



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

GDNF e GPER: novas ferramentas no controlo da neuroinflamação?

Julieta Conceição Mendes Borges Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Graça Baltazar
Co-orientador: Prof. Doutora Carla Fonseca

Covilhã, outubro de 2013

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais e à minha irmã pelo apoio que sempre me dão, pelo amor, carinho e por serem sempre o meu porto seguro. Sem eles não teria chegado até aqui.

À Professora Doutora Graça Baltazar pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelo apoio e dedicação e por todos os conhecimentos transmitidos, que me ajudaram a crescer, não apenas como cientista, mas também como pessoa.

À Professora Doutora Carla Fonseca por todos os ensinamentos e por se mostrar sempre disponível ajudar.

Ao Tiago Roxo e à Agustina, com quem partilhei este percurso desde o início. Sei que aprendemos muitas coisas durante este ano, não apenas com as professoras, mas também uns com os outros. Partilhamos bons momentos juntos, de trabalho e de diversão também.

À Rita por estar sempre pronta ajudar e pela simpatia com que o faz sempre e a todos os outros que sempre me ajudaram, aqueles que estão por cá e aqueles que já não estão.

A todos os meus amigos, os que me acompanharam até aqui, aqueles que estão perto e também aos que estão longe. Quero agradecer os bons momentos e o apoio.

Por fim, quero agradecer ao Tiago Patita por todo o amor e carinho, pela compreensão, pela paciência e pelo apoio constante nos momentos difíceis. Obrigado por estares sempre presente.

Resumo

As células microgliais, os macrófagos residentes no sistema nervoso central, são responsáveis pela resposta imune inata. Quando são moderadamente ativadas, realizam funções vitais, fagocitando células mortas e removendo detritos celulares e toxinas. No entanto, uma ativação persistente destas células pode resultar numa desregulação da sua atividade. Elas podem tornar-se reativas e contribuir para a morte neuronal. Evidências crescentes sugerem que a inflamação e o stress oxidativo mediado pela microglia reativa desempenham um papel fundamental na progressão de várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Tanto o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) como os estrogénios são relatados por atuar na microglia, controlando a sua ativação excessiva.

Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que o GDNF presente em meio condicionado de astrócitos consegue inibir a reatividade microglial induzida pelo Zymozan A numa cultura primária de microglia do mesencéfalo ventral. O primeiro objetivo do presente trabalho foi o de verificar se a presença de neurónios, lesados ou não, poderia influenciar este efeito anti-inflamatório exercido pelo GDNF. Utilizando o mesmo tipo de cultura verificámos que o condicionamento na presença de neurónios reverteu a inibição da produção de NO exercida pelos meios condicionados apenas por astrócitos na microglia estimulada com LPS. Este diferente efeito dos dois meios poderá estar relacionado com o facto de os meios condicionados por culturas mistas de neurónios e astrócitos apresentarem níveis mais baixos de GDNF que os meios condicionados apenas por astrócitos.

Por outro lado, estudos utilizando culturas primárias de microglia, bem como linhas celulares, demonstraram a capacidade do estrogénio para atenuar a ativação da microglia, em termos de atividade fagocítica, produção de espécies reativas de oxigénio e de azoto, bem como de outros fatores da cascata inflamatória. Está já descrita a capacidade dos estrogénios ativarem os recetores de estrogénio α e β presentes na microglia. No entanto, mais recentemente identificou-se um recetor de estrogénios transmembranar, o recetor de estrogénio acoplado à proteína G (GPER). O segundo objetivo do trabalho foi esclarecer a participação do GPER no controle da reatividade microglial mediada pelo estradiol. Utilizando uma linha celular de microglia N9, um agonista e um antagonista seletivos do recetor, verificamos que a ativação do GPER promoveu a migração das células microgliais e reduziu significativamente os parâmetros de reatividade microglial estudados. Estes resultados sugerem que o GPER pode ser um importante alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias, especialmente nos homens, nos quais a terapia com estrogénio não é viável.

Palavras-chave

Neuroinflamação, microglia, GDNF, astrócitos, GPER, estrogénios

Abstract

Microglial cells, the macrophages resident in the central nervous system, are responsible for the innate immune response. When moderately activated, these cells perform vital functions such as phagocytosing dead cells and removing cell debris and toxins. However, a persistent activation of these cells may result in deregulation of its activity. They can become reactive and contribute to neuronal death. Increasing evidences suggests that inflammation and oxidative stress mediated by reactive microglia play a key role in the progression of various neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Both the glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) and estrogens are reported to play a role in this process and to control excessive activation of microglia.

A previous study from our group that used a primary culture of ventral midbrain microglia showed that GDNF present in medium conditioned by astrocytes can inhibit microglial reactivity induced by Zymozan A. The first objective of the present study was to verify if the presence of neurons, injured or not, could influence this anti-inflammatory effect exerted by GDNF. Using the same culture we found that media conditioned by both astrocytes and neurons was no longer capable of inhibiting NO production on LPS-stimulated microglia. The different effects of the two media may be related to the fact that the media conditioned by cultures of neurons and astrocytes presented lower levels of GDNF as compared with media conditioned only by astrocytes.

On the other hand, studies using primary cultures and microglia cell lines demonstrated the ability of estrogen to attenuate parameters of microglial activation such as phagocytic activity, production of reactive oxygen and nitrogen, as well as other factors inflammatory cascade. The ability of estrogens to regulate estrogen receptors α and β present in microglia was previously described. However, more recently a transmembrane estrogen receptor, the G-protein coupled estrogen receptor (GPER) was identified. The objective of the second part of the present work was to clarify the involvement of GPER in the control microglial reactivity mediated by estradiol. Using the N9 microglial cell line, an agonist and an antagonist of GPER receptor, we found that GPER activation promoted the migration of microglial cells and significantly reduced the various parameters of microglial reactivity evaluated. Taken together these results suggest that GPER can be an important therapeutic target for neurodegenerative and neuroinflammatory diseases, especially in males, for whom estrogen therapy is not feasible.

Keywords

Neuroinflammation, microglia, GDNF, astrocytes, GPER, estradiol

Índice

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas	xxi
Capítulo 1: Introdução	3
1.1. Etiologia e Patologia da Doença de Parkinson	3
1.1.1. MPP+ como modelo experimental da Doença de Parkinson	4
1.2. Neuroinflamação.....	6
1.2.1. Papel dos astrócitos e da microglia na neuroinflamação	6
1.2.1.1. Astrócitos	6
1.2.1.2. Microglia	7
1.2.2. Evidências de neuroinflamação na Doença de Parkinson	8
1.2.2.1. Microglia e degeneração dopaminérgica	9
1.2.3. LPS como agente indutor de reatividade microglial e neurodegeneração dopaminérgica	10
1.3. Controlo da reatividade microglial	11
1.3.1. Fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia	11
1.3.2. Estrogénios	12
1.3.2.1. GPER.....	13
Capítulo 2: Objetivos	17
Capítulo 3: Materiais e Métodos	21
3.1. Culturas celulares	21
3.1.1. Cultura primária mista de neurónios e astrócitos do mesencéfalo ventral	21
3.1.1.1. Preparação dos meios condicionados de culturas mistas de neurónios e astrócitos	22
3.1.2. Cultura primária de microglia do mesencéfalo ventral	22
3.1.2.1. Preparação do meio condicionado de astrócitos	23
3.1.3. Cultura primária de microglia do Córtex	23

3.1.4. Cultura de linha celular de microglia N9	23
3.2. Estimulação celular	24
3.2.1. Influência dos neurónios no controlo da reatividade microglial exercido pelo GDNF libertado por astrócitos	24
3.2.2. Papel do GPER no controlo da reatividade microglial	25
3.3. Medição do Óxido Nítrico	25
3.4. Avaliação da atividade fagocítica	25
3.5. Imunocitoquímica	26
3.6. Western Blot.....	27
3.7. Técnica de ELISA	28
3.7.1. Medição dos níveis de GDNF	28
3.7.2. Medição dos níveis de IL-1B.....	29
3.8. Ensaio de migração	29
3.9. Análise Estatística	29
<u>Capítulos 4 e 5: Resultados</u>	<u>33</u>
4. Influência da presença de neurónios no controlo da reatividade microglial exercido pelo GDNF libertado por astrócitos.....	33
4.1. Caracterização da cultura primária de microglia do MV	33
4.2. Meios condicionados na presença de neurónios foram incapazes de inibir a produção de NO induzida pelo LPS na microglia	35
4.3. Meios condicionados pelas células do mesencéfalo diminuíram a expressão da iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.....	37
4.4. Meios condicionados na presença de neurónios e astrócitos inibiram a atividade fagocítica de microglia estimulada com LPS.	38
4.5. MC-A promove um aumento da produção de IL-1B pela microglia estimulada com LPS.....	39
4.6. Meios condicionados na presença de neurónios e astrócitos apresentaram níveis de GDNF mais baixos que os meios condicionados apenas por astrócitos.	40
5. Papel do GPER no controlo da reatividade microglial	42
5.1. GPER é expresso pela linha celular de microglia N9	42
5.2. A ativação do seletivo do GPER impede a produção de NO pela microglia estimulada com LPS	43

5.3. A ativação do GPER diminui a expressão da iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.	44
5.4. A atividade fagocítica na microglia estimulada com LPS é inibida pela ativação do GPER.	46
5.5. Efeito da ativação do GPER na libertação da IL-1 β pela microglia estimulada com LPS.	47
5.6. Os agonistas dos recetores GPER regulam a migração das células microgliais.	48
<u>Capítulo 6: Discussão.....</u>	<u>53</u>
6.1. Influência da presença de neurónios no controlo da reatividade microglial exercido por astrócitos.	53
6.2. Papel do GPER no controlo da reatividade microglial exercido pelo estradiol.	55
<u>Capítulo 7: Conclusões e Perspetivas Futuras</u>	<u>59</u>
<u>Capítulo 8: Referências Bibliográficas</u>	<u>63</u>

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismo de ação do MPTP nos neurónios dopaminérgicos.....	5
Figura 2 - A reatividade microglial pode iniciar ou amplificar o dano neuronal, ou ser uma consequência dele.....	10
Figura 3 - Representação esquemática do procedimento de estimulação celular usado para o estudo da influência dos neurónios no controlo da reatividade microglial exercido pelo GDNF libertado por astrócitos.....	24
Figura 4 - Representação esquemática do procedimento de estimulação celular usado para o estudo do papel do GPER no controlo da reatividade microglial.....	25
Figura 5 - Avaliação de pureza da cultura primária de microglia do MV.....	34
Figura 6 - Efeito dos meios condicionados na libertação de NO pela microglia estimulada com LPS.....	36
Figura 7 - Efeito dos meios condicionados na regulação da expressão de iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.....	37
Figura 8 - Efeito dos meios condicionados na atividade fagocítica microglial induzida pelo LPS	39
Figura 9 - Efeito dos meios condicionados na produção de IL-1 β pela microglia estimulada com LPS	40
Figura 10 - Níveis de GDNF presentes nos meios condicionados.....	41
Figura 11 - Expressão do GPER pela linha celular de microglia N9.....	43
Figura 12 - Envolvimento do GPER na libertação NO pela microglia N9, após estimulação com LPS.....	44
Figura 13 - Efeito do GPER na regulação da expressão de iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.....	45
Figura 14 - Influência do GPER na atividade fagocítica da microglia N9, após estimulação com LPS	46
Figura 15 - Contribuição do GPER para a produção de IL-1 β pela microglia estimulada com LPS	47
Figura 16 - Efeito do agonista GPER na migração das células microgliais.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de imunocitoquímica....27

Lista de Abreviaturas

DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
E ₂	Estradiol
ER α	Recetor de estrogénio α
ER β	Recetor de estrogénio β
FBS	Soro Fetal de Bovino
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFAP	Proteína fibrilar ácida da glia
GFLs	Ligandos da família GDNF
GFR α	Recetores α da família GDNF
GP α	Recetor de estrogénio acoplado à proteína G
HRP	Peroxidase de Rábano
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO-B	Monoamina-oxidase B
MC-A	Meio condicionado de culturas primárias de astrócitos
MC-CTR	Meio condicionado controlo de culturas primárias mistas de neurónios e astrócitos
MC-MPP ⁺	Meio condicionado de culturas primárias mistas de neurónios expostas ao MPP ⁺
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MNEAA	Meio de aminoácidos não essenciais
MPP-3	Metaloproteinase de matriz 3
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropirina
MV	Mesencéfalo Ventral
ND	Neurónios dopaminérgicos
NED	N-1-naftiletilenodiamina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino com 0,1% de Tween
PVDF	Diflureto de polivinilideno
PFA 4%	Paraformaldeído 4%
Ret	Recetor tirosina-cinase
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SN	Substantia Nigra
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

Capítulo 1

Introdução

1.Introdução

1.1.Etiologia e Patologia da Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, descrita pela primeira vez em 1817, por James Parkinson, em '*An Essay on the Shaking Palsy*'. Caracteriza-se pela perda progressiva dos neurónios dopaminérgicos (ND) da substantia nigra pars compacta, que resulta numa diminuição da dopamina (DA) no corpo estriado. Esta diminuição traduz-se principalmente em sintomas motores, como tremor, bradicinesia (movimentação corporal lenta), rigidez muscular e instabilidade postural. No entanto, outros sintomas não motores, como disfunção autonómica, deficiências cognitivas e sensoriais, alterações psiquiátricas e distúrbios de sono são característicos desta doença (Doorn et al., 2012). Alguns destes sintomas não motores podem antecipar os défices a nível motor (Dexter and Jenner, 2013; Doorn et al., 2012).

A DP apresenta maior prevalência em homens do que em mulheres em proporções que variam entre 1.1:1 e 3:1, possivelmente devido ao conhecido efeito neuroprotetor que os estrogénios exercem. A diminuição da produção de estrogénios que ocorre com a idade, a menopausa precoce, histerectomia ou remoção dos ovários aumenta o risco de desenvolvimento da DP em mulheres (Dexter and Jenner, 2013).

A idade representa o maior fator de predisposição para a DP possivelmente devido a falhas nos processos celulares fisiológicos e bioquímicos normais, que ocorrem com o envelhecimento e tornam os ND mais vulneráveis a agressões tóxicas (Schapira and Jenner, 2011). Aproximadamente 1-2% da população com uma idade superior a 60 anos é afetada por esta patologia (Doorn et al., 2012). Além da idade, também fatores genéticos e ambientais desempenham um papel importante no início da doença (Samii et al., 2004; Schapira and Jenner, 2011). No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes à perda neuronal, ainda não se encontram esclarecidos. A acumulação anormal da proteína α -sinucleína, em inclusões designadas Corpos de Lewy, é uma das principais características patológicas da DP, juntamente com microglíose reativa, que contribui para a progressão da doença. (Schapira and Jenner, 2011). Disfunções mitocondriais, falhas ao nível do sistema ubiquitina-proteassoma, stress oxidativo, excitotoxicidade e apoptose, são outros mecanismos associados à neurodegeneração na DP (Dexter and Jenner, 2013; Samii et al., 2004).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente, com uma prevalência de 52 a 230 casos por cada cem mil habitantes (Muangpaisan et al., 2011). No entanto, ainda não possui cura. O tratamento existente é principalmente sintomático. Nas fases iniciais da

doença, a terapia de substituição de dopamina por levodopa (L-DOPA) juntamente com os agonistas da dopamina pode melhorar significativamente os sintomas motores. Mas, a administração a longo prazo deixa de ser eficaz e leva ao desenvolvimento de problemas psiquiátricos, flutuações motoras e discinésias (Salat and Tolosa, 2013). Isto acontece porque a doença evolui e a perda neuronal continua. Quando a doença se encontra numa fase avançada, pode recorrer-se à estimulação profunda do cérebro (Yu and Neimat, 2008). A investigação mais recente tem-se centrado no desenvolvimento de terapias direcionadas para a paragem da progressão da doença, recorrendo ao uso de células estaminais, terapia génica, fatores neuroprotetores e anti-inflamatórios.

1.1.1. MPP⁺ como modelo experimental da Doença de Parkinson

No início da década de 1980, sete indivíduos desenvolveram uma síndrome acinéctica rígida, que respondia à L-DOPA e se assemelhava às características clínicas da DP. Mais tarde descobriu-se que esta síndrome foi induzida após injeção intravenosa com 1-metil-4-fenil-4-propionoxypiperidine (MPPP), um análogo da heroína sintética, cuja síntese foi fortemente contaminada por um subproduto, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropirina (MPTP) (Bove et al., 2005; Yokoyama et al., 2011). Deste então, o MPTP, tem sido utilizado em vários modelos animais, para o estudo da patogénese da DP. Deste modo, verificou-se que o MPTP leva à degeneração seletiva dos neurónios dopaminérgicos, principalmente os nigrostriatais e a uma perda da dopamina no estriado, em vários modelos animais (Bove et al., 2005; Yokoyama et al., 2011). Os Corpos de Lewy não foram observados neste modelo, com exceção em macacos idosos, onde se verificaram inclusões intraneurais após injeção com MPTP (Bove et al., 2005).

O MPTP é lipossolúvel e por isso possui a capacidade de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, sendo convertido em 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) pela monoamina-oxidase B (MAO-B) presente nas células gliais. Como o MPP⁺ tem elevada afinidade para os transportadores de dopamina, consegue entrar nos neurónios dopaminérgicos acumula-se principalmente na mitocôndria, devido ao gradiente elétrico de membrana deste organelo, e inibe o complexo mitocondrial I (figura 1). Deste modo há depleção de energia e um aumento na produção de espécies reativas de oxigénio, com conseqüente morte neuronal (Smeyne and Jackson-Lewis, 2005; Storch et al., 2004; Yokoyama et al., 2011). Algum MPP⁺ citoplasmático também pode ser armazenado em vesículas sinápticas por ação do transportador vesicular de monoamina, ficando deste modo impedido de entrar na mitocôndria e inibir o complexo I (Smeyne and Jackson-Lewis, 2005).

Quando o MPTP é convertido em MPP⁺ pelos astrócitos, há um aumento na produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), que por sua vez podem estimular a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A iNOS é uma

isoforma do óxido nítrico sintase (NOS) que em condições fisiológicas normais é pouco expressa, no entanto após tratamento com MPP⁺, a sua expressão pela microglia da substância nigra (SN) é aumentada, tal como acontece na DP. (Smeyne and Jackson-Lewis, 2005). A iNOS é expressa em microglia e outras células do sistema imunitário, produzindo grandes quantidades de óxido nítrico (NO), o qual pode ser citotóxico. Vários estudos sugerem assim um papel importante da ativação microglial na neurotoxicidade mediada pelo MPTP. Embora a MPP⁺ atue ao nível dos neurónios dopaminérgicos, a reatividade microglial é observada em humanos e modelos animais (Bove et al., 2005; Liberatore et al., 1999; McGeer et al., 2003) e parece resultar principalmente do dano neuronal (Gao et al., 2003). Foi ainda demonstrado que esta reatividade é acompanhada por aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS) derivadas da NADPH oxidase microglial, o que potencia a neurotoxicidade induzida pelo MPP⁺ (Gao et al., 2003). Além disso, estudos postmortem em humanos e macacos efetuados vários anos após a exposição ao MPTP mostraram evidências de microglia ativa na SN, característica neuropatológica consistente com o processo degenerativo (Bove et al., 2005; McGeer et al., 2003).

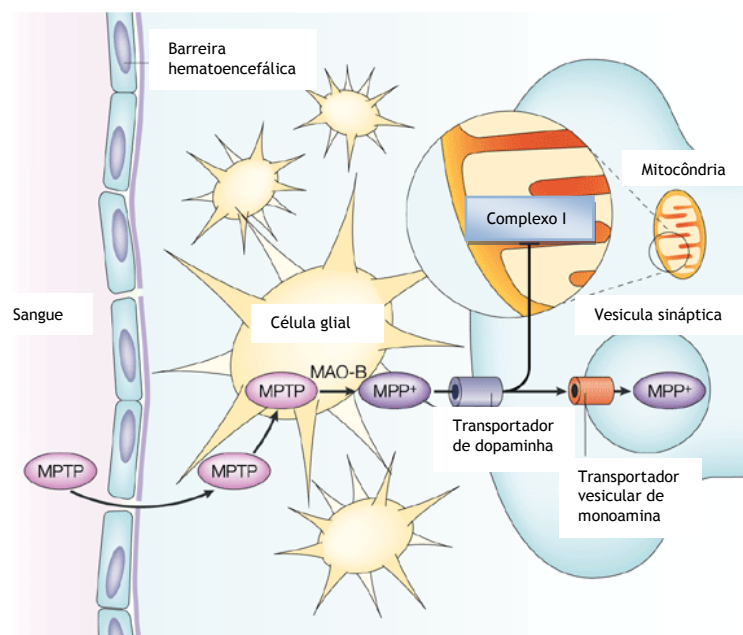


Figura 1 - Mecanismo de ação do MPTP nos neurónios dopaminérgicos. O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e é convertido em MPP⁺ pela MAO-B em células gliais. É transportado para o interior dos neurónios através do transportador de dopamina e acumula-se principalmente na mitocôndria, onde inibe o complexo mitocondrial I. Alguns MPP⁺ citoplasmáticos também podem ser armazenados em vesículas sinápticas.

1.2. Neuroinflamação

Durante muito tempo o cérebro foi considerado um local “imuno-privilegiado”. No entanto, atualmente sabe-se que as respostas imunes ocorrem regularmente no sistema nervoso central (SNC), sendo cruciais na defesa contra agentes infecciosos, remoção de detritos e reparação tecidual. As células da glia, presentes no SNC e os leucócitos infiltrados, são os principais mediadores destas respostas. Quando ocorre uma infeção, trauma ou lesão a nível cerebral é ativada uma resposta inflamatória, que pode ser aguda ou então transformar-se numa inflamação crónica. Uma ativação crónica, particularmente das células gliais, pode levar à libertação exagerada de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas, que levam à lesão neuronal. Assim, a neuroinflamação pode contribuir significativamente para a progressão de doenças neurodegenerativas, como a DP, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica (Amor et al., 2010; Doorn et al., 2012; Hurley and Tizabi, 2013).

1.2.1. Papel dos astrócitos e da microglia na neuroinflamação

1.2.1.1. Astrócitos

Os astrócitos desempenham um papel essencial no SNC. Eles proporcionam o contacto entre os neurónios e as células gliais e desempenham importantes funções regulatórias ao nível da transmissão sináptica (Hansson and Ronnback, 1995; Perea et al., 2009) e da ativação, diferenciação e morfologia microglial (Streit et al., 1999). Além disso, secretam fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF), que são essenciais à sustentação, nutrição e proteção neuronal e que parecem estar envolvidos no controlo da ativação microglial (Lin et al., 1993; Rocha et al., 2012).

Quando ocorre um estímulo imunológico, os astrócitos tornam-se ativados, desenvolvem uma morfologia hipertrófica devido ao aumento na expressão de filamentos intermédios compostos por nestina, vimentina e proteína fibrilar da glia (GFAP), proliferam e migram para o local de lesão. Respondem a citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , TNF- α e IL-6 e por isso pensa-se que estas citocinas participam na sua ativação (Buffo et al., 2010; Yokoyama et al., 2011). Em condições patológicas os astrócitos libertam várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que ativam e atraem a microglia para locais inflamatórios (Halliday and Stevens, 2011). Além disso, possuem a capacidade de gerar moléculas com potencial neurotóxico como NO e ROS e formam cicatrizes gliais, que impedem a regeneração axonal após lesão (Sofroniew, 2005). Deste modo, podem contribuir para a degeneração e potenciar a

neuroinflamação. Por outro lado, desempenham um papel importante na defesa antioxidante, pois possuem a capacidade de reduzir o stress oxidativo através da síntese de glutatona, redução da produção de espécies reativas na microglia, indução da enzima antioxidante hemeoxigenase 1 microglial (Min et al., 2006) e metabolizando as aminas biogénicas, pois expressam MAO-B e catecol-O-metil-transferase (Yokoyama et al., 2011). Além disso, em condições patológicas também expressam níveis elevados de fatores neurotróficos (Appel et al., 1997) e libertam citocinas anti-inflamatórias (Sofroniew, 2005).

1.2.1.2. Microglia

As células microgliais, os macrófagos residentes no SNC, são responsáveis pela resposta imune inata (Nimmerjahn et al., 2005; Rock et al., 2004). Possuem uma morfologia particular, diferente das outras células gliais e dos neurónios. Num estado de repouso apresentam uma morfologia ramificada, sendo responsáveis pela vigilância imunitária. No entanto, após um estímulo imunológico são rapidamente ativadas (Nimmerjahn et al., 2005), adquirindo uma morfologia amebóide (Rock et al., 2004). Além disso, a expressão de moléculas superficiais, tais como o complexo de histocompatibilidade (MHC), CD14, CD11b e recetores de quimiocinas é aumentada (Lynch, 2009; Rock et al., 2004; Streit et al., 1999).

Quando ficam ativadas, as células microgliais realizam várias funções benéficas, libertam fatores neurotróficos e anti-inflamatórios, que promovem a sobrevivência e proliferação neuronal (Batchelor et al., 1999; Kim YS, 2005b; Morgan et al., 2004), removem o excesso de toxinas e fagocitam células mortas e restos celulares (Streit et al., 1999). Promovem ainda a migração de células estaminais para locais inflamatórios e possuem funções importantes na regulação do desenvolvimento cerebral, induzindo a eliminação programada de células neuronais (Block et al., 2007). No entanto, uma ativação persistente das células microgliais pode resultar numa desregulação da sua atividade. Estas podem tornar-se reativas, libertando vários fatores como ROS, NO e mediadores pró-inflamatórios como o TNF α e IL-1 β , que em excesso podem induzir neurotoxicidade (Colton and Gilbert, 1987; Gao et al., 2002; Gibbons and Dragunow, 2006; Streit et al., 1999).

Esta reatividade parece desempenhar um papel crucial no desenvolvimento e progressão de muitas doenças neurodegenerativas. Estudos utilizando o lipopolissacarídeo (LPS) como agente pró-inflamatório demonstraram que este é capaz de induzir a ativação microglial *in vitro* e *in vivo*, o que resulta numa perda progressiva dos ND (Gao et al., 2002; Gibbons and Dragunow, 2006). Além disso, este efeito tóxico do LPS sobre os neurónios não se verifica na ausência de microglia (Gibbons and Dragunow, 2006), o que demonstra que a ativação microglial pode iniciar a lesão neuronal. Por outro lado a neurotoxina MPP⁺, que danifica diretamente os ND, não tem uma ação direta na microglia, no entanto a reatividade microglial é observada (McGeer et al., 2003). Ou seja, a microglia é ativada através do dano neuronal causado pelo MPP⁺. Além disso, a adição de microglia a uma cultura de ND,

aumentou a toxicidade induzida pelo MPP⁺ (Gao et al., 2003). Deste modo, parece que a reatividade microglial pode iniciar ou amplificar o dano neuronal, ou ser uma consequência dele. Existe assim um ciclo de perpetuação da morte neuronal (fig.2), em que há uma constante ativação neurotóxica da microglia, em resposta a lesão neuronal (Block et al., 2007). A inflamação crónica existente em humanos e macacos anos após a exposição breve ao MPTP apoia esta hipótese (Bove et al., 2005; McGeer et al., 2003).

Posto isto, torna-se essencial atuar ao nível do controlo da reatividade microglial, de modo a parar o ciclo de auto amplificação da morte neuronal.

1.2.2. Evidências de neuroinflamação na Doença de Parkinson

A primeira evidência de processos neuroinflamatórios na DP surgiu em 1988, quando McMeer e a sua equipa detetaram em estudos postmortem a presença de um grande número de microglia reativa na SN de pacientes com DP. Estas células foram identificadas através da sua imunorreatividade utilizando o antígeno leucocitário humano DR, um recetor de superfície celular pertencente ao MHC classe II (Block and Hong, 2005; Doorn et al., 2012; Hirsch and Hunot, 2009). Mais tarde, foi possível verificar *in vivo* a presença de microglia noutras zonas do cérebro de doentes com Parkinson, através de tomografia por emissão de positrões. Utilizando o marcador da neuroinflamação [11C](R)-PK11195, observou-se um aumento da microglia ativada na ponte, gânglios da base e regiões corticais frontal e temporal (Gerhard et al., 2006). Através da mesma abordagem, Ouchi e a sua equipa (Ouchi et al., 2005), demonstraram alterações na ativação microglial correspondentes à perda de terminais dopaminérgicos, na via nigroestriatal, no início da DP. Tal descoberta, suporta a ideia de que as respostas inflamatórias mediadas pela microglia contribuem significativamente para o processo de degeneração progressiva da DP. Concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias foram detetadas na via nigroestriatal, líquido cefalorraquidiano e soro de doentes com Parkinson (Doorn et al., 2012; Hirsch and Hunot, 2009; Nagatsu and Sawada, 2007). Enzimas mediadoras de stress oxidativo como a NADPH-oxidase, a ciclo-oxigenase 2 e a iNOS, também foram detetadas em concentrações aumentadas em amostras postmortem de doentes de Parkinson (Hirsch and Hunot, 2009; Knott et al., 2000). Além disso, estudos em primatas humanos e não humanos mostram que vários anos após uma exposição breve ao MPTP se observa ainda microglia ativa na SN (Bove et al., 2005; McGeer et al., 2003).

Uma maior densidade de células CD8⁺ e células T CD4⁺ localizadas junto a vasos sanguíneos e perto de neurónios dopaminérgicos foi também detetada no cérebro de pacientes com DP, comparativamente a indivíduos saudáveis. As células CD8⁺ e células T CD4⁺ não foram detetadas no núcleo rubro (uma área do mesencéfalo não afetada pela lesão), sugerindo que a infiltração é seletiva para áreas lesadas (Hirsch and Hunot, 2009).

Vários estudos em modelos animais ajudaram a esclarecer e a comprovar que a neuronflamação tem um papel crucial na DP. Alterações nos níveis de citocinas foram também registradas nos modelos do MPTP ou da 6-hidroxidopamina (Nagatsu and Sawada, 2007). A administração de LPS, um agente pró-inflamatório, por via intraperitoneal ou intraparenquimal, resultou na perda de ND na SN, em modelos animais (Qin et al., 2007). Outros resultados, em culturas primárias do mesencéfalo de ratos, demonstraram que os agregados de α -sinucleína levam à ativação microglial, indicando que a neurotoxicidade dos agregados de sinucleína na DP pode ser mediada pela ativação da microglia (Zhang et al., 2005)

1.2.2.1. Microglia e degeneração dopaminérgica

Evidências crescentes têm sugerido que a inflamação e o stress oxidativo mediados pela reatividade microglial desempenham um papel crucial na morte dos ND (Gao et al., 2002).

Como referido anteriormente, a microglia ativada pode libertar vários fatores em excesso, nomeadamente ROS e NO, que são os principais mediadores de stress oxidativo. Os ND, em particular, possuem uma capacidade antioxidante reduzida, devido aos níveis reduzidos de glutathione intracelular, alto teor de DA e elevada concentração de ferro (elementos redox ativos) o que os torna mais sensíveis ao stress oxidativo e conseqüentemente à ativação microglial (Block and Hong, 2005; Block et al., 2007; Gao et al., 2002; Hwang, 2013). Além disso, na DP observa-se uma redução de 40-50% nos níveis de glutathione na SN (Zeevalk et al., 2008). A microglia ativada também produz várias citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e a IL-1 β que promovem a degeneração neuronal. Verificou-se que os ND expressam recetores de citocinas pró-inflamatórias, o que sugere uma sensibilidade por parte destes neurónios às mesmas (Hirsch and Hunot, 2009). Além disso, comparativamente com outras regiões cerebrais, a SN tem uma maior densidade de células da microglia o que torna os ND mais vulneráveis numa situação de inflamação (Kim et al., 2000).

Por outro lado, os ND quando são danificados libertam várias moléculas que levam à ativação microglial, como metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3), neuromelanina e α -sinucleína. A MMP-3 é uma protease que degrada a matriz extracelular. A sua produção é aumentada nos ND em resposta ao stress oxidativo e ao ser libertada por neurónios apoptóticos é capaz de ativar a microglia, induzindo desta forma a morte dos ND (Hwang, 2013; Kim YS, 2005a). A neuromelanina é um polímero insolúvel de cor escura que é produzido a partir da oxidação da dopamina. Quando há morte neuronal, esta molécula é libertada para o meio extracelular e lá permanece durante longos períodos. É fagocitada pelas células microgliais, induzindo a libertação de fatores neurotóxicos (Zecca et al., 2003). Através de uma injeção intracerebral de neuromelanina em ratos wistar, foi possível observar uma forte ativação microglial, seguida de morte neuronal na SN (Zecca et al., 2008). Além disso, estudos postmortem realizados em primatas, anos após exposição MPTP, evidenciaram a acumulação de

neuromelanina extracelular e de microglia ativa na SN (Bove et al., 2005). Por outro lado, a α -sinucleína um dos principais componentes dos Corpos de Lewy, característicos da DP, quando adicionada a uma cultura primária de neurónios e glia do mesencéfalo levou à ativação da microglia e conseqüentemente à neurodegeneração dopaminérgica, que não ocorreu na ausência de microglia (Zhang et al., 2005). Deste modo, os ND além de serem mais sensíveis à ativação microglial, em comparação com os outros tipos neuronais, quando são danificados libertam fatores que promovem a reatividade microglial. Iniciando-se assim um ciclo de morte neuronal progressiva característico da DP (fig.2).

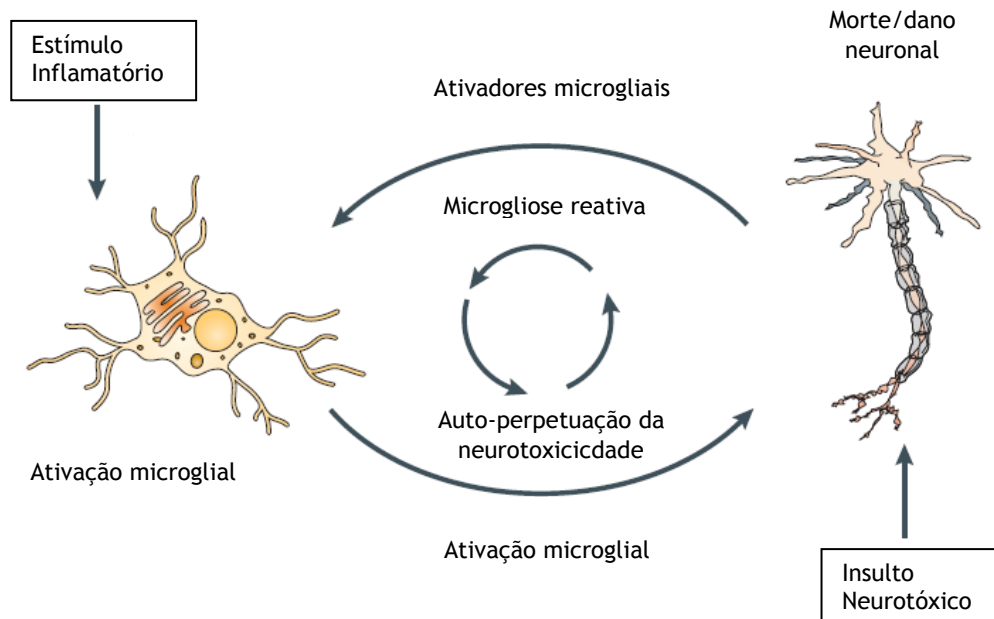


Figura 2 - A reatividade microglial pode iniciar ou amplificar o dano neuronal, ou ser uma consequência dele. Quando a microglia é ativada em resposta a um estímulo inflamatório, como o LPS, produz vários fatores, que em excesso podem levar à morte neuronal, como ROS, NO e citosinas pró-inflamatórias. Por outro lado, quando há um dano a nível neuronal, há liberação de várias moléculas como α -sinucleína e a neuromelanina que promovem a ativação neuronal. Isto resulta num ciclo de perpetuação da morte neuronal, característico das doenças neurodegenerativas, em que há uma repetição da ativação neurotóxica da microglia em resposta à lesão neuronal (microgliose reativa). Adaptado de(Block et al., 2007).

1.2.3. LPS como agente indutor de reatividade microglial e neurodegeneração dopaminérgica.

O LPS é encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativa, atuando como uma endotoxina que se liga a recetores específicos, de modo a induzir a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios. É por isso um potente indutor de inflamação, ativando fortemente as células microgliais. O LPS associa-se com a proteína de ligação ao LPS solúvel e ao CD14, que se encontra ancorado no exterior da membrana plasmática da microglia. A

transdução de sinal efetua-se através da interação do complexo LPS-CD14 com a proteína acessória extracelular MD-2 e o recetor transmembranar Toll-like 4. Quando ocorre esta associação, inicia-se a ativação de cinases de várias vias de sinalização intracelulares e uma regulação positiva da transcrição de genes para fatores pró-inflamatórios e enzimas geradoras de radicais livres (Dutta et al., 2008; Liu and Bing, 2011). Deste modo, quando há uma ativação da microglia induzida pelo LPS, há libertação de várias citocinas como a IL-1 β e TNF α e de prostaglandinas, aumento na libertação de ROS pela NADPH oxidase e regulação positiva da iNOS com consequente aumento de NO, fatores que podem levar à morte neuronal (Dutta et al., 2008; Gao et al., 2002; Gibbons and Dragunow, 2006; Hunter et al., 2009; Liu and Bing, 2011). A ativação da microglia pelo LPS, tanto *in vivo*, como *in vitro*, leva a uma perda progressiva dos neurónios dopaminérgicos (Gao et al., 2002; Hunter et al., 2009; Qin et al., 2007). Estes neurónios parecem ser mais sensíveis à neurodegeneração induzida pelo LPS, em comparação com os outros tipos neuronais, que são menos afetados (Gao et al., 2002; Kim et al., 2000). Além disso, como referido anteriormente, a lesão dos neurónios dopaminérgicos induzida pelo LPS requer a presença de microglia (Gibbons and Dragunow, 2006). Deste modo, o LPS é uma ferramenta útil em estudos dos mecanismos envolvidos na reatividade microglial e também no estudo dos mecanismos pelos quais a reatividade microglial pode levar à degeneração dopaminérgica.

1.3. Controlo da reatividade microglial

Se fosse possível regular as respostas exageradas da microglia, o ciclo que leva a morte neuronal progressiva poderia ser encerrado. É por isso essencial um melhor entendimento dos mecanismos que controlam a reatividade microglial.

1.3.1. Fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia

Os fatores neurotróficos desempenham papéis importantes na diferenciação, sobrevivência e maturação dos neurónios em desenvolvimento. Além disso, no sistema nervoso adulto encontram-se envolvidos na regulação da neurogénese, nutrem e protegem os neurónios maduros, promovendo a sua sobrevivência (Tuszynski and Gage, 1994).

Existem várias famílias de fatores neurotróficos agrupadas de acordo com a homologia estrutural. O GDNF e os outros ligandos da família GDNF (GFLs), a artemina, neurturina e persefina, pertencem à superfamília do fator de crescimento transformante β . Todos eles medeiam sinais através do recetor tirosina-cinase (Ret), que é ativado após a ligação dos GFLs aos recetores α da família GDNF (GFR α). O GDNF em particular liga-se com maior afinidade ao GFR α -1 e de seguida forma um complexo com o Ret (Airaksinen and Saarma, 2002). No

entanto, através do GFR α -1, o GDNF pode ativar vias de sinalização intracelulares independentes do Ret, (Poteryaev et al., 1999).

O GDNF foi originalmente isolado a partir do sobrenadante celular de uma linha de células gliais, revelando-se um potente fator neurotrófico para os neurónios dopaminérgicos (Lin et al., 1993). Pode ser produzido tanto em astrócitos, como microglia (Batchelor et al., 1999), promovendo a sobrevivência e diferenciação dos neurónios dopaminérgicos *in vitro* e protegendo-os de toxinas dopaminérgicas como o MPP⁺ e a 6-hidroxi-dopamina (Eggert et al., 1999; Sun et al., 2012). *In vivo*, exerce efeitos neuroprotetores contra ambas as toxinas e parece atenuar os défices a nível motor (Ramaswamy et al., 2009; Sun et al., 2012). Também pode atuar e exercer efeitos neuroprotetores noutras populações neuronais.

Estudos recentes sugerem que esta neuroproteção exercida pelo GDNF poderá resultar de uma inibição da neuroinflamação, uma vez que este possui a capacidade de reduzir a degeneração dopaminérgica induzida por LPS, suprimindo a ativação microglial (Xing et al., 2010). Tanto o Ret como o GFR α -1 são expressos em microglia (Honda et al., 1999) e por isso, o GDNF pode atuar diretamente nestas células. Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que o GDNF, presente em meio condicionado de astrócitos inibiu totalmente o aumento de ROS e a fagocitose, induzidos pelo agente inflamatório Zymosan A, em culturas de microglia do mesencéfalo ventral (Rocha et al., 2012). No entanto, ainda não se verificou de que modo os neurónios dopaminérgicos, na presença ou não de lesão, poderão influenciar este controlo da reatividade microglial por parte do GDNF.

1.3.2. Estrogénios

Os estrogénios são hormonas esteróides, que regulam e coordenam múltiplas funções no corpo humano. Existem 3 tipos, a estrona, o estradiol (E₂) e estriol, que diferem entre si no número de grupos hidroxilo. O E₂ é o mais potente no seu efeito estrogénico (Rettberg et al., 2013), ligando-se com elevada afinidade aos recetores de estrogénios. Possui dois isómeros, o 17 β estradiol que é fisiologicamente ativo e o 17 α estradiol.

Desempenham importantes funções regulatórias no sistema nervoso, agindo diretamente em neurónios e células gliais (Arevalo et al., 2010; Garcia-Ovejero et al., 2002). São capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, mas também podem ser sintetizados no sistema nervoso a partir do colesterol (Garcia-Ovejero et al., 2005). Tal como os fatores neurotróficos, os estrogénios podem ser libertados pelas células gliais, exercendo ações neuroprotetoras e anti-inflamatórias (Garcia-Ovejero et al., 2005).

A primeira evidência de que os estrogénios poderiam estar envolvidos em eventos inflamatórios surgiu quando se detetou a expressão dos recetores clássicos de estrogénios α e β , em linhas celulares de monócito-macrófago (Vegeto et al., 1999). Estes recetores de

estrogénios estão amplamente distribuídos no cérebro, encontrando-se presentes tanto em células gliais como neurónios (Rettberg et al., 2013). Em condições patológicas a sua expressão é aumentada nas células gliais (Garcia-Ovejero et al., 2002), o que pode facilitar a ação anti-inflamatória dos estrogénios.

Estudos posteriores *in vitro* e *in vivo* confirmaram a capacidade dos estrogénios em atenuar a ativação microglial. Por exemplo, em culturas primárias e linhas celulares de microglia verificou-se que o E₂ exerce um efeito anti-inflamatório na microglia ativada por LPS. Este efeito traduziu-se numa diminuição da atividade fagocítica, ROS, espécies reativas de azoto e outros fatores da cascata inflamatória. Além disso, verificou-se que este efeito era revertido na presença do antagonista dos recetores de estrogénio, o ICI 182,780 (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001). Estudos em modelos animais também mostraram que o E₂ tem a capacidade de reduzir a reatividade microglial e a expressão de citocinas e quimiocinas induzidas por LPS (Vegeto et al., 2006).

Até recentemente pensava-se que estes efeitos eram mediados exclusivamente pelos recetores nucleares clássicos, os recetores de estrogénios α e β (ER α e ER β). No entanto, a identificação de um recetor de estrogénios transmembranar, o recetor de estrogénio acoplado à proteína G (GPER) levanta a questão de uma possível participação deste recetor nos efeitos anti-inflamatórios mediados pelos estrogénios.

1.3.2.1. GPER

O GPER pertence à família dos recetores acoplados à proteína G, com a característica estrutura de 7 domínios transmembranares. Apresenta uma distribuição ampla nos tecidos, sendo expresso por neurónios e células gliais em várias regiões cerebrais (Almey et al., 2012; Brailoiu et al., 2007). Possui elevada afinidade para o estradiol, podendo mediar ações celulares rápidas através da ativação de cascatas de sinalização específicas (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005).

Foi descoberto no final dos anos noventa, no entanto, só em 2000 lhe foi atribuída uma possível função, quando Filardo et al verificaram que uma linha celular de cancro da mama, que não expressava os recetores clássicos, conseguia responder ao estradiol através deste recetor (Filardo et al., 2000).

Embora os recetores acoplados a proteína G sejam expressos maioritariamente na membrana plasmática, alguns podem ser funcionalmente expressos em locais intracelulares. O local de expressão do GPER permanece controverso. Alguns estudos sugerem a sua localização na membrana plasmática (Funakoshi et al., 2006; Thomas et al., 2005) outros no retículo endoplasmático (Revankar et al., 2005).

O GPER é conhecido por mediar efeitos neuroprotetores e por regular a morfologia neuronal (Srivastava and Evans, 2013). Adicionalmente a estes efeitos neuroprotetores, o GPER também parece mediar alguns efeitos anti-inflamatórios, nomeadamente ao nível da esclerose múltipla, doença que se caracteriza por uma reação inflamatória em que as bainhas de mielina são danificadas. Um estudo recente demonstrou que o GPER é expresso em macrófagos primários humanos e de rato e que um agonista específico do recetor, o G1, possui a capacidade de inibir a produção de citocinas induzida pelo LPS nestes macrófagos, sendo capaz de reduzir a severidade do modelo experimental da doença em modelos animais (Blasko et al., 2009). Este estudo mostrou ainda que este recetor é expresso em células microgliais de rato. Outro estudo em modelos animais mostrou que o GPER é crucial para a melhoria da esclerose múltipla em resposta ao estradiol, possivelmente por mediar o aumento de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (Yates et al., 2010).

Deste modo, os estrogénios parecem exercer efeitos anti-inflamatórios não apenas através dos recetores nucleares clássicos, mas também através do GPER. No entanto, embora se saiba que é expresso em microglia e pareça exercer efeitos anti-inflamatórios em macrófagos, não existem dados sobre o papel deste recetor no controlo da reatividade microglial.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

O presente trabalho encontra-se organizado em duas partes.

Na primeira parte do trabalho temos como principais objetivos:

- 1) Determinar de que forma a presença de neurónios afeta a ação anti-inflamatória mediada pelos astrócitos;
- 2) Avaliar se a lesão neuronal altera os possíveis efeitos observados em 1;
- 3) Relacionar os efeitos observados em 1 e 2 com alterações nos níveis de GDNF produzidos para o meio.

Com a segunda parte do trabalho pretendemos:

- 1) Esclarecer se o recetor de estrogénios acoplado à proteína G, o GPER, contribui para a inibição da reatividade microglial exercida pelo estradiol.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Culturas celulares

Todos os animais utilizados na preparação das culturas celulares foram tratados de acordo com os requisitos éticos de pesquisa animal e com a convenção europeia para a proteção dos animais vertebrados utilizados para fins experimentais ou outros propósitos científicos (Diretiva 2010/63/EU).

3.1.1. Cultura primária mista de neurónios e astrócitos do mesencéfalo ventral

Fêmeas Wistar com 15 ou 16 dias de gestação foram anestesiadas (quetamina 87,5mg/kg e xilazina 12,5mg/kg). Após um corte na região abdominal, os embriões foram removidos e a fêmea sacrificada por deslocamento cervical. Os embriões foram colocados em tampão fosfato salino (PBS: 140mM de NaCl, 81mM de Na₂HPO₄, 27mM de KCl e 15mM de KH₂PO₄, pH 7,4) enquanto se procedeu à dissecação para obtenção da região correspondente ao mesencéfalo ventral (MV) e depois à remoção das meninges. O tecido resultante foi então dissociado por digestão enzimática (tripsina 4,5mg/ml e DNase 2,5mg/ml diluídas em PBS) durante 5 min a 37 °C e depois ressuspensão em PBS contendo 10% Soro Fetal de Bovino (FBS, Biochrom AG) inativado pelo calor, para que ocorresse a paragem da digestão enzimática. Após sedimentação, removeu-se o sobrenadante, adicionou-se PBS e procedeu-se à digestão mecânica utilizando as micropipetas. A suspensão celular obtida foi centrifugada durante 3 min a 1500rpm (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges) e o sedimento resultante contendo as células foi ressuspensão em Meio Neurobasal (Gibco) suplementado com 2% de B₂₇, 0,5mM de Glutamina, 25µM Glutamato e 120µg/ml de Gentamicina. Procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano e após contagem as células foram plaqueadas a uma densidade de 0,8 x 10⁶ células/3,85 cm², em placas de cultura previamente revestidas com poli-D-lisina (Sigma Aldrich). A cultura foi mantida a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico durante 6 dias.

3.1.1.1. Preparação dos meios condicionados de culturas mistas de neurónios e astrócitos.

Ao terceiro dia de cultura, mudou-se o meio das células embrionárias mistas de neurónios e astrócitos para meio de aminoácidos não essenciais (MNEAA), constituído por Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM; Sigma, M0268) e suplementado com 2,2g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 1g/L de Glucose, 0,29g/L de L-Glutamina, 0,11g/L de Piruvato de Sódio, 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma) e 10% de FBS (Biochrom AG) inativado pelo calor. 12h depois as células foram estimuladas com a neurotoxina MPP⁺ (10 μM). No caso dos meios condicionados controlo a estimulação com MPP⁺ não ocorreu. 36h após a mudança de meio recolheram-se os meios condicionados controlo (MC-CTR) e os meios condicionados das células expostas ao MPP⁺ (MC-MPP+) e armazenaram-se a -80 °C até serem utilizados.

3.1.2. Cultura primária de microglia do mesencéfalo ventral

Ratos Wistar com 2 a 5 dias de idade foram colocados em gelo até se encontrarem num estado de hipotermia. Depois de decapitados, o cérebro foi removido e colocado em PBS. Iniciou-se a dissecação para obtenção da região correspondente ao MV e no final removeram-se as meninges. O tecido resultante foi digerido em água de cisteína (1,9mM CaCl_2 , 1,3 mM cisteína), solução de H&B (116mM NaCl, 5,4mM KCl, 26mM NaHCO_3 , 12mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5mM EDTA, 25mM glicose, PH 7,3), 0,5% de vermelho fenol e 4mg/ml de papaína, durante 4min a 37 °C. Para parar a digestão enzimática fizeram-se 3 lavagens com meio de cultura M10C-G constituído por MEM (Sigma, M0268) e suplementado com 2,2g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,75% de glicose 45%, 0,12% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, Sigma), 0,02% de insulina e 10% FBS (Biochrom AG) e iniciou-se a digestão mecânica utilizando as micropipetas. Depois de uma centrifugação a 1500rpm durante 3 min (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges), as células foram ressuspensas em M10C-G e procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano. As células foram depois plaqueadas a uma densidade de $0,356 \times 10^6$ células/ $3,85 \text{ cm}^2$ em placas revestidas com poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) e mantidas a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Depois de 10 a 15 dias de cultura, a microglia foi obtida por remoção dos astrócitos com uma solução de tripsina (0,5g/L de Tripsina e 0,2g/L de EDTA dissolvidos em PBS) diluída numa proporção de 1:3 em MEM, durante 30 min. Depois a microglia foi mantida em M10C-G a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico entre 5 a 6 dias, até se encontrar num estado de repouso.

3.1.2.1. Preparação do meio condicionado de astrócitos

Cinco dias após o início da cultura das células gliais, mudou-se o meio de cultura para MNEAA constituído por MEM (Sigma, M0268) e suplementado com 2,2g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 1g/L de Glucose, 0,29g/L de L-Glutamina, 0,11g/L de Piruvato de Sódio, 1% de aminoácidos não essenciais e 10% de FBS (Biochrom AG) inativado pelo calor. 36h depois recolheram-se os meios condicionados e armazenaram-se a -80°C até serem utilizados.

3.1.3. Cultura primária de microglia do Córtex

Ratos Wistar com 3 dias de idade foram colocados em gelo até se encontrarem num estado de hipotermia. Depois de decapitados, o cérebro foi removido e colocado em PBS. Iniciou-se a dissecação para obtenção da região correspondente ao córtex e no final removeram-se as meninges. Depois de cortado com o bisturi, o tecido resultante foi digerido em água de cisteína, solução de H&B, 0,5% de vermelho fenol e 4mg/ml de papaína, durante 15min a 37°C . Para parar a digestão enzimática fizeram-se 3 lavagens com meio de cultura M10C-G constituído MEM (Sigma, M0268) e suplementado com 2,2g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,75% de glicose 45%, 0,12% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, Sigma), 0,02% de insulina e 10% FBS (Biochrom AG) e iniciou-se a digestão mecânica utilizando as techitps. Depois de uma centrifugação a 1500rpm durante 4 min (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges), as células foram ressuspensas em M10C-G e procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano. Depois as células foram colocadas em frascos de cultura de 75cm^2 (BD Falcon) a uma densidade de 15×10^6 células/frasco e mantidas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Cerca de 10 a 15 dias após o isolamento os frascos contendo as células microgliais foram agitados durante 2h a 200 rpm (Agitorb200, Aralab). Depois recolheu-se o sobrenadante e centrifugou-se durante 4 min a 1500 rpm (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). O sedimento resultante foi ressuspensado em M10C-G e procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano. As células foram depois plaqueadas a uma densidade de $0,05 \times 10^6$ células/ $3,85\text{ cm}^2$. A microglia foi mantida em M10C-G a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico durante 7 dias, até se encontrar num estado de repouso.

3.1.4. Cultura de linha celular de microglia N9

A linha celular de microglia N9 armazenada a -80°C foi descongelada e colocada a proliferar em fracos de cultura de 75cm^2 (BD Falcon) em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma, R4130) suplementado com 2,2g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 5% de FBS (Biochrom AG) inativado pelo calor e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, Sigma). A cultura foi mantida a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Quando atingiu uma

confluência de aproximadamente 70% efetuou-se a passagem das células por tripsinização. Adicionou-se uma solução contendo 0,5g/L de Tripsina e 0,2g/L de EDTA dissolvidos em PBS, durante aproximadamente 3min, após o que se adicionou RPMI-1640 para terminar a tripsinização. As células foram centrifugadas a 920 rpm durante 5min (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges) e depois do sobrenadante removido, ressuspensas em RPMI-1640. Procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão pelo azul de tripano e efetuou-se o plaqueamento a diferentes densidades. Para a medição dos níveis de Óxido Nítrico (NO) utilizou-se uma densidade de $0,02 \times 10^6$ células/ $1,9 \text{cm}^2$, para avaliação da atividade fagocítica e expressão de iNOS por imunocitoquímica as células foram cultivadas em lamelas de vidro a uma densidade de $0,0075 \times 10^6$ células/ $1,9 \text{cm}^2$ e para ensaios de migração utilizou-se uma densidade de $0,01 \times 10^6$ células/ $3,85 \text{cm}^2$. De modo a manter a linha celular em cultura, as células foram também semeadas num frasco de 75cm^2 , onde se mantiveram até atingirem novamente a confluência necessária para serem tripsinizadas.

3.2. Estimulação celular

3.2.1. Influência dos neurónios no controlo da reatividade microglial exercido pelo GDNF libertado por astrócitos

Quando a cultura primária de microglia se encontrava num estado de repouso, adicionaram-se os meios condicionados por culturas de astrócitos (MC-A), por culturas mistas de astrócitos e neurónios (MC-CTR) e por culturas mistas expostas a MPP⁺ (MC-MPP⁺). 24h após a adição dos meios condicionados adicionou-se o agente pró-inflamatório LPS ($0,1 \mu\text{g/ml}$, Sigma). Às 48h terminou-se a reação por recolha dos sobrenadantes para medição do NO e níveis de IL-1 β ou utilização das células para avaliação da atividade fagocítica, pureza da cultura ou expressão proteica da iNOS. O procedimento experimental usado está representado na figura 3.

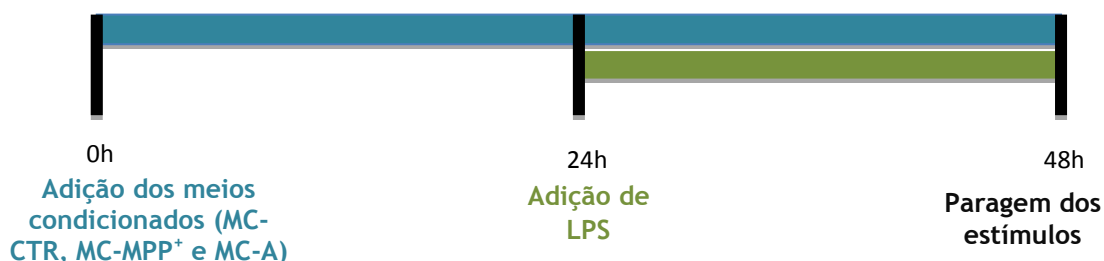


Figura 3 - Representação esquemática do procedimento de estimulação celular usado para o estudo da influência dos neurónios no controlo da reatividade microglial exercido pelo GDNF libertado por astrócitos.

3.2.2. Papel do GPER no controlo da reatividade microglial

Aos 2 dias em cultura mudou-se o meio das células microgliais N9 e adicionou-se o antagonista seletivo do GPER, o G15 (100nM, Calbiochem). Trinta minutos após a adição de G15, adicionou-se o estradiol (E_2) ou o agonista seletivo do GPER, o G1 (100nM, Calbiochem). O agente pró-inflamatório LPS (0,1 μ g/ml, Sigma) foi adicionado às 24h e às 48h a reação foi terminada. O procedimento experimental está representado na figura 4. Os sobrenadantes foram recolhidos para medição do NO e dos níveis de IL-1 β . As células foram utilizadas para avaliação da atividade fagocítica, expressão da INOS por imunocitoquímica e ensaios de migração.



Figura 4 - Representação esquemática do procedimento de estimulação celular usado para o estudo do papel do GPER no controlo da reatividade microglial.

3.3. Medição do Óxido Nítrico

24h após estimulação com LPS, os meios de cultura foram recolhidos e a quantidade de óxido nítrico determinada por quantificação do nitrito (NO_2^-) acumulado. O nitrito é um dos produtos primários do óxido nítrico que ao reagir com a sulfanilamida e o N-1-naftiletildenodiamina (NED) origina, em condições ácidas, um composto colorido. Esta é uma reação de diazotação descrita originalmente por Griess em 1879. Para a realização deste ensaio, colocaram-se 50 μ l de cada amostra recolhida numa placa de 96 poços e de seguida adicionou-se a mesma quantidade da solução de sulfanilamida (1% de sulfanilamida e 5% de ácido fosfórico diluídos em água). Incubou-se durante 8 min à temperatura ambiente antes de se adicionarem 50 μ l da solução contendo o NED (0,1% N-1-naftiletildenodiamina diluído em água). Após uma nova incubação de 8 min observou-se a mudança de cor que foi quantificada por leitura da absorvência a 550nm.

3.4. Avaliação da atividade fagocítica

Culturas celulares controlo e culturas celulares expostas ao LPS foram incubadas durante 15 min com uma solução contendo 0,01% de microsferas fluorescentes (Invitrogen). Depois de 2

lavagens com meio de cultura para remover as microsferas não fagocitadas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) durante 20 min. Por fim, para ocorrer marcação nuclear, as células foram incubadas com Hoescht 2 μ M (Invitrogen) preparado em PBS contendo 0,1% de Tween (PBS-T). Depois de 3 lavagens com PBS-T, procedeu-se à montagem das lamelas com meio de montagem DAKO (Glostrup, Denmark). A contagem das células fagocíticas efetuou-se por análise de 20 campos em cada lamela, no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss), a uma ampliação de 63x. Em cada experiência quantificaram-se 3 lamelas por condição.

3.5. Imunocitoquímica

Após remoção do meio de cultura e lavagem com PBS as células foram fixadas com PFA 4% durante 10min e depois permeabilizadas por incubação com 1% Triton X-100 em PBS durante 5min. Para que as ligações não específicas fossem bloqueadas adicionou-se PBS contendo 0,1% de Tween (PBS-T) e 20% de FBS (Biochrom AG), e deixou-se a incubar 1h à temperatura ambiente. Depois do bloqueio as células foram lavadas com PBS-T e incubadas durante a noite a 4°C, com o anticorpo primário diluído numa solução de PBS-T com 1% de FBS (Biochrom AG). Os anticorpos foram utilizados de acordo com a tabela 1. No dia seguinte efetuaram-se 6 lavagens com PBS-T em 15 min, adicionou-se o anticorpo secundário diluído igualmente em PBS-T com 1% de FBS (Biochrom AG) e deixou-se incubar durante 1h à temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas 6 vezes com PBS-T durante 15min e depois procedeu-se à marcação dos núcleos por incubação durante 10 min com Hoescht 2 μ M (Invitrogen) preparado em PBS-T. Após mais 3 lavagens procedeu-se à montagem das lamelas utilizando o meio de montagem DAKO (Glostrup, Denmark). As imagens fluorescentes foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss), com uma ampliação de 63x. Em cada experiência quantificaram-se 3 lamelas por condição experimental e analisaram-se 20 campos por lamela.

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de imunocitoquímica.

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição	Empresa	Anticorpo Secundário	Diluição	Empresa
GFAP	Policlonal Coelho Anti-GFAP	1:2000	DAKO	Cabra anti-coelho conjugado com alexa 546	1:2000	Invitrogen, Molecular Probes
CD11b	Rato Anti-Integrin α MB2	1:200	Chemicon	Cabra anti-rato conjugado com alexa 488	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
GPER	Policlonal Coelho Anti- GPER	1:200	Santa Cruz Biotechnology	Cabra anti-coelho conjugado com alexa 488	1:1000	Invitrogen, Molecular Probes
iNOS	Policlonal Coelho Anti-iNOS	1:100	DB Biosciences	Cabra anti-coelho conjugado com alexa 546	1:2000	Invitrogen, Molecular Probes

3.6. Western Blot

Para preparação dos extratos proteicos para o Western blot as células foram lavadas duas vezes com PBS após o que se procedeu à lise das células, mantidas em gelo, com um tampão de lise (25mM Tris, 2,5mM EDTA, 2,5mM EGTA, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 1mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo e 25 μ g/ml leupeptina). Os extratos celulares resultantes foram recolhidos e a proteína total presente nas amostras foi quantificada pelo método de Bradford. A restante amostra foi desnaturada por adição de uma solução desnaturante (62,5mM de Tris-HCl (pH6.8), 2% de SDS, 10% de glicerol, 140mM de β -mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol) e por aquecimento a 100 °C durante 5min. O volume de amostra correspondente a 20 μ g de proteína foi adicionado ao gel de concentração constituído por 4% de acrilamida em Tris-HCl 0,5M, Sulfato de sódio (SDS) 10%, 0,05% de persulfato de amónia (PSA) 10% e 0,1% de tetrametiletilenodiamina. As proteínas foram separadas de acordo com o seu peso molecular no gel de separação constituído por 12% de acrilamida em Tris-HCl 1,5M, SDS 10%, 0,05% de PSA 10% e 0,05% de TEMED, por aplicação de uma voltagem de 160V, durante aproximadamente 1h à temperatura ambiente (sistema BIO-RAD). Antes da montagem da sanduiche para a eletrotransferência as membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare, Amersham, UK) foram ativadas por imersão sucessiva em metanol, água e tampão de eletrotransferência (CAPS 10mM e 10% de metanol). Quando a eletroforese terminou, removeu-se o gel de concentração e colocou-se o gel de separação com as proteínas juntamente com uma membrana de PVDF ativada e papel de filtro na sanduiche e iniciou-se a eletrotransferência a 750mA durante 1h e 30min a 4°C. De modo a evitar ligações não específicas dos anticorpos, no final da eletrotransferência procedeu-se ao bloqueio das

membranas com 5% de leite (Páturages, France) diluído em TBS-T (0,1 % Tween, 20mM de Tris, 137mM de NaCl e 0,38% HCl 1M) durante 1h à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário de coelho anti-iNOS (1:1000, BD Biosciences, 610332) diluído em PBS-T, durante a noite a 4°C. No dia seguinte efetuaram-se 3 lavagens de 15min com TBS-T e incubaram-se as membranas durante 1h com o anticorpo secundário dirigido contra as imunoglobulinas de coelho e conjugado à peroxidase de rábano (HRP) (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, sc-2004). Após mais 3 lavagens de 15min com PBS-T as membranas foram reveladas por quimioluminescência. Depois de expostas ao substrato Luminata TM Crescendo Western HRP durante aproximadamente 1min, o sinal foi detetado utilizando filmes hyperfilm-ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Germany). Os filmes foram digitalizados e as bandas quantificadas usando o programa QuantityOne. De modo a normalizar os resultados obtidos, as membranas foram incubadas durante 1h com o anticorpo anti-GPDH de rato (1:5000, Milipore) diluído em TBS-T. Após esta incubação efetuaram-se 3 lavagens de 15min e incubaram-se as membranas durante 1h com o anticorpo secundário dirigido contra as imunoglobulinas de rato e conjugado a HRP (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). O anticorpo não ligado foi removido por 3 lavagens de 15min com TBS-T. Após estas lavagens as membranas foram novamente reveladas por quimioluminescência.

3.7. Técnica de ELISA

3.7.1. Medição dos níveis de GDNF

Após recolha dos meios condicionados quantificou-se o GDNF, utilizando o sistema de imunoensaio GDNF E_{max} (Promega) e seguindo as instruções do fabricante. Placas de 96 poços (MaxiSorp™) foram revestidas com anticorpo monoclonal anti-GDNF durante a noite a 4°C. Depois de se proceder ao bloqueio durante 1h, à temperatura ambiente, adicionaram-se 100µl dos diferentes meios condicionados, bem como as diferentes diluições de GDNF usadas para construir a curva padrão e procedeu-se a incubação durante 6h à temperatura ambiente. Deste modo, o GDNF solúvel presente nas amostras pode ligar-se especificamente ao anticorpo monoclonal anti-GDNF. Depois de 5 lavagens, adicionou-se o anticorpo policlonal anti-GDNF, que se liga ao GDNF capturado, e incubou-se durante a noite a 4°C. Para remover o excesso de anticorpo não ligado, efetuaram-se 5 lavagens. Depois, para se poder detetar o anticorpo policlonal anti-GDNF humano incubou-se com um anticorpo de galinha conjugado à HRP 2h à temperatura ambiente. Realizaram-se 5 lavagens para remover o anticorpo não ligado e após incubação com o substrato cromogénico (TMB one solution) durante 15min à temperatura ambiente parou-se a reação por adição de 1N de ácido clorídrico. A mudança de cor observada foi medida por leitura da absorvância a 450nm (SpectraMax M2 microplate reader). As concentrações de GDNF foram determinadas usando a curva padrão de GDNF.

3.7.2. Medição dos níveis de IL-1 β

Para a quantificação dos níveis de IL-1 β , utilizou-se um kit de ELISA para IL-1 β (eBioscience), de acordo com as instruções do fabricante. Placas de 96 poços (Corning Costar 9018) foram revestidas com o anticorpo de captura anti-rato IL-1 β durante a noite a 4°C. No dia seguinte, após 5 lavagens de 1min, procedeu-se ao bloqueio com a solução diluente do ensaio, durante 1h à temperatura ambiente. Após mais 5 lavagens, adicionaram-se 100 μ l dos diferentes meios condicionados, bem como das diferentes diluições para a curva padrão de IL-1 β e incubou-se durante 2h à temperatura ambiente. Deste modo, a IL-1 β solúvel presente nas amostras pode ligar-se ao anticorpo de captura. Depois de 5 lavagens, adicionou-se o anticorpo de detecção policlonal anti-murgano IL-1 β conjugado à biotina e incubou-se à temperatura ambiente durante 1h. Adicionou-se Avidina conjugada à HRP após 5 lavagens e incubou-se novamente, desta vez apenas durante 30min à temperatura ambiente. Depois de 7 lavagens adicionou-se o substrato cromogénico (TMB solution) durante 15 min à temperatura ambiente e parou-se a reação com H₃PO₄1M. A cor resultante foi quantificada por leitura da absorvância a 450nm (SpectraMax M2 microplate reader). As concentrações de IL-1 β foram determinadas usando a curva padrão de IL-1 β .

3.8. Ensaio de migração

Dissolveu-se 0,5% de agarose em PBS e aqueceu-se a solução no micro-ondas até à ebulição. Agitou-se para facilitar a dissolução completa e depois deixou-se arrefecer um pouco. Retirou-se 1ml da solução para um eppendorf e adicionou-se 10 μ l de PBS com ou sem G1 (Calbiochem). Depois pipetaram-se gotas de 10 μ l para as lamelas de 35mm colocadas em placas de 12 poços. O G1 ficou com uma concentração final de 100nM em cada gota. Deixou-se arrefecer durante 5min a 4°C e adicionaram-se as células microgliais N9. O LPS (0,1 μ g/ml, Sigma) adicionou-se de seguida ao meio de cultura. 24h depois todas as células que penetraram na agarose foram contabilizadas.

3.9. Análise Estatística

Os dados obtidos encontram-se expressos em percentagem de controlo, percentagem induzida pelo LPS, ou percentagem de células totais (de acordo com o referido no texto e legenda das figuras) e representam a média \pm SEM de experiências independentes, realizadas em triplicado. Análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 5 Demo, com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Capítulos 4 e 5

Resultados

4 e 5. Resultados

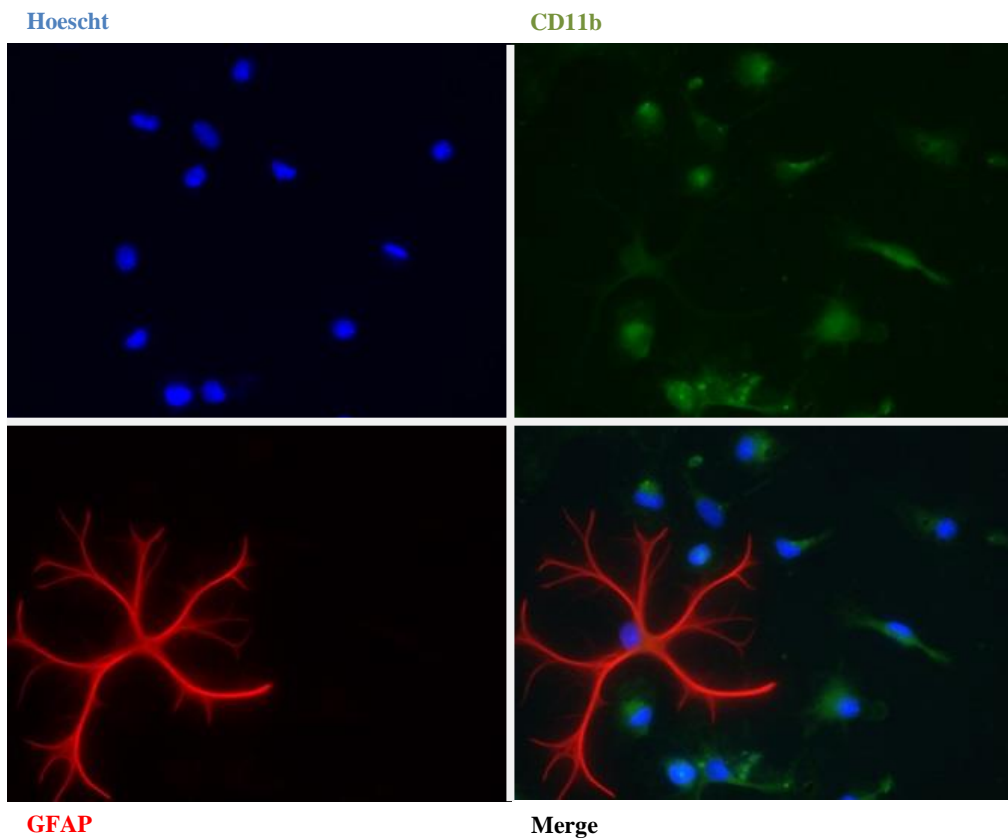
4. Influência da presença de neurónios no controlo da reatividade microglial exercido pelo GDNF libertado por astrócitos

Os astrócitos desempenham funções regulatórias ao nível da ativação, diferenciação e morfologia microglial (Lynch, 2009; Streit et al., 1999) podendo prevenir uma ativação excessiva da microglia (Lynch, 2009). Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que o GDNF, presente em meio condicionado de astrócitos inibe totalmente o aumento de ROS e a fagocitose, induzidos por um agente inflamatório (Zymosan A), em culturas primárias de microglia do MV (Rocha et al., 2012). No entanto, num sistema vivo temos presentes, para além das células gliais, os neurónios, não se sabendo de que modo a presença destas células, lesadas ou não, pode influenciar este controlo da reatividade microglial por parte do GDNF libertado pelos astrócitos. Com o objetivo de esclarecer este ponto, analisámos vários parâmetros da reatividade microglial, nomeadamente a produção de NO, a atividade fagocítica e a libertação de IL-1 β , na presença dos diferentes meios condicionados (MC-A, MC-CTR e MC-MPP⁺). Os dados obtidos estão apresentados ao longo da secção 4 dos resultados.

4.1. Caracterização da cultura primária de microglia do MV

A cultura primária de microglia foi obtida a partir de uma cultura primária de células gliais do MV, na qual os astrócitos foram removidos por tripsinização. Para avaliar o efeito dos meios condicionados na microglia, é necessário ter uma cultura pura, pois só assim podemos ter certeza que os efeitos verificados se devem ao condicionamento e não à contaminação da cultura com astrócitos. Assim, para avaliação da pureza da cultura, as células microgliais foram marcadas para CD11b, um conhecido marcador de superfície microglial e os astrócitos foram marcados para a proteína GFAP (fig.5A). Verificou-se que cerca de 98% das células apresentaram marcação para CD11b. Alguns astrócitos foram observados na periferia das lamelas, constituindo apenas 2% da cultura (fig.5B).

(A)



(B)

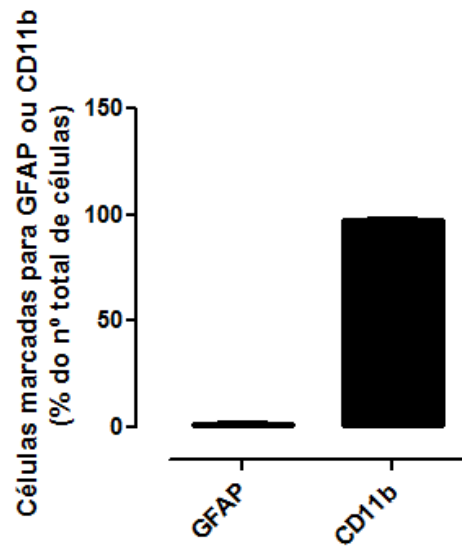


Figura 5 - Avaliação de pureza da cultura primária de microglia do MV. (A) Imagem representativa de uma imunocitoquímica em que a microglia foi marcada com anti-CD11b (verde) e os astrócitos com anti-GFAP (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul) e permitiram avaliar o n° total de

células presentes na preparação. A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x. **(B)** Quantificação da percentagem de células com marcação para CD11b e GFAP. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado.

4.2. Meios condicionados na presença de neurónios foram incapazes de inibir a produção de NO induzida pelo LPS na microglia

Em condições fisiológicas normais, o NO é um importante mensageiro secundário, tendo um papel crucial na comunicação intracelular e na sinalização intracelular no sistema nervoso. No entanto, em grandes quantidades, pode ser citotóxico (Gibbons and Dragunow, 2006). É produzido por várias isoformas da NOS, incluindo a iNOS, que é expressa nas células do sistema imunitário, como a microglia. Em situações patológicas a sua expressão é aumentada nas células microgliais, que assim podem produzir grandes quantidades de NO.

Sabe-se que o MC-A consegue diminuir a produção de NO na microglia estimulada com LPS (Lynch, 2009), falta averiguar se os neurónios poderão exercer alguma influência neste controlo. Deste modo, culturas de microglia do MV de rato foram incubadas com os diferentes meios condicionados (MC-CTR, MC-MPP⁺ e MC-A) ou com meio MNEAA não condicionado (controlo) e depois estimuladas com o agente pró-inflamatório LPS (0,1 μ g/ml) durante 24h. A estimulação da cultura com LPS provocou um aumento significativo de 51% na libertação de NO, em comparação com o controlo. Como esperado, a pré-incubação das células microgliais com MC-A inibiu o aumento da libertação de NO induzida pelo LPS (em cerca de 39%), no entanto, com o MC-CTR e o MC-MPP⁺, esta inibição já não se verificou (fig.6A). Estes resultados sugerem que a presença de neurónios impede a inibição da libertação de NO promovida pelos astrócitos. Este parece não ser um efeito específico da microglia do mesencéfalo ventral, uma vez que as mesmas condições experimentais foram aplicadas a uma cultura primária de microglia do córtex e, tal como aconteceu com a cultura de microglia do MV, houve um aumento significativo na libertação de NO induzido pelo LPS nas células microgliais (cerca de 13%) que foi totalmente inibido quando houve pré-incubação com MC-A, ao contrário do que aconteceu com MC-CTR e MC-MPP⁺. No entanto, num estado basal, na ausência de estimulação com LPS, tanto o MC-A como o MC-MPP⁺ reduziram a libertação de NO significativamente comparativamente ao controlo (cerca de 7%). (fig.6B). As células microgliais do córtex parecem ser menos responsivas ao LPS que as células do MV, no entanto o efeito dos meios condicionados num estado reativo da microglia foi semelhante em ambas as culturas.

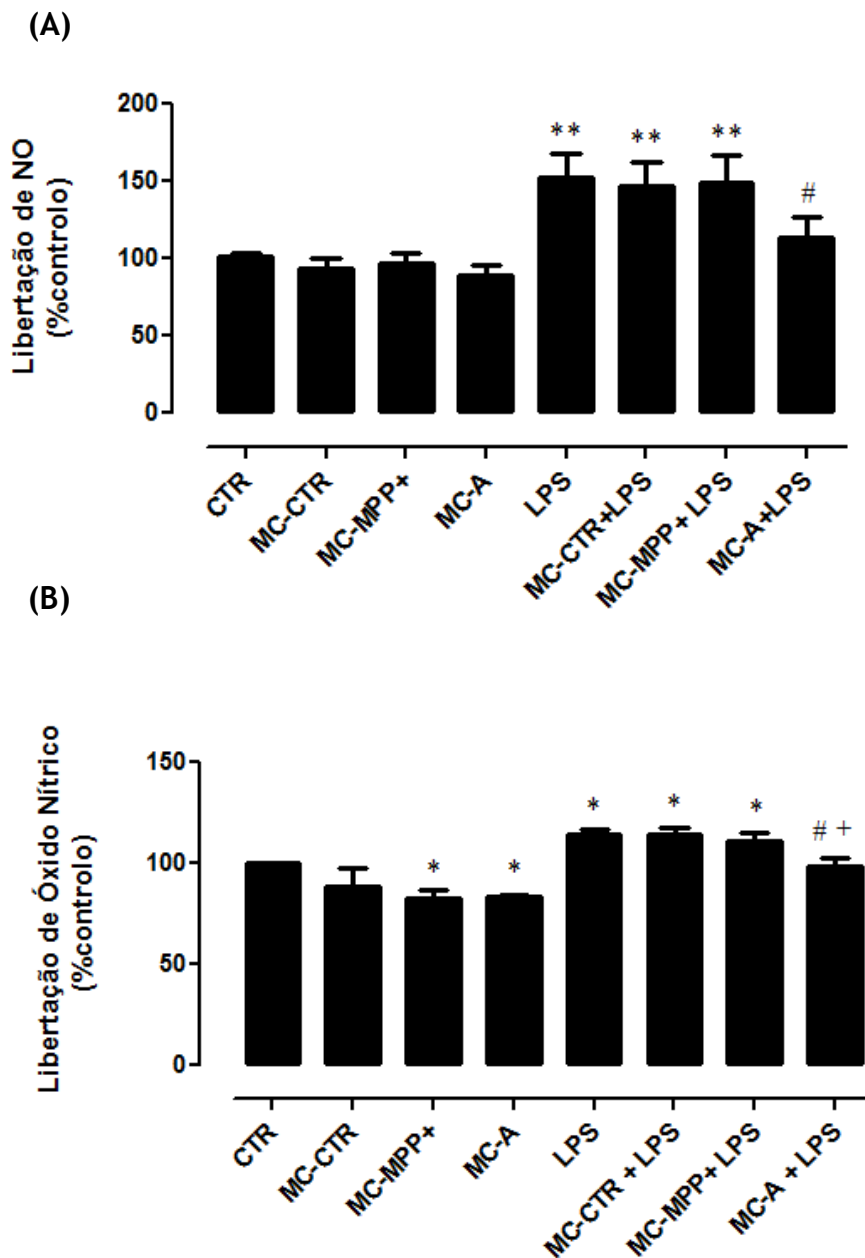


Figura 6 - Efeito dos meios condicionados na liberação de NO pela microglia estimulada com LPS. Após incubação com LPS (0,1µg/ml) durante 24h, na presença de MC-A, MC-CTR, MC-MPP⁺ ou meio de cultura MNEAA não condicionado (CTR), mediu-se a liberação de NO para o sobrenadante da cultura primária de células microgliais do MV (A) e do Córtex (B), utilizando o método de Griess. Cada barra representa a média ± SEM de três a nove experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem de controlo. Análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni (**p<0,01 comparado com o CTR; *p<0,05 comparado com o CTR; #p<0,05 comparado com o LPS sozinho e +p<0,05 e comparado com o MC-A)

4.3. Meios condicionados pelas células do mesencéfalo diminuíram a expressão da iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.

A iNOS é a isoforma da NOS que produz o NO nas células microgliais. Sabe-se que o MC-A consegue diminuir a expressão da iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais (Lynch, 2009). Como tanto o MC-CTR, como o MC-MPP⁺ revertem a inibição da libertação de NO promovida pelo MC-A em culturas primárias de microglia do MV estimuladas com LPS, fomos averiguar se estes meios condicionados induzem alterações na expressão da iNOS. Assim, as culturas primárias de microglia do MV foram incubadas com MC-A, MC-CTR e MC-MPP⁺, ou com meio MNEAA não condicionado (controlo) e depois estimuladas LPS (0,1µg/ml) durante 24h. Após quantificação proteica por Western Blot, verificou-se que na ausência de estimulação com LPS a iNOS não se encontrava expressa nas células microgliais. Como esperado, a estimulação com LPS induziu a expressão de iNOS. A pré-incubação com os diferentes meios condicionados inibiu significativamente esta expressão induzida pelo LPS, cerca de 52% no caso do MC-CTR, 55% no caso do MC-A e 80% na presença de MC-MPP⁺ (fig.7). Estes resultados demonstram que os meios condicionados provocam uma diminuição na expressão da iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.

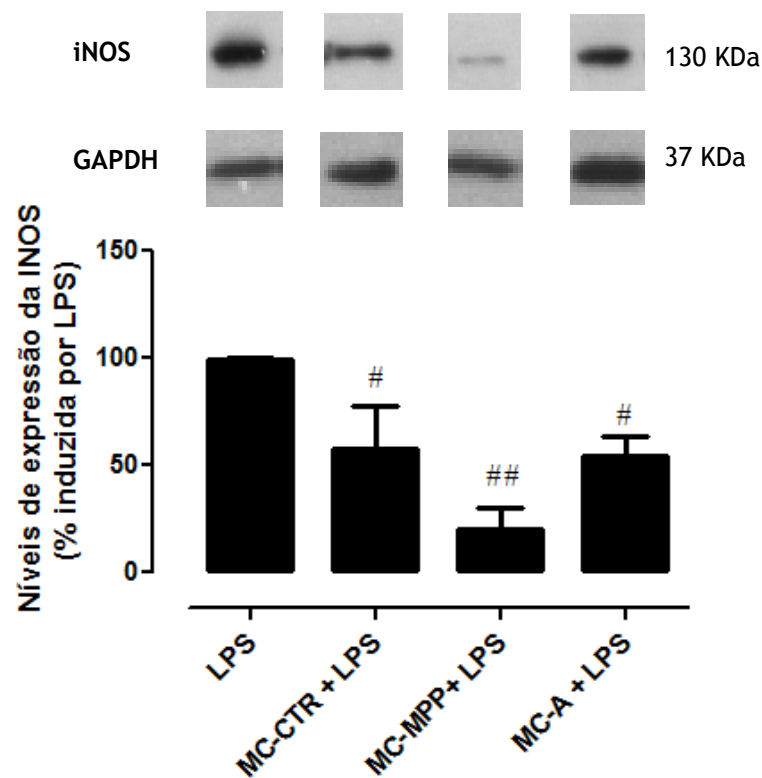


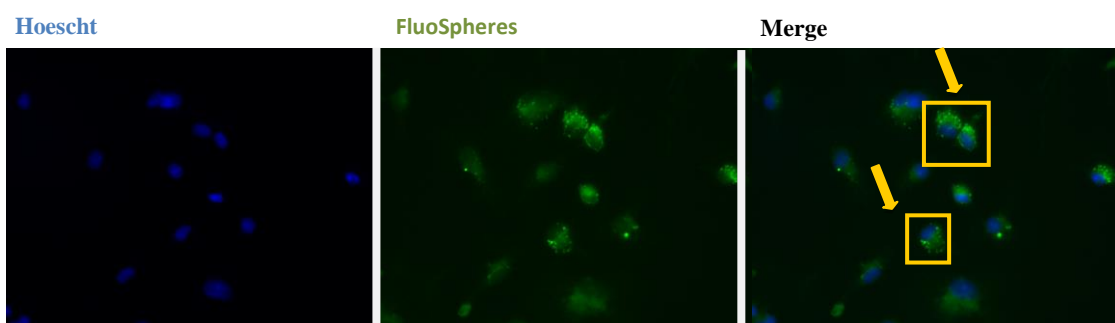
Figura 7 - Efeito dos meios condicionados na regulação da expressão de iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais. Após incubação com LPS (0,1µg/ml) durante 24h, na presença de MC-A, MC-CTR,

MC-MPP⁺ ou meio de cultura MNEAA não condicionado (CTR), quantificou-se a expressão da iNOS nas culturas primárias de microglia do MV. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em porcentagem induzida pelo LPS. Análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (^{##}p<0,01 e [#]p<0,05 comparado com o LPS sozinho).

4.4. Meios condicionados na presença de neurónios e astrócitos inibiram a atividade fagocítica de microglia estimulada com LPS.

Já foi demonstrado anteriormente que o MC-A consegue inibir a atividade fagocítica das células microgliais induzida por Zymosan A (Rocha et al., 2012), no entanto falta averiguar de que modos os neurónios influenciam esta inibição. Para este efeito, culturas primárias de microglia do MV foram estimuladas com LPS (0,1 μ g/ml) durante 24h, na presença de MC-CTR, MC-MPP⁺, MC-A ou meio de cultura MNEAA sem condicionamento (controlo) e depois expostas a microsferas fluorescentes. As células que incorporaram estas microsferas foram consideradas fagocíticas (fig.8A). Verificou-se que na presença de LPS a percentagem de células fagocíticas aumentou significativamente, cerca de 54% comparativamente ao controlo e que quando as células foram pré-incubadas com os diferentes meios condicionados, este aumento não se verificou. Tanto o MC-A como o MC-MPP⁺ inibiram totalmente o aumento de células fagocíticas induzido pelo LPS e o MC-CTR inibiu em cerca de 41% (fig.8B) Estes resultados mostram que a presença de neurónios não influencia a inibição da atividade fagocítica promovida pelos astrócitos.

(A)



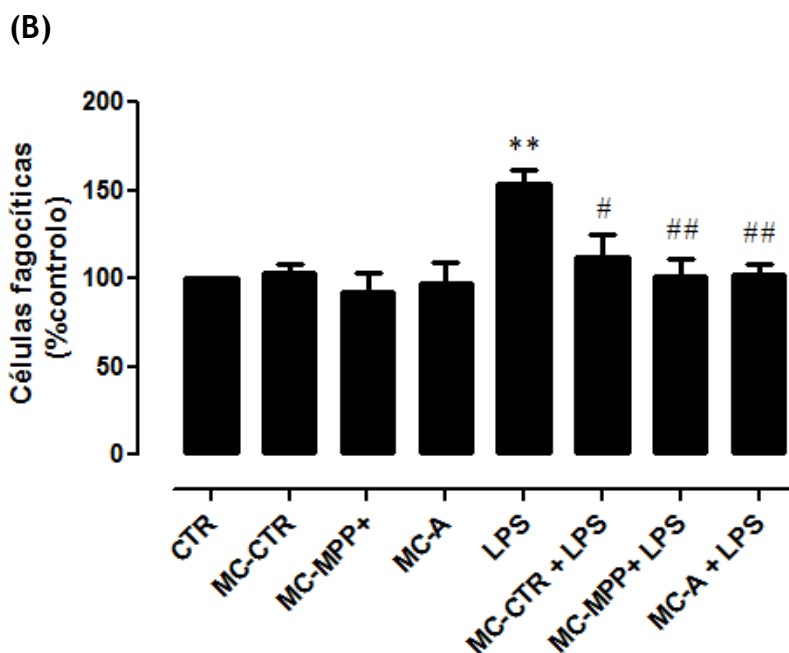


Figura 8 - Efeito dos meios condicionados na atividade fagocítica microglial induzida pelo LPS. As células microgliais do MV foram incubadas com LPS (0,1 μ g/ml) durante 24h, na presença de MC-CTR, MC-MPP⁺, MC-A ou meio MNEAA sem condicionamento (CTR) e depois expostas a microsferas fluorescentes. (A) Imagem fluorescente das células microgliais expostas a microsferas fluorescentes. As setas amarelas indicam células que incorporaram microsferas e que por isso são consideradas fagocíticas. A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x. (B) Quantificação da percentagem de células fagocíticas para cada condição. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem de controlo. Análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (** p <0,01 comparado com o CTR; ## p <0,01 comparado com o LPS sozinho e # p <0,05 comparado com o LPS sozinho).

4.5. MC-A promove um aumento da produção de IL-1 β pela microglia estimulada com LPS

A IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória produzida pela microglia ativada, é um importante mediador da resposta inflamatória e encontra-se envolvida em várias atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. Para se verificar qual o efeito dos diferentes meios condicionados na produção de IL-1 β pela microglia ativada, as células microgliais do MV foram estimuladas com LPS (0,1 μ g/ml) na presença dos diferentes meios condicionados, ou meio de cultura MNEAA não condicionado (controlo). Os níveis de IL-1 β presentes nos sobrenadantes foram determinados por ELISA. A quantidade de IL-1 β detetada para as diferentes condições foi muito baixa e variável, estando em muitas situações abaixo dos limites de detecção do ensaio. Apenas na microglia ativada com LPS na presença de MC-A, se registaram níveis de IL-1 β mais elevados e consistentes (fig.9). Estes resultados

demonstram que o MC-A induziu um aumento da produção de IL-1 β pela microglia estimulada com LPS.

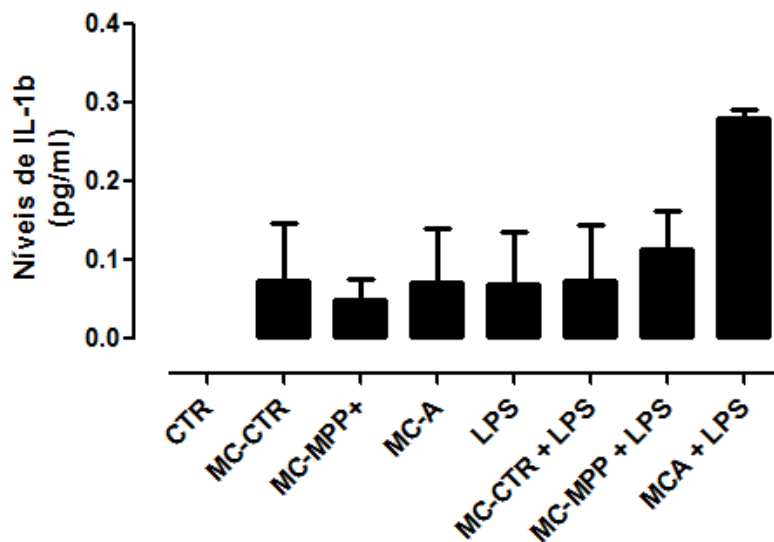


Figura 9 - Efeito dos meios condicionados na produção de IL-1 β pela microglia estimulada com LPS. As células microglicais do MV foram estimuladas durante 24h com LPS (0,1 μ g/ml), na presença de MC-CTR, MC-MPP⁺ e MC-A, recolheram-se os sobrenadantes e quantificaram-se os níveis de IL-1 β por ELISA. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado.

4.6. Meios condicionados na presença de neurónios e astrócitos apresentaram níveis de GDNF mais baixos que os meios condicionados apenas por astrócitos.

O trabalho anterior do nosso grupo mostrou-se que o MC-A conseguiu inibir as ROS e a fagocitose induzidas pelo Zymosan A em culturas de microglia do MV, e que este efeito era mediado pela libertação de GDNF (Rocha et al., 2012). Uma vez que tanto o MC-CTR, como o MC-MPP⁺ reverteram a inibição da libertação de NO promovida pelo MC-A, fomos verificar se o GDNF presente nestes meios condicionados se encontrava alterado. Para tal, após recolha dos meios condicionados das culturas primárias mistas de neurónios e astrócitos (MC-CTR e MC-MPP⁺) e MC-A quantificaram-se os níveis de GDNF por ELISA. Os dados obtidos mostram que os níveis de GDNF se encontram significativamente diminuídos tanto no MC-MPP⁺ como no MC-CTR, em comparação com os níveis presentes no MC-A (fig.10).

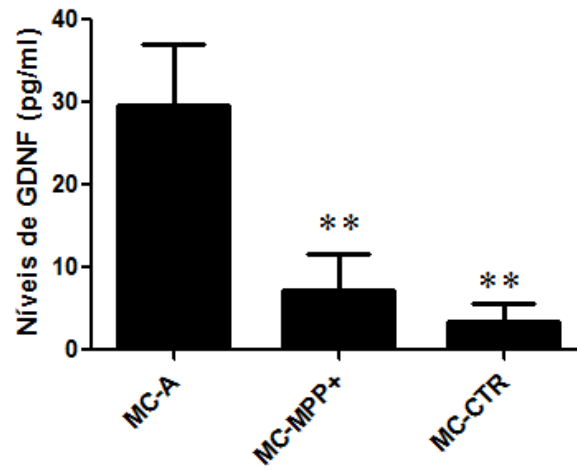


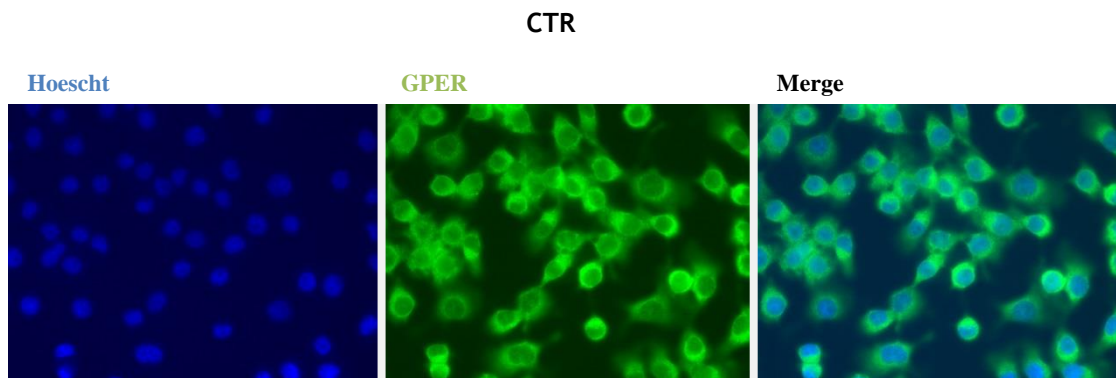
Figura 10 - Níveis de GDNF presentes nos meios condicionados. Depois de recolhidos os diferentes meios condicionados, os níveis de GDNF foram medidos utilizando a técnica de ELISA. Cada barra representa a média \pm SEM de pelo menos três experiências independentes. Análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (** $p < 0,01$ comparado com o MC-A).

5. Papel do GPER no controlo da reatividade microglial

Vários estudos demonstram que os estrogénios exercem efeitos anti-inflamatórios na microglia, que se traduzem numa diminuição da atividade fagocítica e da produção de ROS, de espécies reativas de azoto e de outros fatores da cascata inflamatória, como citocinas e quimiocinas (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001). Até há pouco tempo pensava-se que estes efeitos eram mediados exclusivamente através da ativação dos recetores nucleares clássicos (ER α e ER β). No entanto, recentemente identificou-se um novo recetor de estrogénios, o GPER. Este recetor é expresso em células microgliais e pode exercer efeitos anti-inflamatórios em macrófagos, mas o seu papel no controlo da reatividade microglial não se encontra esclarecido. Assim, o objetivo do trabalho apresentado na secção 5 dos resultados foi o de esclarecer a participação do GPER no controlo da reactividade microglial exercido pelo estradiol.

5.1. GPER é expresso pela linha celular de microglia N9

Blasko e colaboradores mostraram que o GPER é expresso em células microgliais de rato (Blasko et al., 2009). No entanto, a sua expressão na linha celular de microglia N9, não foi ainda demonstrada. Utilizando um anticorpo anti-GPER, comprovámos a marcação para GPER nestas células e verificamos que não havia diferenças na expressão deste recetor entre as células controlo e as células tratadas com 0,1 μ g/ml de LPS (fig.11). Uma vez que a imunocitoquímica foi efectuada na ausência de permeabilização celular, a forte marcação observada sugere que nas células N9 este recetor está presente na membrana plasmática.



LPS

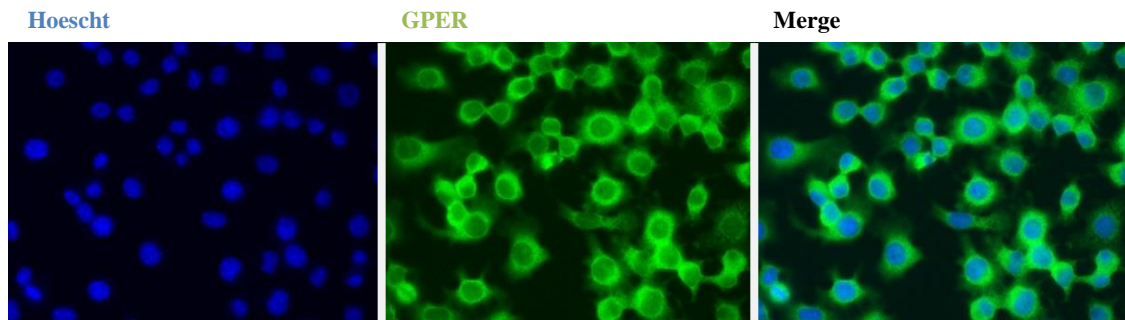


Figura 11 - Expressão do GPER pela linha celular de microglia N9. Imagem representativa de uma imunocitoquímica contra o GPER em células controlo (CTR) e células tratadas com 0,1µg/ml de LPS, na ausência de permeabilização. Todas as células em cultura apresentaram marcação para GPER (verde). Os núcleos foram corados com Hoescht (azul). A imagem foi adquirida num microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x.

5.2. A ativação do seletiva do GPER impede a produção de NO pela microglia estimulada com LPS

Sabe-se que os estrogénios conseguem diminuir a produção de NO pela microglia activada (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001). Para verificarmos se o GPER poderia mediar este efeito, as células microgliais N9 foram estimuladas com LPS durante 24h (0,1µg/ml), na presença de um agonista (G1) do GPER ou um antagonista (G15) seletivo do recetor, conjuntamente com E₂ ou apenas com meio de cultura RPMI (controlo). O NO libertado para o meio foi quantificado. Os dados obtidos mostram que o LPS induziu um aumento significativo de 40% na produção de NO, quando comparado com o controlo, e que na presença de G1 o LPS foi incapaz de promover um aumento nos níveis de NO. O E₂ inibiu a produção de NO, mas não de forma significativa. Quando o E₂ foi incubado juntamente com G15, houve uma reversão da inibição induzida pelo G1. Num estado basal, tanto o G1, como o E₂ diminuíram significativamente a produção de NO pela microglia, cerca de 30% no caso do G1 e 25% no caso do E₂. Mas, quando as células foram incubadas com E₂ na presença de G15, tal não aconteceu (fig.13). Estes resultados demonstram que a ativação seletiva do GPER consegue diminuir a produção de NO pela microglia, quer no estado reativo, quer no estado basal.

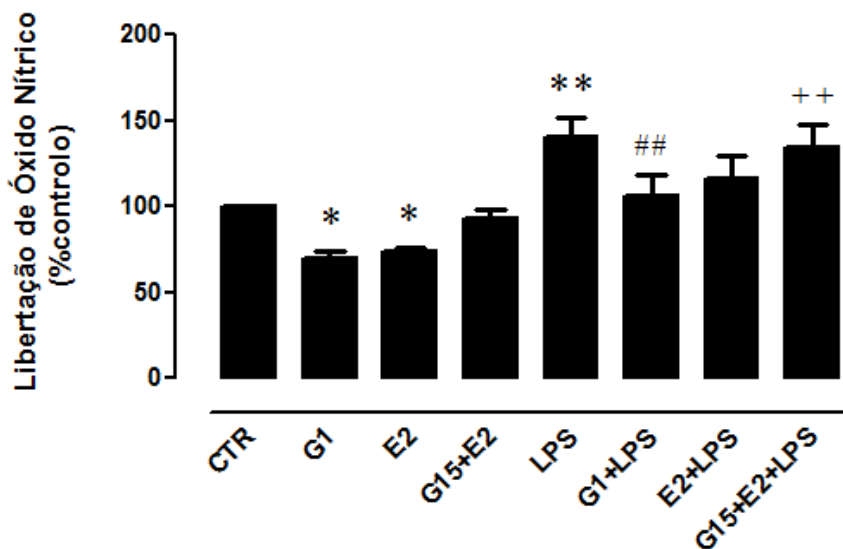
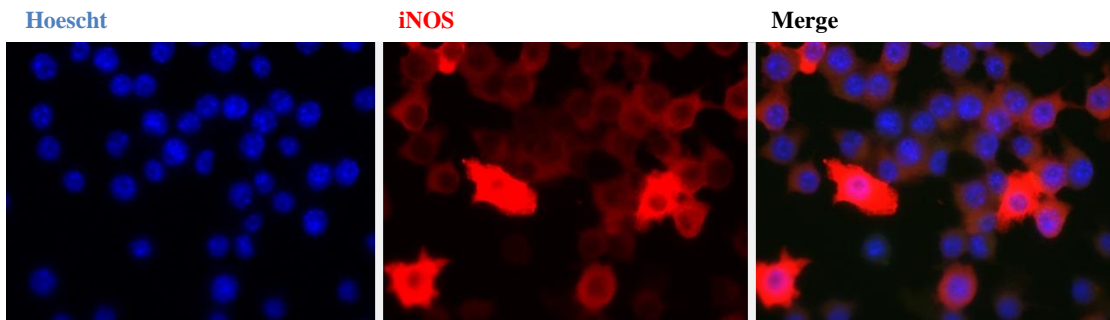


Figura 12 - Envolvimento do GPER na libertação NO pela microglia N9, após estimulação com LPS. As células foram incubadas durante 24h com 0,1µg/ml de LPS, na presença de G1, E₂ e G15 + E₂, a uma concentração de 100nM, ou apenas com meio de cultura RPMI (CTR). A libertação de NO pelas células microglias N9 foi quantificada pelo método de Griess. Cada barra representa a média ± SEM de pelo menos cinco experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem de controle. Análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (**p<0,01 comparado com o CTR; *p<0,05 comparado com o LPS sozinho ##p<0,01 comparado com o LPS sozinho e ++p<0,01 comparado com o G1+LPS).

5.3. A ativação do GPER diminui a expressão da iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais.

Como o GPER diminuiu a produção de NO pelas células microgliais N9, fomos verificar se tal se devia a algum efeito na expressão da iNOS. Para tal, as células foram então estimuladas com 0,1µg/ml de LPS durante 24h na presença de G1 (100nM) ou meio de cultura RPMI (controle). Utilizando imunocitoquímica para iNOS, foi possível quantificar por microscópio de fluorescência as células que expressaram iNOS (fig.13A). Verificou-se que num estado basal, havia apenas 1% de células a expressar iNOS, tanto no controle, como nas células expostas a G1. A estimulação com LPS promoveu um aumento de 96% no número de células a expressar iNOS, em comparação com o controle e a presença de G1 diminuiu este efeito em cerca de 26%. (fig.13B). Estes resultados sugerem que o GPER diminui a expressão de iNOS nas células microgliais, após estimulação com LPS.

(A)



(B)

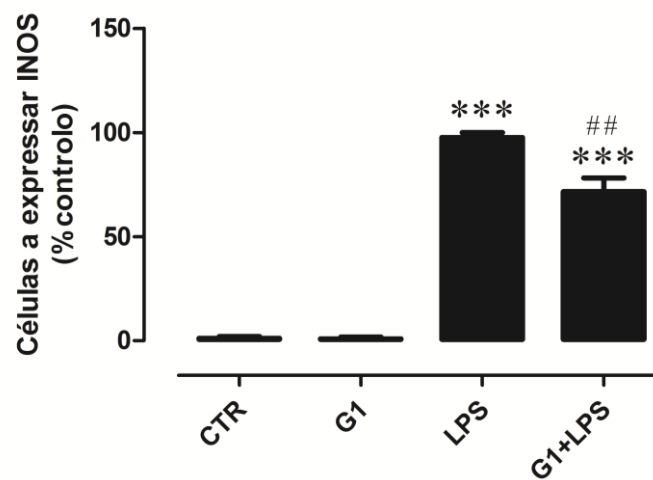


Figura 13 - Efeito do GPER na regulação da expressão de iNOS induzida pelo LPS nas células microgliais. Após incubação com LPS (0,1 μ /ml) durante 24h, na presença de G1 ou meio de cultura RPMI (CTR), avaliou-se a expressão da iNOS por imunocitoquímica na linha celular de microglia N9. (A) Imagem representativa da imunocitoquímica contra iNOS (vermelho), em que os núcleos foram maracados um Hoescht (azul). A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva 63x. (B) Quantificação da percentagem de células com marcação positiva para a iNOS. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem induzida pelo LPS. Análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (**p<0,001 comparado com o CTR e ##p<0,01 comparado com o LPS sozinho).

5.4. A atividade fagocítica na microglia estimulada com LPS é inibida pela ativação do GPER.

Além das ROS, os estrogénios também são relatados por controlar a atividade fagocítica das células microgliais (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001). Para averiguarmos se a ativação do GPER pode mediar este efeito, as células N9 foram estimuladas com 0,1µg/ml de LPS durante 24h na presença de G1 (100nM), G15 (100nM), E₂ (100nM) ou meio de cultura RPMI (controlo) e depois expostas a microsferas fluorescentes. As células que incorporaram estas microsferas foram consideradas fagocíticas (fig.14A). Verificou-se que a estimulação com LPS aumentou em 78% o número de células que incorporaram as esferas fluorescentes, quando comparado com o controlo, sendo este aumento totalmente inibido na presença de G1 e de E₂. Quando a cultura foi estimulada com E₂ na presença de G15, o antagonista do GPER, a inibição da fagocitose induzida pelo LPS já não se verificou, o que apoia a contribuição específica do GPER nesta inibição (fig.14B).

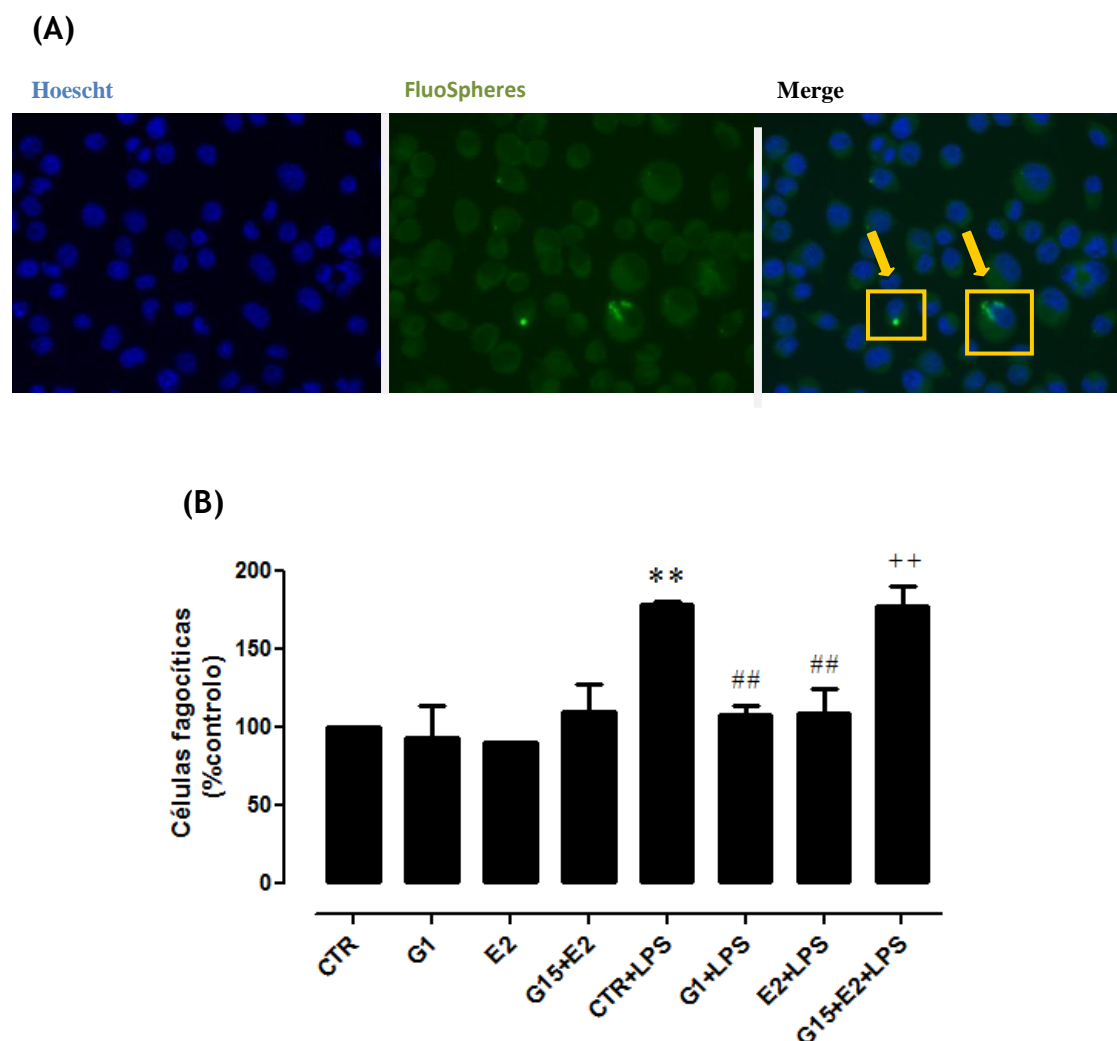


Figura 14 - Influência do GPER na atividade fagocítica da microglia N9, após estimulação com LPS (A). As células microgliais N9 foram estimuladas com 0,1µg/ml de LPS durante 24h, na presença de G1

(100nM), G15 (100nM), E₂ (100nM) ou meio de cultura RPMI (CTR) e depois foram expostas a microsferas fluorescentes. (A) Imagem fluorescente das células microgliais expostas a microsferas fluorescentes. As setas amarelas indicam as células que incorporaram as microsferas e que por isso são consideradas fagocíticas. A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x (B) Quantificação da percentagem de células fagocíticas para cada condição. Cada barra representa a média ± SEM de duas experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem de controlo. Análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni (**p<0,01 comparado com o CTR; ##p<0,01 comparado com o LPS sozinho e **p<0,01 comparado com o G1+LPS).

5.5. Efeito da ativação do GPER na libertação da IL-1β pela microglia estimulada com LPS.

Quando a microglia se encontra num estado ativado liberta várias citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1β podendo os estrogénios diminuir esta libertação (Blasko et al., 2009). Para esclarecer a possível contribuição do GPER neste efeito do estradiol, as células microgliais N9 foram estimuladas com LPS (0,1µg/ml) na presença de G1, E₂ ou G15 a uma concentração de 100nM, ou de meio de cultura RPMI (controlo). Após incubação com os diferentes agentes recolheram-se os sobrenadantes e quantificaram-se os níveis de IL-1β por ELISA. Verificou-se que num estado basal as células microgliais libertaram quantidades de IL-1β muito baixas (frequentemente abaixo dos limites de detecção do ensaio) e que a estimulação com LPS provocou um aumento significativo de aproximadamente 80%. Na presença de G1, há uma tendência de diminuição na libertação de IL-1β induzida pelo LPS em cerca de 22% e na presença de E₂ de 12%, no entanto estas alterações não são estatisticamente significativas. Por outro lado, na presença de G15, curiosamente observámos uma acentuada diminuição (60%) da IL-1β libertada por ação do LPS (fig.15).

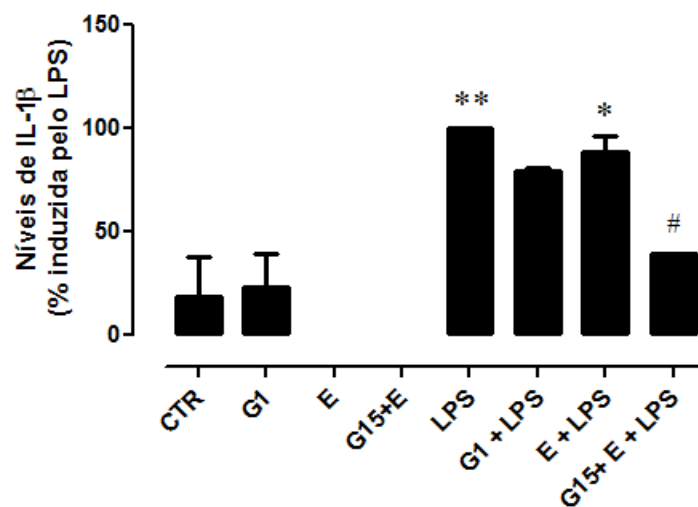


Figura 15 - Contribuição do GPER para a produção de IL-1β pela microglia estimulada com LPS. As células microgliais N9 foram estimuladas durante 24h com LPS (0,1µg/ml), na presença de G1 (100nM),

G15 (100nM), E₂ (100nM) ou meio de cultura RPMI (CTR), recolheram-se os sobrenadantes e quantificaram-se os níveis de IL-18 por ELISA. Cada barra representa a média ± SEM de duas experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem induzida pelo LPS. Análise estatística foi realizada como teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (**p<0,01 comparado com o CTR; *p<0,05 comparado com o LPS sozinho e #p<0,05 comparado com o LPS sozinho).

5.6. Os agonistas dos recetores GPER regulam a migração das células microgliais.

De modo a averiguarmos se o G1 afeta a migração das células microgliais, colocaram-se gotas de agarose no interior dos poços da placa de cultura. Em cada gota adicionou-se PBS (controlo), ou G1 (100nM), adicionou-se LPS (0,1µg/ml) ao meio de cultura e 24h depois contabilizaram-se as células microgliais N9 que penetraram no interior da gota de agarose. Verificou-se que quando o G1 estava presente na gota, houve mais 236% de microglia a penetrar a agarose num estado basal, em comparação com o controlo, e que quando a microglia foi estimulada com LPS, a quantidade de células que penetraram a agarose foi ainda maior, cerca de 542% superior ao controlo. Quando o LPS foi adicionado diretamente ao meio de cultura (sem o G1 estar presente na gota de agarose), provocou apenas um aumento de 161% na migração das células para o interior das gotas, em comparação com o controlo (fig.16). Estes resultados demonstram que o G1 medeia a migração de células microgliais num estado basal e mais ainda num estado de ativação induzido pelo LPS.

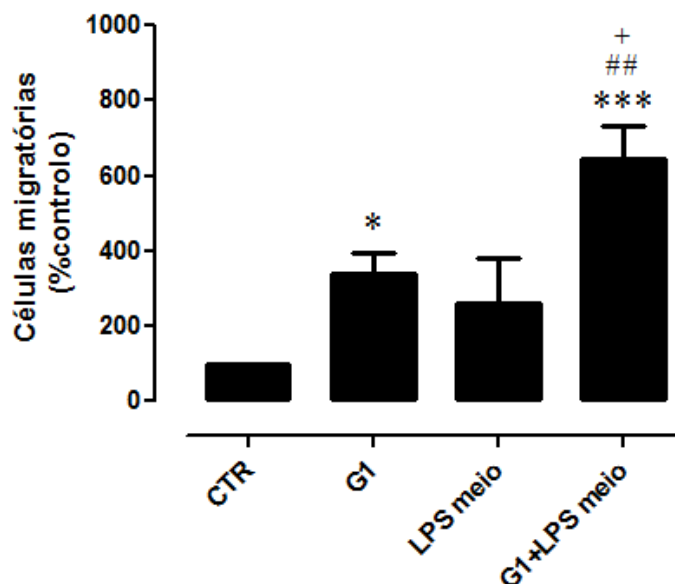


Figura 16 - Efeito do agonista GPER na migração das células microgliais. Colocaram-se gotas de agarose no interior dos poços da placa de cultura. Em cada gota adicionou-se PBS (CTR), ou G1 (100nM), adicionou-se LPS (0,1µg/ml) ao meio de cultura e 24h depois contabilizaram-se as células microgliais N9

que penetraram no interior da gota de agarose. Cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem induzida pelo LPS. Análise estatística foi realizada com o teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni (**p<0,001 comparado com o CTR; ##p<0,01 comparado com o LPS sozinho,*p<0,05 comparado com o CTR e †p<0,05 comparado com o G1 sozinho)

Capítulo 6

Discussão

6. Discussão

6.1. Influência da presença de neurónios no controlo da reatividade microglial exercido por astrócitos.

Existem várias evidências que demonstram a capacidade dos astrócitos em reduzir os efeitos potencialmente nocivos da microglia. Eles conseguem prevenir uma ativação excessiva das células microgliais, diminuindo vários parâmetros da reatividade microglial, nomeadamente a produção de NO e a atividade fagocítica (Lynch, 2009; Rocha et al., 2012). No entanto, a microglia e os astrócitos não estão sozinhos e outros tipos celulares podem interferir com o controlo da inflamação por parte dos astrócitos. No presente estudo, através da pré-incubação de culturas primárias de microglia do MV com os meios condicionados que recolhemos de culturas mistas de astrócitos e neurónios, com os neurónios dopaminérgicos lesados por exposição à toxina MPP⁺ (MC-MPP⁺) ou não (MC-CTR), verificámos que a presença de neurónios não influenciou a inibição da atividade fagocítica exercida pelos astrócitos nas células microgliais estimuladas com LPS. No entanto, o mesmo não aconteceu relativamente a produção de NO. Quando as células foram pré-incubadas com MC-A houve inibição da produção de NO pela microglia estimulada com LPS, contudo, quanto foram pré-incubadas com MC-MPP⁺ e MC-CTR este efeito já não foi observado. Estes resultados comprovam que os astrócitos conseguem inibir a libertação de NO pela microglia e demonstram que a presença de neurónios (independentemente da lesão), ou dos fatores solúveis por eles libertados, revertem esta inibição. Utilizando culturas primárias de microglia do córtex, verificamos que este efeito não é específico da microglia do MV, uma vez que os efeitos dos meios condicionados na produção de NO pela microglia do córtex estimulada com LPS foram semelhantes. No entanto as células microgliais do córtex foram menos responsivas ao LPS, possivelmente por se encontrarem já num estado mais ativado que a microglia do MV. O facto dos MC-MPP⁺ e o MC-A levarem a uma diminuição da produção de NO nas células microgliais sem a estimulação com LPS, apontam para alguma reatividade destas células já num estado basal.

Em condições fisiológicas normais a iNOS é minimamente expressa no cérebro, no entanto em situações patológicas, a sua expressão é aumentada nas células microgliais (Liberatore et al., 1999). Os nossos resultados estão de acordo com o referido uma vez que num estado basal não se detetou expressão da iNOS nas células microgliais do MV e a estimulação com LPS induziu a expressão desta enzima. Já se tinha verificado anteriormente que o MC-A conseguia

diminuir a expressão da iNOS pelas células microglias estimuladas com LPS (Lynch, 2009) e foi confirmado no presente trabalho. Uma vez que há uma diminuição na expressão da iNOS pelas células microgliais, espera-se uma diminuição na produção de NO, tal como se constatou quando as células foram pré-incubadas com MC-A. A pré-incubação da microglia com os MC-CTR e MC-MPP⁺ também levou a uma diminuição significativa na expressão da iNOS induzida pelo LPS, no entanto, como descrito anteriormente não verificamos uma diminuição da produção de NO nestas condições. Uma vez que determinámos apenas a expressão e não a atividade da enzima, não podemos excluir que embora a iNOS seja menos expressa possa compensar este efeito ao apresentar uma maior atividade. Além disso, o NO é produzido através de uma reação catalisada pela enzima NADPH-oxidase num mecanismo dependente da NOS e como tal, a produção de NO depende também da atividade e da expressão da NADPH-oxidase na microglia. Podemos propor que fatores libertados pelos neurónios promovam uma maior atividade da iNOS ou afetem a atividade da NADPH-oxidase promovendo uma maior libertação de NO.

Fomos também averiguar se os meios condicionados poderiam ter algum efeito ao nível da libertação de IL-1 β pelas células microgliais do MV estimuladas com LPS. Sabe-se que quando a microglia é ativada em resposta ao LPS aumenta a produção de várias citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , tanto *in vitro* (Dutta et al., 2008; Olson and Miller, 2004; Zheng et al., 2012), como *in vivo* (Dutta et al., 2008). No entanto, nas condições usadas quando a cultura de microglia do MV foi estimulada com LPS, não observámos aumentos significativos da libertação de IL-1 β . Além disso, detetou-se um aumento nos níveis desta citocina pró-inflamatória quando as células foram pré-incubadas com MC-A. Como o MC-A consegue reduzir vários parâmetros da reatividade microglial (Lynch, 2009; Rocha et al., 2012), esperávamos observar uma diminuição neste caso e não um aumento. No entanto, os resultados obtidos foram muito variáveis, possivelmente devido à sensibilidade do método utilizado e também a baixas concentrações desta citocina pró-inflamatória nos sobrenadantes recolhidos. Para se tirarem conclusões seria necessário aumentar o número de experiências e provavelmente a densidade celular para se obter um melhor sinal para a IL-1 β .

O trabalho anterior do nosso grupo mostrou que os astrócitos conseguem prevenir a reatividade microglial devido à libertação de GDNF (Rocha et al., 2012). Verificou-se que os níveis de GDNF presentes nos meios condicionados recolhidos das culturas mistas de neurónios e astrócitos (MC-CTR e MC-MPP⁺) se encontravam diminuídos em comparação com o MC-A. Já foi demonstrado que o MC-A consegue diminuir a libertação de NO pela microglia estimulada com LPS, mas o mesmo não se verificou para o MC-CTR e o MC-MPP⁺. Como o GDNF possui a capacidade de suprimir a produção de NO induzido pelo LPS nas células microgliais (Xing et al., 2010), os níveis de GDNF no MC-CTR e MC-MPP⁺ podem ser insuficientes para manter a inibição da produção de NO na microglia após estimulação com LPS.

Em conjunto estes resultados sugerem que a fagocitose e a expressão de iNOS são reguladas de forma semelhante por mediadores libertados por astrócitos e neurónios, enquanto a produção de NO parece diferencialmente regulada pelos mediadores neuronais e astrocitários (sendo favorecida pelos mediadores libertados por neurónios (lesados ou não) e inibida pelos mediadores libertados por astrócitos).

6.2. Papel do GPER no controlo da reatividade microglial exercido pelo estradiol.

Estudos *in vitro* (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001) e *in vivo* (Vegeto et al., 2006) demonstram a capacidade dos estrogénios em atenuar a ativação microglial. Como os recetores clássicos nucleares, ER α e ER β , eram expressos na microglia, pensava-se que os estrogénios exerciam efeitos anti-inflamatórios através destes recetores (Blasko et al., 2009; Vegeto et al., 2001). No entanto, recentemente identificou-se um novo recetor de estrogénios, o GPER. A sua expressão já foi demonstrada em macrófagos humanos e de rato, bem como em culturas primárias de microglia de rato (Blasko et al., 2009). No nosso estudo demonstramos que é expresso também na linha celular de microglia N9. Utilizando esta cultura celular, um agonista e um antagonista seletivo para o GPER, verificamos que a ativação do GPER consegue inibir a produção de NO e a atividade fagocítica induzidas pelo LPS na microglia. Vários estudos demonstraram a capacidade do E₂ em diminuir a atividade fagocítica e a produção de NO induzidas pelo LPS em células microgliais (Bruce-Keller et al., 2000; Vegeto et al., 2001), agora sabemos que estes efeitos do E₂ podem ser mediados pela ativação do GPER. Observamos ainda que a ativação do GPER num estado basal também provoca diminuições na libertação de NO pela microglia.

Uma vez que o GPER conseguiu inibir a produção de NO induzida pelo LPS na microglia, fomos averiguar se tal se devia a uma diminuição da iNOS induzida pela ativação do GPER. Verificamos que realmente a expressão da iNOS induzida pelo LPS sofre uma diminuição significativa com a ativação do GPER. Este resultado vai de encontro ao que foi demonstrado noutros estudos, onde o E₂ conseguiu diminuir a expressão da iNOS induzida pelo LPS em células microgliais N9 (Bruce-Keller et al., 2000) e culturas primárias de microglia de rato (Vegeto et al., 2001), o que comprova que este efeito do E₂ pode ser mediado pela ativação do GPER.

Relativamente a produção de IL-1 β pelas células microgliais N9 estimuladas com LPS, verificamos que a ativação do GPER diminui, embora de forma não significativa, a produção desta citocina pró-inflamatória induzida pelo LPS, o que está de acordo com a capacidade do GPER inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e a IL-6 em macrófagos primários humanos e numa linha celular de macrófagos de rato (Blasko et al., 2009).

Curiosamente verificámos que a presença do antagonista do GPER diminuiu significativamente a produção de IL-1 β . Uma vez que o E₂ também não conseguiu diminuir a produção desta citocina pró-inflamatória nas células estimuladas com LPS com a informação atualmente disponível este resultado não parece fazer sentido. Uma vez que estes resultados dizem respeito apenas a duas experiências, um aumento no número de experiências parece essencial para se poderem tirar conclusões.

Quando avaliámos o efeito do GPER na migração das células microgliais, verificámos que havia uma predisposição para o aumento da migração quando o G1 se encontrava presente. Vários estudos demonstram que a ativação do GPER consegue induzir a migração em vários tipos de células cancerígenas (Pandey et al., 2009; Tsai et al., 2013; Yan et al., 2013) e de acordo com os nossos resultados possivelmente também medeia a migração de células microgliais. A presença de G1 no interior das bolhas de agarose levou a uma maior tendência das células microgliais em penetrar a agarose e frequentemente a migrarem mais para o interior da bolha. Verificámos também que num estado reativo, o número de células a penetrar a agarose era ainda maior. Possivelmente, quando as células microgliais entraram em contacto com a bolha de agarose contendo o G1, o GPER ficou ativado e por isso as células penetraram e migravam mais na gota de agarose. Este resultado apoia a hipótese de que a ativação do GPER pode induzir migração nas células microgliais, principalmente quando estas estão mais reativas.

Em conjunto estes resultados mostram que a ativação dos recetores GPER pelo estradiol contribui para a diminuição da reatividade microglial (produção de NO, expressão de iNOS, fagocitose e produção de IL-1 β), parecendo no entanto favorecer a migração microglial.

Capítulo 7

Conclusões e Perspetivas Futuras

7. Conclusões e Perspetivas Futuras

1) A presença de neurónios, independentemente da lesão, reverte a inibição da produção de NO exercida pelos astrócitos na microglia estimulada com LPS. Os neurónios parecem de algum modo levar à diminuição da produção de GDNF pelos astrócitos, que assim deixam de conseguir inibir a produção de NO pela microglia ativada. Numa próxima tarefa os meios condicionados das culturas mistas poderiam suplementar-se com concentrações crescentes de GDNF. Assim seria possível verificar se o aumento de GDNF resultava numa inibição da produção de NO por parte destes meios condicionados.

Como a presença de neurónios no condicionamento não reverte a diminuição da expressão de iNOS exercida pelos astrócitos, isto poderá querer dizer que há um aumento na atividade desta enzima ou da NADPH oxidase. Seria por isso interessante estudar a atividade destas duas enzimas, bem como a expressão da NADPH oxidase. Como a NADPH oxidase além de se encontrar envolvida na produção de NO, também é responsável pela produção de ROS, seria pertinente verificar se a presença de neurónios também reverte a inibição da produção de ROS exercida pelos astrócitos na microglia ativada. Se tal se verificar poderá querer dizer que os neurónios indiretamente podem contribuir para o stress oxidativo resultante da reatividade microglial.

Relativamente à produção de IL-1 β deveria aumentar-se o número de experiências, de modo a verificar se nas condições utilizadas há, ou não, libertação de quantidades mensuráveis desta citocina. Além disso, poderia averiguar-se o efeito dos meios condicionados de culturas mistas na produção de outras citocinas pró-inflamatórias, libertadas pela microglia ativada, como o TNF- α .

2) A ativação seletiva do GPER reduz significativamente vários parâmetros de reatividade microglial, nomeadamente a atividade fagocítica, a produção de NO e a expressão de iNOS e além disso promove a migração das células microgliais. Estes resultados sugerem que o GPER pode ser um importante alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias, especialmente nos homens, nos quais a terapia com estrogénio não é viável. Se por um lado, a ativação seletiva do GPER pode levar a uma diminuição da reatividade microglial, por outro, a inibição seletiva deste recetor, pode impedir a migração da microglia para o local de lesão, onde iria exercer ou potenciar os danos neuronais.

Nas próximas tarefas, para se confirmar que a ativação do GPER leva a uma diminuição na expressão da iNOS deveria efetuar-se uma quantificação proteica por western blot. Além

disso poderia avaliar-se o efeito da ativação do GPER também na expressão da NADPH-oxidase, uma vez que tanto esta enzima como a iNOS são as principais responsáveis pelo stress oxidativo resultante da reatividade microglial.

Seria também pertinente verificar a expressão e a atividade das metaloproteinases de matriz quando há ativação do GPER nas células microgliais, de modo a confirmar o efeito potenciador da ativação seletiva do GPER na migração da microglia.

Relativamente a IL-1 β seria necessário um aumento do número de experiências para esclarecer qual o efeito da ativação do GPER na produção desta citocina. Averiguar o efeito da ativação do GPER na produção de TNF- α também poderia ser uma mais-valia para confirmar se a ativação do GPER leva a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias, tal como já foi relatado.

Por fim, verificar se na presença de neurónios e astrócitos a ativação seletiva do GPER continua a diminuir significativamente a reatividade microglial. Caso se verifique que sim, comprovar este efeito num sistema *in vivo*.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

Airaksinen, M. S. and Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-94.

Almey, A., Filardo, E. J., Milner, T. A. and Brake, W. G. (2012). Estrogen receptors are found in glia and at extranuclear neuronal sites in the dorsal striatum of female rats: evidence for cholinergic but not dopaminergic colocalization. *Endocrinology* 153, 5373-83.

Amor, S., Puentes, F., Baker, D. and van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129, 154-69.

Appel, E., Kolman, O., Kazimirsky, G., Blumberg, P. M. and Brodie, C. (1997). Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. *Neuroreport* 8, 3309-12.

Arevalo, M. A., Santos-Galindo, M., Bellini, M. J., Azcoitia, I. and Garcia-Segura, L. M. (2010). Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 1800, 1106-12.

Batchelor, P. E., Liberatore, G. T., Wong, J. Y., Porritt, M. J., Frerichs, F., Donnan, G. A. and Howells, D. W. (1999). Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19, 1708-16.

Blasko, E., Haskell, C. A., Leung, S., Gualtieri, G., Halks-Miller, M., Mahmoudi, M., Dennis, M. K., Prossnitz, E. R., Karpus, W. J. and Horuk, R. (2009). Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 214, 67-77.

Block, M. L. and Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76, 77-98.

Block, M. L., Zecca, L. and Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69.

Bove, J., Prou, D., Perier, C. and Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2, 484-94.

Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R. and Dun, N. J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol* 193, 311-21.

Bruce-Keller, A. J., Keeling, J. L., Keller, J. N., Huang, F. F., Camondola, S. and Mattson, M. P. (2000). Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141, 3646-56.

Buffo, A., Rolando, C. and Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol* 79, 77-89.

Colton, C. A. and Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223, 284-8.

- Dexter, D. T. and Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*.
- Doorn, K. J., Lucassen, P. J., Boddeke, H. W., Prins, M., Berendse, H. W., Drukarch, B. and van Dam, A. M. (2012). Emerging roles of microglial activation and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 98, 222-38.
- Dutta, G., Zhang, P. and Liu, B. (2008). The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 453-64.
- Eggert, K., Schlegel, J., Oertel, W., Wurz, C., Krieg, J. C. and Vedder, H. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine toxicity in vitro. *Neurosci Lett* 269, 178-82.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. and Frackelton, A. R., Jr. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-60.
- Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M. M. and Mizukami, Y. (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 904-10.
- Gao, H. M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J. S. and Liu, B. (2002). Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81, 1285-97.
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W. and Hong, J. S. (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.
- Garcia-Ovejero, D., Azcoitia, I., DonCarlos, L. L., Melcangi, R. C. and Garcia-Segura, L. M. (2005). Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 273-86.
- Garcia-Ovejero, D., Veiga, S., Garcia-Segura, L. M. and DonCarlos, L. L. (2002). Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol* 450, 256-71.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B. and Brooks, D. J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21, 404-12.
- Gibbons, H. M. and Dragunow, M. (2006). Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res* 1084, 1-15.
- Halliday, G. M. and Stevens, C. H. (2011). Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26, 6-17.
- Hansson, E. and Ronnback, L. (1995). Astrocytes in glutamate neurotransmission. *FASEB J* 9, 343-50.
- Hirsch, E. C. and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8, 382-97.

- Honda, S., Nakajima, K., Nakamura, Y., Imai, Y. and Kohsaka, S. (1999). Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors. *Neurosci Lett* 275, 203-6.
- Hunter, R. L., Cheng, B., Choi, D. Y., Liu, M., Liu, S., Cass, W. A. and Bing, G. (2009). Intrastratial lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res* 87, 1913-21.
- Hurley, L. L. and Tizabi, Y. (2013). Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotox Res* 23, 131-44.
- Hwang, O. (2013). Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 22, 11-7.
- Kim, W. G., Mohney, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B. and Hong, J. S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20, 6309-16.
- Kim YS, K. S., Cho JJ, Choi DH, Hwang O, Shin DH, Chun HS, Beal MF, Joh TH. (2005a). Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci*.
- Kim YS, K. S., Cho JJ, Choi DH, Hwang O, Shin DH, Chun HS, Beal MF, Joh TH. (2005b). Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci*.
- Knott, C., Stern, G. and Wilkin, G. P. (2000). Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 16, 724-39.
- Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., McAuliffe, W. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5, 1403-9.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-2.
- Liu, M. and Bing, G. (2011). Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011, 327089.
- Lynch, M. A. (2009). The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol* 40, 139-56.
- McGeer, P. L., Schwab, C., Parent, A. and Doudet, D. (2003). Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol* 54, 599-604.
- Min, K. J., Yang, M. S., Kim, S. U., Jou, I. and Joe, E. H. (2006). Astrocytes induce hemoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci* 26, 1880-7.
- Morgan, S. C., Taylor, D. L. and Pocock, J. M. (2004). Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem* 90, 89-101.
- Muangpaisan, W., Mathews, A., Hori, H. and Seidel, D. (2011). A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. *J Med Assoc Thai* 94, 749-55.

Nagatsu, T. and Sawada, M. (2007). Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J Neural Transm Suppl*, 113-20.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-8.

Olson, J. K. and Miller, S. D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-24.

Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T. and Torizuka, T. (2005). Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57, 168-75.

Pandey, D. P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M. and Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J* 28, 523-32.

Perea, G., Navarrete, M. and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32, 421-31.

Poteryaev, D., Titievsky, A., Sun, Y. F., Thomas-Crusells, J., Lindahl, M., Billaud, M., Arumae, U. and Saarma, M. (1999). GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS Lett* 463, 63-6.

Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J. and Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453-62.

Ramaswamy, S., Soderstrom, K. E. and Kordower, J. H. (2009). Trophic factors therapy in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 175, 201-16.

Rettberg, J. R., Yao, J. and Brinton, R. D. (2013). Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Front Neuroendocrinol*.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. and Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-30.

Rocha, S. M., Cristovao, A. C., Campos, F. L., Fonseca, C. P. and Baltazar, G. (2012). Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiol Dis* 47, 407-15.

Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R. and Peterson, P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 942-64, table of contents.

Salat, D. and Tolosa, E. (2013). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments. *J Parkinsons Dis* 3, 255-69.

Samii, A., Nutt, J. G. and Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783-93.

Schapira, A. H. and Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26, 1049-55.

Sofroniew, M. V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11, 400-7.

- Srivastava, D. P. and Evans, P. D. (2013). GPER 1: trials and tribulations of a Membrane Oestrogen Receptor. *J Neuroendocrinol*.
- Streit, W. J., Walter, S. A. and Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57, 563-81.
- Sun, X., Xiong, Z., Zhang, Y., Meng, Y., Xu, G., Xia, Z., Li, J., Zhang, R., Ke, Z. and Hu, Y. (2012). Harpagoside attenuates MPTP/MPP(+) induced dopaminergic neurodegeneration and movement disorder via elevating glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 120, 1072-83.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-32.
- Tsai, C. L., Wu, H. M., Lin, C. Y., Lin, Y. J., Chao, A., Wang, T. H., Hsueh, S., Lai, C. H. and Wang, H. S. (2013). Estradiol and Tamoxifen Induce Cell Migration through GPR30 and Activation of Focal Adhesion Kinase (FAK) in Endometrial Cancers with Low or without Nuclear Estrogen Receptor alpha (ERalpha). *PLoS One* 8, e72999.
- Tuszynski, M. H. and Gage, F. H. (1994). Neurotrophic factors and diseases of the nervous system. *Ann Neurol* 35 Suppl, S9-12.
- Vegeto, E., Belcredito, S., Ghisletti, S., Meda, C., Eteri, S. and Maggi, A. (2006). The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 147, 2263-72.
- Vegeto, E., Bonincontro, C., Pollio, G., Sala, A., Viappiani, S., Nardi, F., Brusadelli, A., Viviani, B., Ciana, P. and Maggi, A. (2001). Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 21, 1809-18.
- Vegeto, E., Pollio, G., Pellicciari, C. and Maggi, A. (1999). Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *FASEB J* 13, 793-803.
- Xing, B., Xin, T., Zhao, L., Hunter, R. L., Chen, Y. and Bing, G. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor protects midbrain dopaminergic neurons against lipopolysaccharide neurotoxicity. *J Neuroimmunol* 225, 43-51.
- Yan, Y., Liu, H., Wen, H., Jiang, X., Cao, X., Zhang, G. and Liu, G. (2013). The novel estrogen receptor GPER regulates the migration and invasion of ovarian cancer cells. *Mol Cell Biochem* 378, 1-7.
- Yates, M. A., Li, Y., Chlebeck, P. J. and Offner, H. (2010). GPR30, but not estrogen receptor-alpha, is crucial in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral ethinyl estradiol. *BMC Immunol* 11, 20.
- Yokoyama, H., Uchida, H., Kuroiwa, H., Kasahara, J. and Araki, T. (2011). Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Neurol Sci* 32, 1-7.
- Yu, H. and Neimat, J. S. (2008). The treatment of movement disorders by deep brain stimulation. *Neurotherapeutics* 5, 26-36.
- Zecca, L., Wilms, H., Geick, S., Claasen, J. H., Brandenburg, L. O., Holzknecht, C., Panizza, M. L., Zucca, F. A., Deuschl, G., Sievers, J. et al. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 116, 47-55.

Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H. and Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26, 578-80.

Zeevalk, G. D., Razmpour, R. and Bernard, L. P. (2008). Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother* 62, 236-49.

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. S., Wu, X., Block, M. L., Wilson, B., Zhou, Y., Hong, J. S. and Zhang, J. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19, 533-42.

Zheng, W., Zheng, X., Liu, S., Ouyang, H., Levitt, R. C., Candiotti, K. A. and Hao, S. (2012). TNFalpha and IL-1beta are mediated by both TLR4 and Nod1 pathways in the cultured HAPI cells stimulated by LPS. *Biochem Biophys Res Commun* 420, 762-7.