., 2000; Zietlow et al., 1999; Mayer et al., 2005 e Slepko e Levi, 1996). Através do uso de ZyA, vários trabalhos descreveram que a microglia activada aumenta a produção de NO (Uryu et al., 2002;

Young et al., 2001), TNF- α (Uryu et al., 2002), anião $O_2^{\cdot-}$ (Colton e Gilbert, 1987; Mayer et al., 2005), PGE₂ (Slepko e Levi, 1996), tromboxano B2 (Mayer et al., 2005), e a expressão de iNOS e CD68 (Slepko e Levi, 1996). Em estudos *in vivo*, quando injectado na substância branca do corpo caloso, o ZyA induziu inflamação persistente com uma activação aumentada da microglia (Fitch et al., 1999), e quando injectado na porção dorsal da medula espinhal aumentou os níveis de IL-1 β (Sweitzer et al., 1999).

No presente trabalho experimental, foram também quantificados os níveis de EROs, após exposição a ZyA, como marcadores funcionais do estado de activação da microglia. A microglia activada liberta uma grande diversidade de factores neurotóxicos tais como as EROs, induzindo a eventual morte dos neurónios dopaminérgicos (Mao et al., 2007). A sensibilidade dos neurónios dopaminérgicos ao stress oxidativo está relacionada com as características inatas da via dopaminérgica nigroestriatal, tais como uma reduzida capacidade antioxidante, um elevado nível de dopamina e lípidos que são susceptíveis à oxidação, um alto conteúdo de ferro que pode provocar a formação de radicais livres adicionais através da reacção de Fenton e uma potencial falha no complexo I mitocondrial que pode levar a uma produção elevada de EROs (revisto por Greenamyre et al., 1999; revisto por Youdim e Riederer, 1993).

Os resultados apresentados no nosso estudo, mostram que o ZyA, a uma concentração de 5 μ g/mL, não provoca aumentos significativos na produção microglial de EROs, quando comparado com as culturas controlo, após uma incubação de 24h. Os dados apresentados diferem dos resultados obtidos por Cristovão e seus colaboradores (2009), onde a estimulação da microglia com 5 μ g/mL de ZyA durante 4h promoveu um aumento significativo nos níveis de EROs em culturas da microglia com 13 DIV, avaliado pela sonda DCFDA (Cristovão et al., 2009). Estas diferenças poderão estar relacionadas com o tempo de exposição ao estímulo inflamatório, pois a produção de EROs pela microglia poderá acontecer nos tempos iniciais de incubação com o ZyA, diminuindo depois ao longo do tempo, devido à acção das enzimas antioxidantes presentes na microglia, que neutralizam os radicais livres, tais como a SOD, a catalase (CAT), a peroxidase e a redutase da glutathiona (revisto por Mosley et al., 2006). Será necessário, no futuro, ajustar os tempos de incubação com ZyA, de forma a se poder avaliar a produção de EROs na presença deste agente. Foi já descrito na literatura que partículas de ZyA, são capazes de activar os fagócitos e desencadear o processo de *burst* respiratório (revisto por Eeden et al, 1999), nomeadamente na microglia através da subunidade CD11b do receptor CR3 (Le Cabec et al., 2000).

No presente trabalho, a adição de MCA previamente à incubação da microglia com o estímulo inflamatório não causou diferenças significativas nos níveis de EROs quando comparado com a condição ZyA. No entanto, a capacidade protectora dos astrócitos contra as EROs foi já demonstrada em vários estudos, estando provado que os astrócitos são capazes de reduzir os efeitos tóxicos exercidos pela microglia (revisito por Giulian et al., 1993). Foi descrito na literatura que a activação microglial pode ser regulada pelo estado oxidativo da célula, através da modulação dos níveis intracelulares de EROs (Min et al., 2003; Min et al., 2004). A exposição a citocinas inflamatórias, por exemplo, aumenta a produção de EROs / ERNs intracelulares e altera a microglia para um estado activado. Pelo contrário, a aplicação de antioxidantes suprime este efeito (Min et al., 2003, Min et al., 2004). Enzimas antioxidantes tais como a HO-1, foram sugeridas como moléculas candidatas para a regulação das EROs intracelulares (Min et al., 2006). Estes investigadores demonstraram que os astrócitos secretam factores capazes de modular a activação microglial através da regulação dos níveis de EROs da microglia e induzir a expressão de um gene antioxidante na microglia *in vitro*, modulando assim o estado redox e de activação da microglia (Min et al., 2006). Em outro estudo realizado por Tanaka e seus colaboradores (1999b), foi demonstrado que os astrócitos previnem a morte neuronal induzida por EROs /ERNs *in vitro*, e que este efeito neuroprotector é dependente não apenas de factores solúveis libertados pelos astrócitos, mas também por proteínas da matriz extracelular, tais como a laminina e a fibronectina (Tanaka et al., 1999b). Foi também demonstrado que a expressão de iNOS e a produção de NO pela microglia expostas a LPS, são inibidas pela presença de astrócitos (Vincent et al., 1997). Foi focado neste estudo o efeito supressivo selectivo dos astrócitos na produção de NO pela microglia activada, através de factores solúveis tais como o TGF- β , pois foi demonstrado anteriormente que a administração exógena desta molécula suprime a produção de nitrato nas células da microglia (Merill et al., 1993) e a indução de iNOS em macrófagos (Ding et al., 1990; Förstermann et al., 1992; Hausmann et al., 1994).

No presente trabalho experimental, apesar de não ter sido possível observar alterações nos níveis de EROs para o tempo de incubação utilizado, o MCA, adicionado 24 horas previamente à adição do estímulo inflamatório, foi capaz de evitar a activação da microglia induzida pelo ZyA, em ambas as concentrações utilizadas, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo. Estes resultados sugerem que factores solúveis libertados por astrócitos são capazes de modular o estado de activação

da microglia, impedindo um aumento na actividade fagocítica em resposta ao estímulo inflamatório ZyA.

Os resultados apresentados neste trabalho, estão de acordo com os dados referidos na literatura, tendo sido já demonstrado que a morfologia da microglia é influenciada pelos astrócitos, que desempenham um papel regulador importante na diferenciação e desactivação microglial. Vários grupos descobriram que as células da microglia de rato modificam a sua forma de amebóide para ramificada, quando cultivadas numa monocamada de astrócitos (Liu et al., 1994; Sievers et al., 1994; Tanaka e Maeda, 1996), no entanto não conseguiram detectar mudanças na morfologia microglial quando a microglia foi exposta ao MCA. Foi então sugerido por estes autores que é necessário um contacto directo entre a microglia e os astrócitos para despoletar o processo de ramificação da microglia. No entanto, Suzumura e seus colaboradores (1990,1991) observaram ramificação de células da microglia de ratinho em cultura expostas ao sobrenadante de astrócitos activados com LPS, e foram os primeiros autores a propor que os factores solúveis libertados por astrócitos activados podem induzir a ramificação microglial (Suzumura et al., 1990; Suzumura et al., 1991). Estes autores também referiram que os sobrenadantes de astrócitos não estimulados não originaram ramificação microglial, o que parece ser contraditório às observações reportadas por Eder et al., (1999). Neste estudo, verificaram que após uma exposição de poucas horas ao meio condicionado por astrócitos não activados, a microglia desenvolveu uma forma ramificada permanente, indicando assim que factores astrocíticos solúveis induzem a ramificação das células da microglia em cultura. No entanto, no estudo realizado por Suzumura et al. (1990,1991) foram utilizadas baixas doses de meio condicionado (até 25%) de astrócitos não estimulados e de astrócitos activados por LPS. O meio de cultura contendo menos de 25% de MCA de astrócitos não estimulados, foi também insuficiente na indução da ramificação da microglia no estudo elaborado por Eder e seus colaboradores (1997). É assim possível, que no MCA a concentração de factores que levam à ramificação microglial, se encontra aumentada após a activação dos astrócitos com LPS (Eder et al, 1999). Todos os estudos citados acima demonstram que o meio condicionado por astrócitos reactivos consegue reverter as células microgliais amebóides activadas para um estado de repouso com uma morfologia ramificada. No entanto, o presente estudo foi realizado com meio condicionado por astrócitos não activados, o que mostra que os astrócitos sem qualquer tipo de estimulação secretam

para o meio factores solúveis capazes de modular a actividade fagocítica da microglia resultante de exposição a um estímulo inflamatório.

Apesar do papel importante dos astrócitos nos processos de ramificação da microglia, é um tema controverso o facto dos factores astrocíticos capazes de modular a morfologia microglial serem solúveis (Eder et al., 1997; Eder et al., 1999) ou insolúveis (Tanaka et al., 1999a). No estudo realizado por Tanaka et al. (1999a), foi demonstrado que mesmo na ausência de astrócitos vivos, as células da microglia ramificavam quando colocadas numa matriz extracelular derivada de astrócitos (MEDA). Este facto implica que os factores não difusíveis dos astrócitos, tais como a fibronectina e laminina, componentes da MEDA, têm também um papel importante na indução da ramificação da microglia (Tanaka et al., 1999a). A fibronectina e laminina, componentes da MEDA (Fok Seang et al., 1995; Oh e Yong, 1996), estavam localizadas à volta das microglias ramificadas, mas não foram encontradas perto das células amebóides (Tanaka et al., 1999a).

Várias funções da microglia são também sub-reguladas pelos astrócitos. Por exemplo, a produção de NO pela microglia, quando estimulada com LPS, é inibida na presença de astrócitos (Vincent et al., 1997). Também foi reportado que os astrócitos são capazes de suprimir a produção da citocina pró-inflamatória IL-12 e iNOS (Aloisi et al., 1997) na microglia tratada com LPS, assim como a fagocitose microglial (DeWitt et al., 1998), provando que os astrócitos têm um importante papel na regulação da activação da microglia, e conseqüentemente têm uma importante função na regulação da inflamação cerebral. Uma vez que os astrócitos podem modificar o comportamento da microglia (Abd-El-Basset e Fedoroff, 1995; Giulian et al., 1995; Liu et al., 1994; revisto por McMillian et al., 1994; Sievers et al., 1994; Suzumura et al., 1991; Tanaka e Maeda, 1996), foi examinado em DeWitt e seus colaboradores (1998), o papel dos astrócitos como potenciais moduladores da capacidade fagocítica microglial. Foi averiguado por estes autores, que a microglia na presença de MCA mostra uma capacidade reduzida de fagocitar microesferas de látex, com um aumento coincidente na sua ramificação. Isto sugere que os factores difusíveis pelos astrócitos têm um papel significativo na regulação da fagocitose microglial (Giulian et al., 1995; Hachimi e Foncin, 1994).

Em relação aos estudos feitos com fracções de diferentes pesos moleculares, todas as fracções testadas de MCA (com pesos moleculares <3 kDa, <10 kDa, <30 kDa e <50 kDa) conseguiram prevenir completamente a activação da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA, mantendo o número de células fagocíticas em níveis de controlo

Isto indica que para uma activação microglial induzida por uma concentração mais baixa de ZyA, os mediadores solúveis derivados dos astrócitos mais relevantes para o efeito observado, são aqueles com um peso molecular <3 kDa. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Min e seus colaboradores (2006), que é, pelo nosso conhecimento, o único artigo que reporta os efeitos de fracções de MCA na activação microglial. Neste estudo foi efectuado o fraccionamento do MCA em moléculas com pesos moleculares abaixo ou acima de 3 kDa. Foi demonstrado que os astrócitos secretam factores capazes de modular a activação microglial, induzida por IFN- γ , através da regulação dos níveis de EROs da microglia. Foi verificado que a fracção que incluía as moléculas com peso molecular <3 kDa induzia a expressão da enzima antioxidante HO-1 e também inibia a expressão de iNOS induzida pelo IFN- γ , enquanto as fracções que incluíam as moléculas maiores do que 3 kDa não produziam qualquer dos efeitos citados acima (Min et al., 2006). Os autores colocaram a hipótese de que a interacção astrócitos-microglia possa assim contribuir para a regulação da inflamação cerebral *in vivo*, sendo os componentes activos no MCA mais pequenos do que 3 kDa.

Tem sido descrito na literatura moléculas, tais como a PGE₂ e a adenosina, capazes de modular o estado de activação da microglia, sendo estas possíveis candidatas a ter em conta em estudos futuros. Foi recentemente reportado por Daley et al., 2005, que factores solúveis produzidos por neutrófilos com um peso molecular <3 kDa, são capazes de alterar as respostas inflamatórias dos macrófagos, mediando a inibição de citocinas pró-inflamatórias e libertação do anião O₂^{-•}. No entanto, a caracterização das moléculas inibitórias não está ainda concluída. Sabe-se apenas que os inibidores da libertação de TNF- α dos macrófagos que têm pesos moleculares <3 kDa, incluem a PGE₂ (Kunkel et al., 1988) e a adenosina (Hasko et al., 1996; Hasko et al., 2000; McWhinney et al., 1996; Sajjadi et al., 1996). Sendo assim, os astrócitos e neutrófilos podem produzir factores solúveis similares que modifiquem a inflamação cerebral e a inflamação sistémica, respectivamente (Min et al., 2006). Para além disso, foi reportado que a adenosina, um nucleósido de purina libertado pelos astrócitos reactivos (revisto por Soliven, 2001), suprime as respostas inflamatórias da microglia no cérebro, através da redução dos níveis de EROs via a expressão da enzima antioxidante HO-1 (Min et al., 2008). Sendo assim, estes resultados sugerem que a adenosina actua como um regulador endógeno da inflamação cerebral via modulação da produção de EROs microglial, podendo também este ser um dos factores libertados pelos astrócitos com

capacidade de prevenção da activação microglial. A PGE₂, mediador lipídico produzido também pelos astrócitos (Xu et al., 2003), tem emergido como uma substância desactivadora crucial da microglia, e parece mediar acções que limitam as respostas imunitárias e inflamatórias (Levi et al., 1998). Foi provado que a indução da iNOS pelo LPS era substancialmente prevenida pela PGE₂ exógena (Minghetti et al., 1997), e que esta era também capaz de inibir a expressão das moléculas co-estimulatórias B7-2 em culturas de microglia de ratinho estimuladas com LPS e IFN- γ (Levi et al., 1998). Para além disso, também já foram reportados efeitos da PGE₂ na produção microglial de citocinas envolvidas nas respostas imunes e inflamatórias, sendo que esta molécula aumenta a expressão e secreção da IL-10, citocina imunomoduladora, em culturas celulares de microglia de ratinho estimuladas com LPS, enquanto diminui a síntese e libertação de TNF- α (Aloisi et al., 1999) e IL-1 β (Caggiano e Kraig, 1998), ambas citocinas pró-inflamatórias. Estes dados sugerem que a PGE₂ poderá também ser um dos possíveis factores secretados pelos astrócitos, que modulam a activação microglial.

No entanto, os nossos resultados também comprovam que para uma concentração de 5 μ g/mL de ZyA, os mediadores solúveis provenientes dos astrócitos com um peso molecular entre 10 e 30 kDa, têm um papel mais relevante na prevenção da activação microglial. Ao contrário do observado para a menor concentração de ZyA, os factores libertados pelos astrócitos com peso molecular inferior a 10 kDa não parecem ser capazes por si só, de prevenir a activação microglial induzida por ZyA. Verifica-se que há uma diferença considerável entre os efeitos obtidos para as fracções de MCA <10 kDa e <30 kDa, o que sugere que os factores solúveis libertados pelos astrócitos, com capacidade de modular a actividade microglial, estejam nesta gama de pesos moleculares. Os diferentes resultados obtidos para as duas concentrações do estímulo inflamatório (0.5 e 5 μ g/mL de ZyA) poderão estar relacionados com as possíveis moléculas anti-inflamatórias libertadas pelos astrócitos, que são diferentes para estímulos com diferente intensidade.

Para a esterilização dos tubos de fraccionamento utilizados para proceder ao fraccionamento do MCA e DMEM (controlo), estes foram mantidos em etanol a 70%, até um período de duas horas, como sugerido pelo fabricante. Para assegurar que o etanol não provocou danos nas membranas, originado a passagem de moléculas com pesos moleculares acima do *cut-off* membranar que estávamos a testar e que pusessem assim em risco a interpretação dos resultados, foi feita uma experiência em que os tubos não foram submetidos à esterilização com etanol, sendo que o MCA fraccionado era

depois filtrado em filtros estéreis com um poro de 0.22 μm . Os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriores o que comprova que a esterilização com etanol a 70%, não prejudica os tubos de fraccionamento (resultados não apresentados).

Como tentativa de delimitar os possíveis factores solúveis libertados pelos astrócitos com capacidade de modulação da actividade fagocítica da microglia quando esta é exposta à maior concentração de ZyA, foi averiguada a expressão de moléculas, tais como o GDNF, o BDNF, o TGF- β 1, a NT-4, o MANF e o CDFN, pelos astrócitos (Figura 16). Estas moléculas foram escolhidas com base no seu peso molecular, superior a 10 kDa, devido aos resultados reportados neste trabalho, que evidenciam que os mediadores solúveis provenientes dos astrócitos com pesos moleculares superiores a 10 kDa, têm um papel importante na prevenção da activação microglial induzida pela maior concentração de ZyA testada (5 $\mu\text{g/mL}$), e também com base nos efeitos anti-inflamatórios e neuroprotectores reportados para estas moléculas (Makwana et al., 2007; Schilling et al., 2001; Raivich et al., 1999; Jones et al., 1998; Kiefer et al., 1993; Morgan et al., 1993; Howells et al., 2000; Petrova et al., 2003; Lindholm et al., 2007; Riley et al., 2004). A citocina anti-inflamatória TGF- β 1 com um peso molecular de 25 kDa, é uma citocina pleiotrópica com propriedades neurotróficas e imunossupressoras (Makwana et al., 2007). Foi comprovado por Schilling e seus colaboradores (2001) que o TGF- β é um dos factores solúveis libertados pelos astrócitos responsável pela indução da ramificação microglial (Schilling et al., 2001). Os dados *in vitro* obtidos por estes investigadores, são suportados pela descoberta de que a microglia *in vivo* de animais que não expressam TGF- β 1 são menos ramificadas do que a microglia de animais controlo (Raivich et al., 1999). Outros estudos onde usaram microglia ramificada cultivada numa monocamada de astrócitos, demonstraram o forte efeito inibitório do TGF- β 1 na proliferação da microglia (Jones et al., 1998), o que coincide com experiências *in vivo* que sugerem que o TGF- β 1 é responsável pela sub-regulação da resposta microglial após a ocorrência de lesões (Kiefer et al., 1993; Morgan et al., 1993). Através de RT-PCR detectámos a expressão do TGF- β 1 nos astrócitos do mesencéfalo ventral, pois obtivemos bandas específicas de 116 bp sem a ocorrência de bandas inespecíficas.

Os factores neurotróficos, de uma maneira geral, promovem a sobrevivência, diferenciação e manutenção dos neurónios no sistema nervoso vertebrado adulto e em desenvolvimento. O BDNF, com um peso molecular entre 13.6 e 14.2 kDa, actua como

factor autócrino ou parácrino na sobrevivência e crescimento dos neurónios dopaminérgicos e níveis diminuídos deste factor neurotrófico pode provocar a morte dos neurónios dopaminérgicos na DP (Howells et al., 2000). Este factor é expresso pelos astrócitos (Knot et al., 2002), sendo os nossos resultados concordantes com o descrito na literatura, pois detectámos através de RT-PCR, bandas de 343 bp bem definidas correspondentes ao produto de RT-PCR do BDNF, não havendo bandas inespecíficas. O MANF, com um peso molecular de 20 kDa (Lindholm et al., 2007), foi descrito há alguns anos, como um factor promotor da sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos embrionários do mesencéfalo *in vitro* (Petrova et al., 2003). Este efeito é específico para os neurónios dopaminérgicos, não tendo sido detectados efeitos nos neurónios GABAérgicos ou serotoninérgicos (Petrova et al., 2003). Este factor neurotrófico foi já descrito como sendo expresso pelos astrócitos (Petrova et al., 2003), o que é concordante com os nossos resultados, onde o produto de RT-PCR do MANF apresentou bandas de 130 bp bem definidas, não ocorrendo bandas inespecíficas. O CDNF, com um peso molecular de 18 kDa, foi recentemente caracterizado como homólogo do factor MANF (Lindholm et al., 2007). Este factor foi identificado como um factor trófico para os neurónios dopaminérgicos (Lindholm et al., 2007) e foi mostrado que *in vivo* previne a degeneração dos neurónios dopaminérgicos induzida pela 6-OHDA, num modelo animal da DP (Lindholm et al., 2007). Apesar de já ter sido reportado que este factor é expresso em vários tecidos do ratinho e humano, incluindo o cérebro de ratinho embrionário e pós-natal (Lindholm et al., 2007), não existem dados na literatura que indiquem que é expresso pelos astrócitos. Os resultados aqui apresentados sugerem que este factor neurotrófico não é expresso pelos astrócitos, pois o produto de RT-PCR do CDNF não apresentou uma banda de 63 bp, correspondente ao tamanho do produto de PCR, após ter sido feita a optimização das condições de PCR, onde foram testadas as várias temperaturas de emparelhamento aconselhadas pelo fabricante e também vários números de ciclos de amplificação. A NT-4 com um peso molecular de 14.5 kDa, é também um factor neurotrófico expresso pelos astrócitos (Riley et al., 2004). Os nossos resultados comprovam estes dados, pois obtivemos produtos de RT-PCR com bandas bem definidas de 120 bp, para a NT-4, não existindo bandas inespecíficas.

Apesar do facto do GDNF ter um peso molecular ligeiramente superior a 30 kDa (33-45 kDa), foi decidido averiguar em maior detalhe a possível função desta molécula na regulação da activação microglial, pois o valor *cut-off* molecular das membranas de

ultrafiltração utilizadas poderá deixar transpor moléculas com pesos moleculares um pouco acima dos 30 kDa. Para uma recuperação máxima deveria ser escolhida uma membrana com um *cut-off* molecular pelo menos 50% mais pequeno do que as moléculas de interesse, de acordo com as informações dos fabricantes. O papel proeminente do GDNF na protecção dos neurónios dopaminérgicos (Granhölm et al., 1997) e a pouca informação acerca das suas funções na microglia foram outros factores que contribuíram para o nosso interesse neste factor neurotrófico. No nosso estudo, verificámos que os astrócitos expressam GDNF, pois os produtos de RT-PCR apresentaram bandas definidas de 368 bp, sem a ocorrência de bandas inespecíficas.

Devido ao facto dos factores solúveis libertados pelos astrócitos com um peso molecular <3 kDa, serem capazes de prevenir a activação da microglia induzida por 0.5 µg/mL de ZyA, considerámos a proteína MT, com um baixo peso molecular, como uma potencial molécula alvo, pois as isoformas I e II desta proteína exibem acções neuroprotectoras no sistema nervoso periférico e central (revisto por Hidalgo et al., 2001). Apesar do facto da MT ter um peso molecular ligeiramente superior a 3 kDa (6 a 7 kDa), foi decidido analisar a possível função desta molécula na regulação da activação microglial, pois o valor *cut-off* molecular das membranas de ultrafiltração utilizadas poderá deixar transpor moléculas com pesos moleculares um pouco acima dos 3 kDa. No presente estudo, comprovámos que os astrócitos expressam mRNA para as isoformas I, IIA e III da MT, através da realização de RT-PCR, onde obtivemos bandas específicas de 122bp, 126bp e 236bp, para as isoformas I, IIA e III da MT, respectivamente, sem a ocorrência de bandas inespecíficas.

De modo a averiguar-se o papel desempenhado pelo GDNF e pela MT-I/II, ambos expressos pelos astrócitos do mesencéfalo ventral no efeito do MCA, na actividade fagocítica microglial, foi adicionado ao MCA os anticorpos anti-GDNF ou anti-MT-I/II, de modo a bloquear as acções desempenhadas por estas moléculas. Posteriormente examinámos o seu efeito na activação da microglia, induzida por 5 e 0.5 µg/mL de ZyA, respectivamente. Os resultados mostram que quando a acção do GDNF foi bloqueada, o número de células fagocíticas permaneceu praticamente inalterável relativamente à condição com 5 µg/mL de ZyA. O anticorpo anti-GDNF desnaturado foi usado como controlo negativo e os valores obtidos mostram que o número elevado de células fagocíticas na presença de ZyA, MCA e anti-GDNF é efectivamente devido ao bloqueio da acção do GDNF. Apesar de os valores apontarem para um papel exclusivo do GDNF como regulador, derivado dos astrócitos, da actividade fagocítica

microglial, é provável que estejam envolvidas outras moléculas neste complexo processo.

As experiências preliminares utilizando o anticorpo anti-MT-I/II, sugerem que a MT-I/II poderá estar envolvida na regulação astrocítica da activação microglial uma vez que o bloqueio da sua acção no MCA suprime a acção anti-inflamatória do MCA na microglia exposta a ZyA. Com base nos resultados referidos e nos dados obtidos da literatura, a MT poderá ser também uma das possíveis proteínas candidatas a terem um papel protector na regulação da activação da microglia.

Os resultados apresentados no presente trabalho experimental poderão contribuir para a identificação de possíveis moléculas solúveis derivadas de astrócitos que possam mediar as interacções astrócitos-microglia e modular as respostas inflamatórias microgliais. Estes factores poderão, no futuro, ser utilizados como importantes agentes anti-inflamatórios na terapia de doenças neurodegenerativas como a DP.

6. Conclusões

Este estudo permitiu investigar o efeito de mediadores solúveis libertados pelos astrócitos na activação microglial induzida pelo agente inflamatório ZyA e avaliar a natureza desses mediadores, tendo-se obtido as seguintes conclusões:

- Os mediadores solúveis libertados pelos astrócitos previnem a activação microglial induzida por diferentes concentrações de ZyA (0.5 e 5 µg/mL).
- Os mediadores solúveis derivados dos astrócitos com pesos moleculares <3 kDa foram capazes de prevenir completamente a activação microglial induzida por 0.5 µg/mL de ZyA.
- Os mediadores solúveis libertados pelos astrócitos com pesos moleculares superiores a 10 kDa têm um importante papel na prevenção da activação microglial induzida pela concentração mais alta de ZyA (5 µg/mL).
- O GDNF e a MT-I/II, moléculas expressas pelos astrócitos, parecem ter um papel importante na comunicação astrócitos-microglia, estando envolvidos na prevenção pelos astrócitos, da activação microglial induzida por 5 e 0.5 µg/mL de ZyA, respectivamente.

7. Perspectivas Futuras

Para a futura identificação dos factores solúveis libertados pelos astrócitos, seria necessário realizar-se procedimentos de Western Blot ou imunoprecipitação de modo a verificar se todas as moléculas expressas pelos astrócitos, nomeadamente o GDNF, BDNF, MT-I, MT-II, MT-III, MANF, NT-4 e TGF- β 1, são também libertadas para o meio. Para além disso, seria também relevante avaliar a contribuição dessas moléculas para o efeito do MCA na activação microglial. Seria também necessário confirmar o papel da MT-I/II na prevenção pelos astrócitos, da activação da microglia.

Seria também importante a realização de estudos *in vivo*, pois a utilização de animais como modelo experimental permite a reprodução das condições do organismo, sendo as respostas obtidas mais próximas da situação real.

8. Referências Bibliográficas

- Abd-El-Basset E, Fedoroff S. 1995. *Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility and cytoskeletal organization of microglia in cultures.* J Neurosci Res 41:222–237.
- Airaksinen MS, Saarna M. 2002. *The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value.* Natl Rev Neurosci 3:383–394.
- Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S, Levi G. 1999. *Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities.* J Neurosci Res 56:571–80.
- Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menéndez Iglesias B, Adorini L. 1997. *IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes.* J. Immunol. 159:1604–1612.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L. 2000. *Regulation of T cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes.* Immunol Today 21:141–147.
- Aloisi F. 2001. *Immune function of microglia.* Glia 36:165–179.
- Ambjørn M, Asmussen JW, Lindstam M, Gotfryd K, Jacobsen C, Kiselyov VV, Moestrup SK, Penkowa M, Bock E, Berezin V. 2008. *Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family.* J Neurochem 104:21–37.
- Appel K, Honegger P, Gebicke-Haerter PJ. 1995. *Expression of interleukin-3 and tumor necrosis factor-beta mRNAs in cultured microglia.* J Neuroimmunol 60:83–91.
- Ashwell K. 1990. *Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum.* Brain Res Dev Brain Res 55:219–230.
- Babior BM. 2000. *Phagocytes and oxidative stress.* American Journal of Medicine 109:33–44.
- Banati RB, Daniel SE, Blunt SB. 1998. *Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease.* Movement Dis 13: 221–227.
- Bani-Hani MG, Greenstein D, Mann BE, Green CJ, Motterlini R. 2006. *Modulation of thrombin-induced neuroinflammation in BV-2 microglia by carbon monoxide-releasing molecule 3.* J Pharmacol Exp Ther 318:1315–1322.
- Barron K. 1982. *The microglial cell: a historical review.* J Neurol Sci 134(Suppl):57–68.
- Bass DA, Parce W, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. 1983. *Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation.* Journal of Immunology 130:1910–1917.
- Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW. 2002. *Macrophages and microglia produce local trophic gradients that stimulate axonal sprouting toward but not beyond the wound edge.* Mol Cell Neurosci 21:436–453.
- Bignami A, Dahl D. 1995. *Gliosis, in Neuroglia.* H. Kettenmann e B. Ransom. (Eds), Oxford University Press, Inc., New York. pp. 843–858.
- Bonney RJ, Wightman PD, Davies P, Sadowski SJ, Kuehl FAJ, Humes JL. 1978. *Regulation of prostaglandin synthesis and of the selective release of lysosomal hydrolases by mouse peritoneal macrophages.* Biochem J 176:433–442.
- Bordey A, Spencer DD. 2003. *Chemokine modulation of high-conductance Ca(2+)-sensitive K(+) currents in microglia from human hippocampi.* Eur J Neurosci 18: 2893–2898.
- Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, Mullis-Sawin SB, Chan J, Wu GC et al. 1995. *Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures.* Brain Res 704: 112–116.
- Brosnan, C. F., L. Battistini, C. S. Raine, D. W. Dickson, A. Casadevall, and S. C. Lee. 1994. *Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview.* Dev. Neurosci. 16:152–161.
- Burch D, Sheerin F. 2005. *Parkinson's disease.* Lancet 365: 622–627.
- Buttini M, Boddeke H. 1995. *Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain microglial cells.* Neuroscience 65:523–30.
- Caggiano AO, Kraig RP. 1998. *Prostaglandin E2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide-induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1β production in cultured rat microglia.* J Neurochem 70:2357–2368.

Carrasco J, Hernández J, Bluethmann H, Hidalgo J. 1998. *Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha type 1 receptor deficient mice reveal a role of IL-6 and TNF-alpha on brain metallothionein-I and -III regulation.* Mol Brain Res 57:221–234.

Carrasco J, Penkowa M, Giralt M, Camats J, Molinero A, Campbell IL, Palmiter RD, Hidalgo J. 2003. *Role of metallothionein-III following central nervous system damage.* Neurobiology of Disease 13:22–36.

Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. 2005. *Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases.* Brain Res Brain Res Rev 48:16–42.

Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. 1991. *Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain.* J. Neurochem. 57:348–351.

Chang YP, Fang KM, Lee TI, Tzeng SF. 2006. *Regulation of Microglial Activities by Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor.* Journal of Cellular Biochemistry 97:501–511.

Choi-Lundberg DL, Bohn MC. 1995. *Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat.* Brain Res Dev Brain Res 85:80–88.

Chugani DC, Kedoresha NL, Rome LH. 1991. *Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia.* J Neurosci 11:256–268.

Colton CA, Gilbert DL. 1987. *Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia.* FEBS Lett 223(2):284–288.

Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. 1998. *Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms.* Clinical Science 94:461–471.

Cristóvão AC, Saavedra A, Fonseca CP, Campos F, Duarte EP, Baltazar G. 2009. *Microglia of rat ventral midbrain recovers its resting state over time in vitro: Let microglia rest before work.* J Neurosci Res (in press).

Culbert AA, Skaper SD, Howlett DR, Evans NA, Facci L, Soden PE, Seymour ZM, Guillot F, Gaestel M, Richardson JC. 2006. *MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease.* J Biol Chem 281(33):23658–23667.

Dabrio M, Rodríguez AR, Bordin G, Bebianno MJ, De Ley M, Sestáková I, Vasák M, Nordberg M. 2002. *Recent developments in quantification methods for metallothionein.* Journal of Inorganic Biochemistry 88:123–134.

Dalmau I, Vela J, Gonzalaz B, Castellano B. 1998. *Expression of purine metabolism-related enzymes by microglial cells in the developing brain.* J Comp Neurol 398:333–346.

Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B. 2003. *Dynamics of microglia in the developing rat brain.* J Comp Neurol 458(2):144–157.

Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. 1993. *Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease.* Neuroscience 52: 1–6.

Dauer W, Przedborski S. 2003. *Parkinson's Disease: Mechanisms and Models.* Neuron 39:889–909.

Daum T, Rohrbach MS. 1992. *Zymosan induces selective release of arachidonic acid from rabbit alveolar macrophages via stimulation of a b-glucan receptor.* FEBS Lett 309:119–122.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo.* Nat Neurosci 8:752–758.

Dayton ET, Major EO. 1996. *Recombinant human interleukin 1-beta induces production of prostaglandins in primary human fetal astrocytes and immortalized human fetal astrocyte cultures.* J Neuroimmunol 71:11–18.

de Groot CJ, Hulshof S, Hoozemans JJ, Veerhuis R. 2001. *Establishment of microglial cell cultures derived from postmortem human adult brain tissue: immunophenotypical and functional characterization.* Microsc Res Tech 54(1):34–39.

De SR, Jmone-Cat MA, Tirassa P, Minghetti L. 2003. *Apoptotic PC12 cells exposing phosphatidylserine promote the production of anti-inflammatory and neuroprotective molecules by microglial cells.* J Neuropathol Exp Neurol 62:208–216.

Del Fiacco M, Quartu M, Serra MP, Follesa P, Lai ML, Bachis A. 2002. *Topographical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human brain stem: an immunohistochemical study of prenatal, neonatal and adult brains.* J Chem Neuroanat 23:29–48.

del Rio Hortega P, Penfield W. 1927. *Cerebral cicatrix. The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds.* Bull Johns Hopkins Hosp 41:278–282.

Derry DM, Wolfe LS. 1967. *Gangliosides in isolated neurons and glial cells.* Science 158:1450–1452.

DeWitt D, A Perry G., Cohen M., Doller C., Silver J. 1998. *Astrocytes Regulate Microglial Phagocytosis of Senile Plaque Cores of Alzheimer's Disease.* Experimental Neurology 149: 329–340.

Diamond J. S. 2006. *Astrocytes put down the broom and pick up the baton.* Cell 125 639–641.

- Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srinivasan S. 1990. *Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1,- β 2,- β 3 inhibit induction of macrophage nitric oxide synthesis by IFN gamma*. J. Immunol 145:940-944.
- Ding M, St Pierre BA, Parkinson JF, Medberry P, Wong JL, Rogers NE, Ignarro LJ, Merrill JE. 1997. *Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia*. J. Biol. Chem. 272:11327–11335.
- Dong Y, Benveniste EN. 2001. *Immune Function of Astrocytes*. Glia 36:180–190.
- Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaey H, Singh BB, Garrett S, Shavali S. 2005. *Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease*. Brain Res Mol Brain Res 134: 67–75.
- Eder C, Klee R, Heinemann U. 1997. *Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K⁺ currents and ramification of brain macrophages*. Neurosci Lett: 226:147-150.
- Eder C, Schilling T, Heinemann U. 1999. *Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro*. Eur J Neurosci 11:4251-4261.
- Eeden SF, Klut ME, Walter BAM, Hogg JC. 1999. *The use of cytometry to measure neutrophil function*. Journal of Immunological Methods 232:23-43.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. 1996. *Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function*. J Neurosci 16: 2508–2521.
- Fahn S, Przedborski S. 2000. *Parkinsonism*. in: Merritt's neurology Rowland LP (Ed). Lippincott Williams & Wilkins, New York 679–693.
- Fetler L, Amigorena S. 2005. *Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol*. Science 309:392–393.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. 1999. *Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma*. J Neurosci 19(19): 8182-98.
- Fitzpatrick FW, DiCarlo FJ. 1964. *Zymosan*. Ann N Y Acad Sci 118:233–262.
- Floden AM, Combs CK. 2007. *Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype*. Journal of Neuroscience Methods 164: 218–224.
- Fok Seang J, Smith Thomas LC, Meiners S, Muir E, Du JS, Housden E, Johnson AR, Faissner A, Geller HM, Keynes RJ, Rogers JH, Fawcett JW. 1995. *An analysis of astrocytic cell lines with different abilities to promote axon growth*. Brain Res 689:207–223.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. 1995. *Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared*. J Immunol 154:4309–4321.
- Förstermann U, Schmidt HHHW, Kohlhaas KL, Murad F 1992. *Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: Inhibition by transforming growth factor- β* . Eur J Pharmacol 225:161-165.
- Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R. 2002 *Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells*. J Neuroimmunol 132:93–98.
- Frank MG, Wieseler-Frank JL, Watkins LR, Maier SF. 2006. *Rapid isolation of highly enriched and quiescent microglia from adult rat hippocampus: immunophenotypic and functional characteristics*. J Neurosci Methods 151(2):121-130.
- Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. 1986. *Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages*. J Immunol 137:3521–3527.
- Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. 1994. *Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed*. J Immunol 152:2720-8.
- Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, Sakanaka M, Maeda N. 1996. *Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study*. Glia 18(4):269-281.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. 2003. *Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease*. Faseb J. 17:1954-6.
- Garden GA, Möller T. 2006. *Microglia Biology in Health and Disease*. J Neuroimmune Pharmacol 1:127–137.
- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. 1996. *Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF*. Nature 380:252–255.
- Geer JR., Keller JN. 2005. *Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E*. Int J Biochem Cell Biol 37:1145–1150.
- Gehrmann J, Banati RB, Kreutzberg GW. 1993. *Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules*. J Neuroimmunol 48:189-198.

- Gerlach M, Riederer P. 1996. *Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man.* J Neural Transm 103: 987-1041.
- Giralt M, Penkowa M, Lago N, Molinero A, Hidalgo J. 2002. *Metallothionein-1 + 2 protect the CNS after a focal brain injury.* Exp Neurol 173:114-128.
- Giulian D, Baker TJ. 1986. *Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain.* J Neurosci 6:2163-2178.
- Giulian D, Corpuz M. 1993. *Microglial secretion products and their impact on the nervous system.* Adv Neurol 59:315-320.
- Giulian D, Ingeman JE. 1988 *Colony-stimulating factors as promoters of amoeboid microglia.* J Neurosci 8:4707-4717.
- Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB. 1995. *Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte.* J Neurosci 15:7712-7726.
- Giulian D, Vaca K, Corpuz M. 1993. *Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival.* J Neurosci 13(1):29-37.
- Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. 1988. *Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain.* J. Neurosci 8:709-714.
- Granhölm AC, Mott JL, Bowenkamp K, Eken S, Henry S, Hoffer BJ, Lapchak PA, Palmer MR, van Horne C, Gerhardt GA. 1997. *Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum.* Exp Brain Res 116:29-38.
- Green SP, Cairns B, Rae J, Errett-Baroncini C, Hongo JA, Erickson RW, Curnutte JT. 2001. *Induction of gp91-phox, a component of the phagocyte NADPH oxidase, in microglial cells during central nervous system inflammation.* J Cereb Blood Flow Metab 21:374-384.
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE, 1999. *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.* Biochem. Soc Symp 66:85-97.
- Hachimi KHE, Foncin JF. 1994. *Do microglial cells phagocytose the b/A4-amyloid senile plaque core of Alzheimer disease?* C R Acad Sci III 317:445-51.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.* Nat Neurosci 10(11):1387-94.
- Hanisch UK. 2002. *Microglia as a source and target of cytokines.* Glia 40:140-155.
- Hao C, Richardson A, Fedoroff S. 1991. *Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells.* Intl J Dev Neurosci 9:1-14.
- Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S. 2005. *Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury.* Neuroreport 16(2):99-102.
- Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabo C. 2000. *Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms.* FASEB J 14:2065.
- Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. 1996. *Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice.* J Immunol 157:4634.
- Hausmann EHS, Hao SY, Pace JL, Parmely MJ. 1994. *Transforming growth factor β 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages.* Infect Immunol 62:3625-3632.
- Hefti F. 1997. *Pharmacology of neurotrophic factors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 37:239-67.
- Hererra AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A. 2000. *The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system.* Neurobiol Dis 7:429-447.
- Hetier E, Ayala J, Deneffe P, Bousseau A, Rouget P, Mallat M, Prochiantz A. 1988. *Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro.* J Neurosci Res 21:391-397.
- Hickey WF, Kimura H. 1988. *Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vitro.* Science 239: 290-292.
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M. 2001. *Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system.* Brain Res Bull 55, 133-145.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. 2000. *Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200).* Science 290:1768-71.

- Honda S, Nakajima K, Nakamura Y, Imai Y, Kohsaka S. 1999. *Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors*. *Neurosci Lett* 275:203–206.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. 2001. *Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors*. *J Neurosci* 21:1975–1982.
- Howells DW, Porritt MJ, Wong JYF, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA. 2000. *Reduced BDNF mRNA Expression in the Parkinson's Disease Substantia Nigra*. *Experimental Neurology* 166:127–135.
- Humes JL, Sadowski S, Galavage M, Goldenberg M, Subers E, Bonney RJ, Kuehl FAJ. 1982. *Evidence for two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages*. *J Biol Chem* 257:1591–1594.
- Ikeda T, Xia XY, Xia YX, Ikenoue T, Han B, Choi BH. 2000. *Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia/hypoxia-induced brain injury in neonatal*. *Acta Neuropathol* 100(2):161-7.
- Inoue K. 2006. *The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release*. *Pharmacol Ther* 109:210–226.
- Jakubowski W, Bartosz G. 2000. *2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?* *Cell Biology International* 10:757-760.
- Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K. 2001. *Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells*. *J Biol Chem* 276:44527–44533.
- Janabi N, Chabrier S, Tardieu M. 1996. *Endogenous nitric oxide activates prostaglandin F2 alpha production in human microglial cells but not in astrocytes: a study of interactions between eicosanoids, nitric oxide, and superoxide anion (O₂⁻) regulatory pathways*. *J Immunol* 157:2129–2135.
- Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G. 1998. *Transforming growth factor beta's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer*. *Brain Res* 795:301–306.
- Kalla R, Bohatschek M, Kloss CU, Krol J, Von Maltzan X, Raivich G. 2003. *Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems*. *Glia* 41(1):50–63.
- Kang J, Park EJ, Jou I, Kim JH, Joe EH. 2001 *Reactive oxygen species mediate A beta (25–35)-induced activation of BV-2 microglia*. *Neuroreport* 12:1449–1452.
- Kelly BA, Carchman RA. 1987. *The relationship between lysosomal enzyme release and protein phosphorylation in human monocytes stimulated by phorbol esters and opsonized zymosan*. *J Biol Chem* 262:17404–17411.
- Kettenmann H, Ransom BR. 2005. *Neuroglia*: Oxford University Press. 60-71.
- Kiefer R, Lindholm D, Kreutzberg GW. 1993. *Interleukin-6 and transforming growth factor-β1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy*. *Eur J Neurosci* 5:775–781.
- Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. 2006. *Blood – neural barrier: intercellular communication at gliovascular interface*. *J Biochem Mol Biol* 39:339–345.
- Kim KY, Kim MY, Choi HS, Jin BK, Kim SU, Lee YB. 2002. *Thrombin induces IL-10 production in microglia as a negative feedback regulator of TNF-alpha release*. *Neuroreport* 13:849–852.
- Kim SU, de Vellis J. 2005. *Microglia in health and disease*. *J Neurosci* 81:302-313.
- Kim W, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. 2000. *Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia*. *The Journal of Neuroscience* 20(16):6309–6316.
- Kim YS, Joh TH. 2006. *Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Experimental and molecular medicine*. 38: 333-347.
- Kim YS, Kim SS, Cho JJ, Choi DH, Hwang O, Shin DH, Chun HS, Beal MF, Joh TH. 2005. *Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia*. *J Neurosci* 25:3701–3711.
- Kipp M, Karakaya S, Pawlak J, Araujo-Wright G, Arnold S, Beyer C. 2006. *Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: Concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors*. *Front Neuroendocrinol* 27:376-390.
- Kloss CU, Kreutzberg GW, Raivich G. 1997. *Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines*. *J Neurosci Res* 49:248-254.
- Knot C, Stern G, Kingsbury A, Welcher AA, Wilkin GP. 2002. *Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease nigra*. *Parkinsonism Rel Disorders* 8:329-341.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. 2006. *Role of astrocytes in cerebrovascular regulation*. *J Appl Physiol* 100:307–317.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. 2002. *Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications*. *Trends Neurosci* 25:154–159.

- Koo HJ, Lee HJ, Im H. 2008. *Sequence determinants regulating fibrillation of human α -synuclein*. *Biochem Biophys Res Commun* 368:772-778.
- Kreutzberg GW. 1996. *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D. 1988. *Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression*. *J Biol Chem* 263:5380.
- Kurpius D, Wilson N, Fuller L. 2006. *Early activation, motility, and homing of neonatal microglia to injured neurons does not require protein synthesis*. *Glia* 54:58-70.
- Kutty RK, Nagineni CN, Kutty G, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B. 1994. *Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta*. *J Cell Physiol* 159:371-378.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. 1990. *Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain*. *Neuroscience* 39:151-170.
- Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. 2000. *Nonopsonic Phagocytosis of Zymosan and Mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) Involves Distinct Molecular Determinants and Is or Is Not Coupled with NADPH Oxidase Activation*. *Infection and Immunity* 68:4736 - 4745.
- Lee SC, Liu W, Brosnan CF, Dickson DW. 1994. *GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures*. *Glia* 12:309-318.
- Lee TS, Chau LY. 2002. *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. *Nat Med* 8: 240-246.
- Levi G, Minghetti L, Aloisi F. 1998. *Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of prostaglandin E₂ on microglial functions*. *Biochimic* 80: 899-904.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. 2004. *Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes*. *Journal of Neurochemistry* 89:1092-1100.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. 1993. *GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons*. *Science* 260:1130-1132.
- Lin LF, Zhang TJ, Collins F, Armes LG. 1994. *Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor*. *J Neurochem* 63:758-768.
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M. 2007. *Novel neurotrophic factor CDFN protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo*. *Nature* 448:73-78.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. 1994. *Neurotrophins and brain insults*. *Trends Neurosci* 17:490-496.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP. 1980. *Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the "amoeboid cells" present in the corpus callosum of postnatal rats*. *J Comp Neurol* 193:631-657.
- Ling EA, Wong WC. 1993. *The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts*. *Glia* 7:9-18.
- Liu B, Hong JS. 2003. *Role of microglia in inflammation mediated neurodegenerative diseases: Mechanisms and strategies for therapeutic intervention*. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1-7.
- Liu J, Cheng ML, Yang Q, Shan KR, Shen J, Zhou Y, Zhang X, Dill AL, Waalkes MP. 2007. *Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China*. *Environ Health Perspect* 115(7):1101-6.
- Liu W, Brosnan C.F, Dickson DW, Lee SC. 1994. *Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte- induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture*. *Am J Pathol* 145:48-53.
- Liu Y, Zhu B, Wang X, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS. 2003. *Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol* 139:27-35.
- Lombard Y, Giaimis J, Makaya Kumba M, Fonteneau P, Poindron P. 1994. *A new method for studying the binding and ingestion of zymosan particles by macrophages*. *J Immunol Methods* 174:155-165.
- Maines MD. 1988. *Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications*. *FASEB J* 2:2557-2568.
- Majed HH, Chandran S, Niclou SP, Nicholas RS, Wilkins A, Wing MG, Rhodes KE, Spillantini MG, Compston A. 2006. *A novel role for Sema3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia*. *J Neurosci* 26(6):1730-1738.

- Makwana M, Jones LL, Cuthill D, Heuer H, Bohatschek M, Hristova M, Friedrichsen S, Ilona Ormsby I, Bueringer D, Koppius A, Bauer K, Doetschman T, Raivich G. 2007. *Endogenous Transforming Growth Factor β 1 Suppresses Inflammation and Promotes Survival in Adult CNS*. The Journal of Neuroscience 27(42):11201–11213.
- Malipiero, U. V., Frei, K. and Fontana, A. 1990. *Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes*. J Immunol 144:3816-3821.
- Mao H, Fang X, Floyd KM, Polcz JE, Zhang P, Liu B. 2007. *Induction of microglial reactive oxygen species production by the organochlorinated pesticide dieldrin*. Brain Research 1186:267–274.
- Markiewicz I, Lukomska B. 2006. *The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system*. Acta Neurobiol Exp 66:343-358.
- Mayer AM, Hall ML, Lynch SM, Gunasekera SP, Sennett SH, Pomponi SA. 2005. *Differential modulation of microglia superoxide anion and thromboxane B2 generation by the marine manzamines*. BMC Pharmacol 5(1):6.
- McCarthy KD, de Vellis J. 1980. *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue*. J Cell Biol 85(3):890-902.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. 1988. *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains*. Neurology 38:1285-1291.
- McGeer PL, Klegeris A, Walker DG, Yasuhara O, McGeer EG. 1994. *Pathological proteins in senile plaques*. Tohoku J Exp Med 174(3):269-77.
- McGeer PL, McGeer EG. 2002. *The possible role of complement activation in Alzheimer disease*. Trends Mol Med 8:519–523.
- McGeer PL, McGeer EG. 2008. *Glial Reactions in Parkinson's Disease*. Movement Disorders 23(4):474-483.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. 2001. *Inflammation in Parkinson's disease*. Adv Neurol 86:83-89.
- McGeer PL. 1998. *Rate of cell death in Parkinsonism indicates active neuropathological process*. Ann Neurol 24 574–576.
- McMillian M.K, Thai L, Hong JS, O'Callaghan JP, Pennypacker KR. 1994. *Brain injury in a dish: A model for reactive gliosis*. Review Trends Neurosci 17:138–142.
- McWhinney CD, Dudley MW, Bowlin TL, Peet NP, Schook L, Bradshaw M, De M, Borchering, DR, Edwards CK III. 1996. *Activation of adenosine A3 receptors on macrophages inhibits tumor necrosis factor α* . Eur J Pharmacol 310:209.
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melnick J, Lane TE. 1993. *Microglial cell cytotoxic of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide*. J. Immunol 151:2132-2141.
- Milner R, Campbell IL. 2002. *Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the α 6 β 1 integrin*. J Neurosci 22(5):1562-1572.
- Min KJ, Jou I, Joe E. 2003. *Plasminogen-induced IL-1 β and TNF α production in microglia is regulated by reactive oxygen species*. Biochem Biophys Res Commun 312:969–974.
- Min KJ, Kim JH, Jou I, Joe EH. 2008. *Adenosine induces hemeoxygenase-1 expression in microglia through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor E2-related factor 2*. Glia 56(9):1028-37.
- Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. 2004. *Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase*. Glia 48:197–206.
- Min KJ, Yang MS, Kim SU, Jou I, Joe EH. 2006. *Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation*. The Journal of Neuroscience 26:1880 –1887.
- Minghetti L, Levi G .1998. *Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide*. Prog Neurobiol 54:99–125.
- Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Créminon C, Maclouf J, Levi G. 1997. *Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglia cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors*. Glia 19:152-160.
- Mizuno T, Sawada M, Marunouchi T, Suzumura A. 1994. *Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture*. Biochem Biophys Res Commun. 205:1907–1915.
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. 1996. *Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease*. Neurosci Lett 211:13–16.
- Möller T, Contos JJ, Musante DB, Chun J, Ransom BR. 2001. *Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells*. J Biol Chem 276:25946– 25952.
- Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A, Kettenmann H. 1997. *Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced [Ca²⁺]_i signaling in mouse microglia*. J Neurosci 17:615–624.

- Möller T. 2002. *Calcium signaling in microglial cells*. *Glia* 40:184–194.
- Montoliu C, Monfort P, Carrasco J, Palacios O, Capdevila M, Hidalgo J, Felipo V. 2000. *Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons*. *J Neurochem* 75:266–273.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. 1993. *Interleukin-10*. *Annu. Rev. Immunol.* 11:165–190.
- Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM, Finch CE. 1993. *TGF-beta 1mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration*. *Exp Neurol* 120:291–301.
- Mosley RL, Bennera EJ, Kadiua I, Thomas M, Boska MD, Hasand K, Laurie C, Gendelman HE. 2006. *Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease*. *Clin Neurosci Res* 6:261–281.
- Moss DW, Bates TE. 2001. *Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function*. *Eur. J. Neurosci.* 13:529–538.
- Murabe Y, Sano Y. 1983. Morphological studies on neuroglia. VII. *Distribution of "brain macrophages" in brains of neonatal and adult rats, as determined by means of immunohistochemistry*. *Cell Tissue Res* 229(1):85–95.
- Nauseef WM, Root RK, Newman SL, Malech HL. 1983. *Inhibition of zymosan activation of human neutrophil oxidative metabolism by a mouse monoclonal antibody*. *Blood* 62:635–644.
- Navikas V, Link H. 1996. *Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis*. *J Neurosci Res* 45:322–333.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. *New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain*. *Trends Neurosci* 26:523–530.
- Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. 1998. *Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5779–5784.
- Neumann H. 2001. *Control of glial immune function by neurons*. *Glia* 36:191–9.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science* 308:1314–1318.
- Norenberg MD. 1994. *Astrocyte responses to CNS injury*. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:213–220.
- Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. 1992. *Quantitative aspects of reactive gliosis: a review*. *Neurochem Res* 17:877–885.
- O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. 1999. *Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10*. *Eur J Immunol* 29:1275–85.
- Oh JW, Schwiebert LM, Benveniste EN. 1999. *Cytokine regulation of CC and CXC chemokine expression by human astrocytes*. *J Neurovirol* 5:82–94.
- Oh LY, Yong VW. 1996. *Astrocytes promote process outgrowth by adult human oligodendrocytes in vitro through interaction between bFGF and astrocyte extracellular matrix*. *Glia* 17:237–253.
- Olanow CW, Tatton WG. 1999. *Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. *Annu Rev Neurosci.* 22:123–44.
- Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. 2002. *An inflammatory review of Parkinson's disease*. *Prog Neurobiol* 68:325–340.
- Park KW, Lee DY, Joe EH, Kim SU, Jin BK. 2005. *Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4*. *J Neurosci Res* 81:397–402.
- Park YK, Chung YS, Kim YS, Kwon OY, Joh TH. 2007. *Inhibition of gene expression and production of iNOS and TNF-alpha in LPS-stimulated microglia by methanol extract of Phellodendri cortex*. *Int Immunopharmacol* 7(7):955–962.
- Pearson HE, Payne BR, Cunningham TJ. 1993. *Microglia invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina*. *Brain Res Dev Brain Res* 76:249–255.
- Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Moos T, Hidalgo J. 1999. *CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice*. *J Neurosci* 19(7):2535–2545.
- Penkowa M, Hidalgo J. 2003. *Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocytes precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurosci Res* 72:574–586.
- Penkowa M. 2006. *Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology*. *FEBS J* 273:1857–1870.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. *Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain*. *Neuroscience* 15:313–326.
- Peterson PK, Hu S, Anderson WR, Chao CC. 1994. *Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain*. *J. Infect. Dis.* 170:457–460.

- Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire AE, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, Durocher Y, Commissiong JW. 2003. *MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons*. J Mol Neurosci 20:173–188.
- Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ. 2000. *Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures*. Brain Res 853(1):74–80.
- Pillemer L, Ecker EE. 1941. *Anticomplementary factor in fresh yeast*. J Biol Chem 137:139–142.
- Pivneva TA. 2008. *Microglia in normal condition and pathology*. Fiziol Zh 54:81–9.
- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G. 1997. *2, 7- dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation*. FEBS Letters 416:175–178.
- Presta M, Urbinati C, Dell'era P, Lauro GM, Sogos V, Balaci L, Ennas MG, Gremo F. 1995. *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human fetal microglia cells*. Int J Dev Neurosci 13:29–39.
- Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. 1999. *Gangliosides activate cultured rat brain microglia*. J Biol Chem 274:34584–34589.
- Pyo H, Yang MS, Jou I, Joe EH. 2003. *Wortmannin enhances lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in microglia in the presence of astrocytes in rats*. Neurosci Lett 346:141–144.
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS. 2004. *NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia*. J Biol Chem 279:1415–1421.
- Rabchevsky AG, Streit WJ. 1997. *Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth*. J Neurosci Res 47:34–48.
- Raivich G, Botatchek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. *Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function*. Brain Res Rev 30:77–105.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Everall IP, Male DK. 2002. *Expression of beta-chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: potential role of chemokines in the developing CNS*. Glia 37:64–75.
- Riley CP, Timothy CC, Buck CR. 2004. *CNS neurotrophins are biologically active and expresses by multiple cell types*. Journal of Molecular Histology 35:771–783.
- Rivest S. 2003. *Molecular insights on the cerebral innate immune system*. Brain Behav Immun 17:13–19.
- Robinson JP. 1998. *Oxygen and nitrogen reactive metabolites and phagocytic cells*. in Phagocyte function: a guide for research and clinical evaluation. Robinson J.P. and Baboc G.F, (Eds). Wiley-Liss: New York, 217–252.
- Rock RB, Genya G, Shuxian H, Wen SS, Maxim C, Lokensgard JR, Peterson PK. 2004. *Role of Microglia in Central Nervous System Infections*. Clinical Microbiology reviews 17:942–964.
- Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. 2002. *Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide*. Glia 40:260–269.
- Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A. 1998. *Intrastratial glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease*. Neuroscience 82:129–137.
- Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J, Wilms H. 2001. *From Theory to Therapy: Implications From an In Vitro Model of Ramified Microglia*. Microscopy Research and Technique 54:18–25.
- Roubin R, Mencia Huerta JM, Landes A, Benveniste J. 1982. *Biosynthesis of plateletactivating factor (PAF-acether). IV. Impairment of acetyl-transferase activity in thioglycollate-elicited mouse macrophages*. J Immunol 129:809–813.
- Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. 2001. *Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production*. J Immunol 166:2173–2177.
- Ryu J, Min KJ, Rhim TY, Kim TH, Pyo H, Jin B, Kim SU, Jou I, Kim SS, Joe EH. 2002. *Prothrombin kringle-2 activates cultured rat brain microglia*. J Immunol 168:5805–5810.
- Ryu J, Pyo H, Jou I, Joe E. 2000. *Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B*. J Biol Chem 275:29955–29959.
- Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. 1996. *Inhibition of TNF- α expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors*. J Immunol 156:3435.
- Sanguedolce MV, Capo C, Bongrand P, Mege JL. 1992. *Zymosan-stimulated tumor necrosis factor- α production by human monocytes. Down-modulation by phorbol ester*. J Immunol 148:2229–2236.

- Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y, Kuroki Y. 2003. *Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A*. J Immunol 171:417–425.
- Saura J, Tusell JM, Serratos J. 2003. *High-Yield Isolation of Murine Microglia by Mild Trypsinization*. Glia 44:183–18.
- Sawada M, Suzumura A, Hosoya H, Marunouchi T, Nagatsu T. 1999. *Interleukin-10 Inhibits Both Production of Cytokines and Expression of Cytokine Receptors in Microglia*. J Neurochem 72:1466-1471.
- Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T. 1990. *Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement by protein kinase C*. Brain Res 509:119-124.
- Schaar DG, Sieber BA, Dreyfus CF, Black IB. 1993. *Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain*. Exp Neurol 124:368-371.
- Schaller B, Andres RH, Huber AW, Meyer M, Perez-Bouza A, Ducray AD, Seiler RW, Widmer HR. 2005. *Effect of GDNF on differentiation of cultured ventral mesencephalic dopaminergic and non-dopaminergic calretinin-expressing neurons*. Brain Res 1036:163–172.
- Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas S, Eder C. 2001. *Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways*. European Journal of Neuroscience 14:463-473.
- Schmidt-Kastner R, Tomac A, Hoffer B, Bektesh S, Rosenzweig B, Olson L. 1994. *Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA upregulation in striatum and cortical areas after pilocarpine-induced status epilepticus in rats*. Brain Res Mol Brain Res 26:325-330.
- Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Korner H. 2000. *Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement*. Immunol Today 21:110-3.
- Seth P, Koul N. 2008. *Astrocyte, the star avatar: redefined*. J Biosci 33:405–421.
- Shannon KM. 2004. *Movement Disorders. in Neurology in clinical practice*. Vol. II. Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic. J. (Eds). Boston: Butterworth Heinemann 2131-2139.
- Shin WH, Lee DY, Park KW, Kim SU, Yang MS, Joe EH, Jin BK. 2004. *Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo*. Glia 46:142–152.
- Siao CJ, Tsirka SE. 2002. *Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II*. J Neurosci 22:3352–3358.
- Sievers J, Parwaresch R, Wottge HU. 1994. *Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microgliallike cells on monolayers of Astrocytes: Morphology*. Glia 12:245–258.
- Slepko N, Levi G. 1996. *Progressive activation of adult microglial cells in vitro*. Glia 16(3):241-246.
- Smith JA, Weidmann MJ. 1993. *Further characterization of neutrophil oxidative burst by flow cytometry*. Journal of Immunological Methods 162:261-268.
- Sofroniew MV. 2005. *Reactive astrocytes in neural repair and protection*. Neuroscientist 11:400-7.
- Sogawa CA, Sogawa N, Yamamoto T, Oda N, Inoue T, Onodera K, Furuta H. 2001. *Localization of metallothionein (MT) and expression of MT isoforms induced by cadmium in rat dental pulp*. Jpn J Pharmacol 86(1):65-72.
- Soliven B. 2001. *Calcium signalling in cells of oligodendroglial lineage*. Microscop Res Technol 52: 672–679.
- Sriram K, Miller DB, O'Callaghan JP. 2006. *Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor- α* . J Neurochem 96:706–718.
- Staal RGW, Rayport S, Sulzer D. 2007. *Amperometric Detection of Dopamine Exocytosis from Synaptic Terminals, in Electrochemical Methods for Neuroscience*. Michael AC, Borland LM (Eds). Taylor & Francis Group, LLC.
- Stagaard M, Balslev Y, Lundberg JJ, Møllgaard K. 1987. *Microglia in the hypendyma of the rat subcommissural organ following brain lesion with serotonin neurotoxin*. J Neurocytol 16:131–142.
- Stangel M, Compston A. 2001. *Polyclonal immunoglobulins (IVIg) modulate nitric oxide production and microglial functions in vitro via Fc receptors*. J Neuroimmunol 112:63–71.
- Stolzing A, Grune T. 2004. *Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells*. FASEB J 18:743–745.
- Streit W, Walter SA, Pennell NA. 1999. *Reactive microgliosis*. Progress in Neurobiology 57:563-581.
- Streit WJ, Miller KR, Lopes KO, Njie E. 2008. *Microglial degeneration in the aging brain--bad news for neurons?* Front Biosci 13:3423-38.
- Streit WJ. 2002. *Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS*. Glia 40:133–139.

- Suh HS, Kim MO, Lee SC. 2005. *Inhibition of granulocytemacrophage colony-stimulating factor signaling and microglial proliferation by anti-CD45RO: role of Hck tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt*. J Immunol 174:2712–2719.
- Suzumura A, Marunouchi T, Yamamoto H. 1991. *Morphological transformation of microglia in vitro*. Brain Res 545:301–306.
- Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. 1990. *Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro*. Journal of Neuroimmunology 30:111–120.
- Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, DeLeo JA. 1999. *Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat*. Brain Res 829(1-2):209–21.
- Tadimalla A, Belmont PJ, Thuerlauf DJ, Glassy MS, Martindale JJ, Gude N, Sussman MA, Glembotski CC. 2008. *Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart*. Circ Res 103(11):1249–58.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol 21:335–376.
- Tanaka J, Maeda N. 1996. *Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes*. Exp Neurol 137:367–375.
- Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N. 1999a. *Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes*. Neuroscience Research 34:207–215.
- Tanaka J, Toku K, Zhang B, Ishihara K, Sakanaka M, Maeda N. 1999b. *Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species*. Glia 28:85–96.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. 1999. *Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke*. Stroke 30:321–327.
- Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF. 1996. *Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells*. Neuroscience 72:377–389.
- Tham CS, Lin FF, Rao TS, Yu N, Webb M. 2003. *Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression*. Int J Dev Neurosci 21:431–443.
- Théry C, Stanley ER, Mallat M. 1992. *Interleukin 1 and tumor necrosis factor- α stimulate the production of colony-stimulating factor 1 by murine astrocytes*. J Neurochem 59:1183–1186.
- Thoenen H, Barde YA, Davies AM, Johnson JE. 1987. *Neurotrophic factors and neuronal death*. Ciba Found Symp 126:82–95.
- Thoenen H. 1995. *Neurotrophins and neuronal plasticity*. Science 270:593–598.
- Tipton KF, Singer TP. 1993. *Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds*. J Neurochem.61:1191–1206.
- Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, Dirnagl U. 2002. *Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia*. J Neurosci 22:5879–5888.
- Tseng CY, Ling EA, Wong WC. 1983. *Scanning electron microscopy of amoeboid microglial cells in the transient cavum septum pellucidum in pre- and postnatal rats*. J Anat 136(Pt 2):251–63.
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA. 2001. *Neurotrophins are required for nerve growth during development*. Nat Neurosci 4:29–37.
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. 1991. *The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothioneinlike protein*. Neuron 7:337–347.
- Underhill DM. 2003. *Macrophage recognition of zymosan particles*. J Endotoxin Res 9:176–180.
- Uryu S, Tokuhira S, Murasugi T, Oda T. 2002. *A novel compound, RS-1178, specifically inhibits neuronal cell death mediated by beta-amyloid-induced macrophage activation in vitro*. Brain Res 946(2):298–306.
- van Lookeren Campagne M, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG. 1999. *Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia*. Proc. Natl Acad Sci USA 96:12870–12875.
- van Rossum D, Hanisch UK. 2004. *Microglia*. Review Metab Brain Dis 19:393–411.
- Vawter MP, Dillon-Carter O, Tourtellotte WW, Carvey P, Freed WJ. 1996. *TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid*. Exp Neurol 142: 313–322.
- Vincent VA, Tilders FJ, Van Dam AM. 1997. *Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta*. Glia 19:190–198.
- Vincent VA, Van Dam AM, Persoons JH, Schotanus K, Steinbusch HW, Schoffelmeer AN, Berkenbosch F. 1996. *Gradual inhibition of inducible nitric oxide synthase but not of interleukin-1 beta production in rat microglial cells of endotoxin-treated mixed glial cell cultures*. Glia 17:94–102.

- Volman TJ, Hendriks T, Goris RJ. 2005. *Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome*. SHOCK, Vol. 23, No. 4, pp. 291–297.
- Volterra A, Meldolesi J. 2005. *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues*. Nat Rev Neurosci 6:626–640.
- Voyvodic JT. 1996. *Cell death in cortical development: how much? Why? So what?* Neuron 16:81–90.
- Wang XJ, Yan ZQ, Lu GQ, Stuart S, Chen SD. 2007. *Parkinson disease IgG and C5a-induced synergistic dopaminergic neurotoxicity: Role of microglia*. Neurochem Int 50(1):39-50.
- Wei R, Jonakait GM. 1999. *Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia*. J Neuroimmunol 95:8-18.
- Weinstein JR, Hong S, Kulman JD, Bishop C, Kuniyoshi J, Andersen H, Ransom BR, Hanisch UK, Moller T . 2005. *Unraveling thrombin's true microglia-activating potential: markedly disparate profiles of pharmaceutical-grade and commercial- grade thrombin preparations*. J Neurochem 95:1177–1187.
- West A K, Chuah M I, Vickers J, Chung RS. 2004. *Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain*. Rev Neurosci 15:157–166.
- Witting A, Muller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C. 2000. *Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition*. J Neurochem 75:1060–1070.
- Wojtera M, Sikorska B, Sobov T, Liberski PP. 2005. *Microglial cells in neurodegenerative disorders*. Folia Neuropathol 43:311–321.
- Wood PL. 1998. *Roles of CNS Macrophages in Neurodegeneration, in Neuroinflammation, Mechanisms and Management*. Wood Paul L. (Ed) Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. 2003. *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 USA 100:6145–6150.
- Xu J, Chalimoniuk M, Shu Y, Simonyi A, Sun AY, Gonzalez FA, Weisman GA, Wood WG, Sun GY. 2003. *Prostaglandin E₂ production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 69:437–448.
- Yang MS, Min KJ, Joe E. 2007. *Multiple Mechanisms That Prevent Excessive Brain Inflammation*. Journal of Neuroscience Research 85:2298–2305.
- Youdim MB, Riederer P, 1993. *The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl 40:57–67.
- Young SH, Ye J, Frazer DG, Shi X, Castranova V. 2001. *Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in I-->3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages*. J Biol Chem 276(23):20781-20787.
- Zhao X, Wang X, Zheng SY, Xu JG. 2004. *Gonadectomy affects brain derived neurotrophic factor in rats after chronic constriction nerve injury*. Acta Pharmacol 25(3):286-92.
- Zietlow R, Dunnett SB, Fawcett JW. 1999. *The effect of microglia on embryonic dopaminergic neuronal survival in vitro: diffusible signals from neurons and glia change microglia from neurotoxic to neuroprotective*. Eur J Neurosci 11(5):1657-1667.