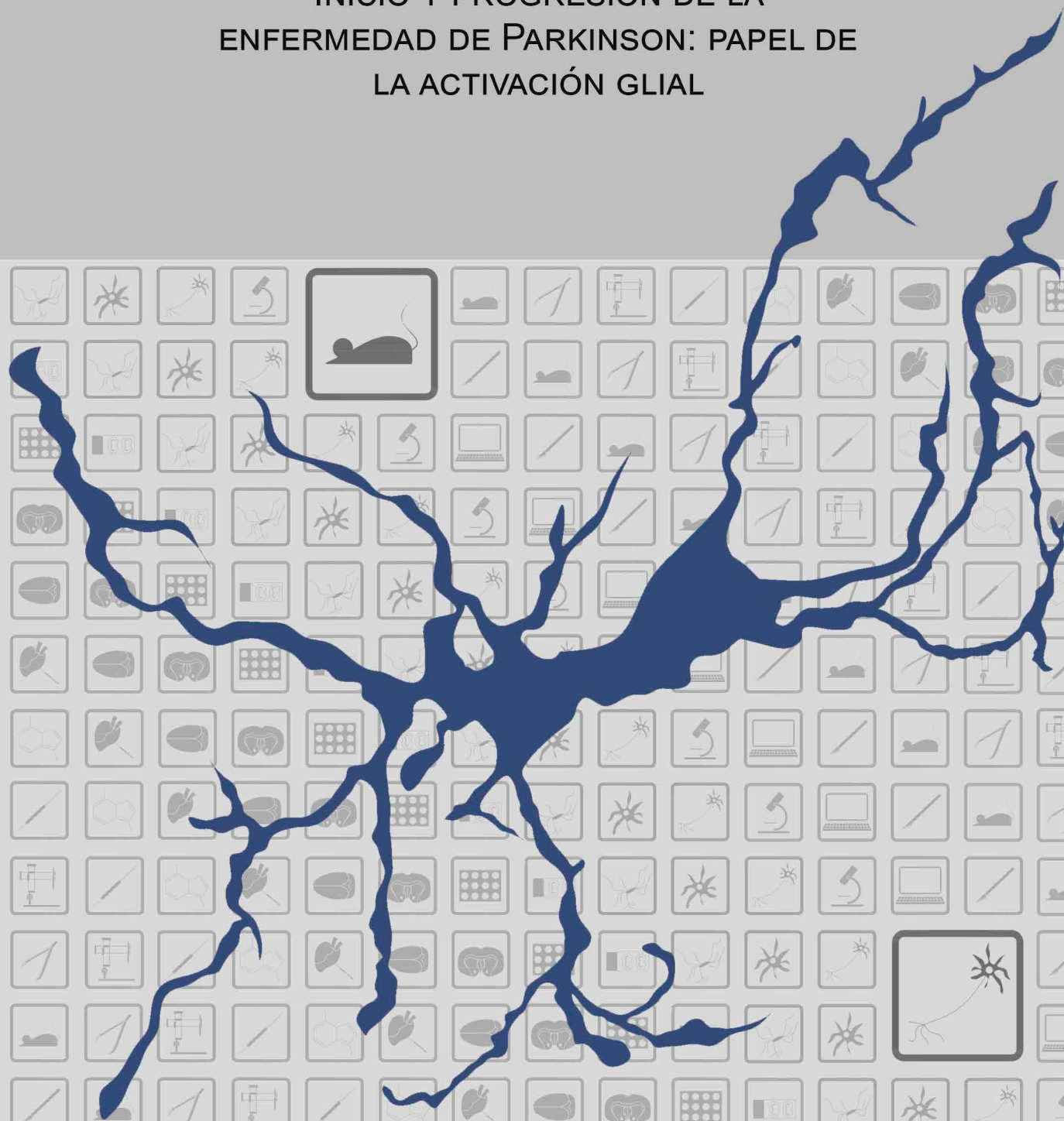


INICIO Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: PAPEL DE LA ACTIVACIÓN GLIAL



TATIANA RODRÍGUEZ CHINCHILLA

Año 2020

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Inicio y progresión de la enfermedad de Parkinson: papel de la activación glial

Tatiana Rodríguez Chinchilla

Directoras:

Dra. María Cruz Rodríguez Oroz

Dra. Ana Quiroga Varela

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Neurociencias
por la Universidad del País Vasco

Tesis doctoral

2020

A mi familia

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1.- La enfermedad de Parkinson.....	7
1.1.- Generalidades.....	7
1.2.- Características clínicas.....	8
1.2.1.- Aspectos motores	8
1.2.2.- Aspectos no motores.....	10
1.3.- Anatomía patológica.....	11
1.4.- Etiología.....	13
1.4.1.- Factores ambientales	13
1.4.2.- Factores genéticos.....	14
1.5.- Fisiopatología.....	16
1.5.1.- Neuroinflamación.....	17
2.- Las células gliales. Microglía y astrocitos.....	19
2.1.- Microglía.....	20
2.1.1.- Funciones de la microglía.....	22
2.1.1.1.- Supervivencia neuronal	22
2.1.1.2.- Muerte neuronal	23
2.1.1.3.- Formación, maduración y mantenimiento de las sinapsis	24
2.1.2.- Activación microglial: cambios morfológicos y químicos.....	25
2.1.2.1.- Polarización M1/M2.....	28
2.1.2.1.1.- Estado de activación M1	29
2.1.2.1.2.- Estado de activación M2	30
2.2.- Astrogliosis.....	32
2.2.1.- Tipos de astrocitos.....	33
2.2.2.- Funciones de los astrocitos	35
2.2.2.1.- Mantenimiento de la BHE.....	36
2.2.2.2.- Formación, maduración y mantenimiento de las sinapsis	37
2.2.2.3.- Modulación del glutamato.....	39
2.2.2.4.- Mantenimiento de la homeostasis iónica	40
2.2.2.5.- Soporte metabólico.....	42
2.2.3.- Astrogliosis.....	42
2.2.3.1.- Regulación de la astrogliosis.....	44
2.2.3.2.- Polarización A1/A2.....	45
2.2.3.2.1.- Estado de activación A1	45
2.2.3.2.2.- Estado de activación A2	46
3.- Neuroinflamación y neurodegeneración.....	47
3.1.- Neuroinflamación y enfermedad de Parkinson	51
3.1.1.- Microglía en la enfermedad de Parkinson.....	51
3.1.1.1.- Liberación de intermediarios inflamatorios	51
3.1.1.2.- Estudios genéticos.....	55
3.1.1.3.- Agregación de α -sin y microglía	56
3.1.2.- Astrocitos en la enfermedad de Parkinson.....	58

3.1.2.1.- Liberación de intermediarios inflamatorios	59
3.1.2.2.- Disfunciones de los astrocitos en la EP.....	62
3.1.2.3.- Agregación de α -sin y astrocitos	66
4.- Modelos animales en la enfermedad de Parkinson.....	70
4.1.- Modelos inducidos por neurotóxicos	70
4.1.1.- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).....	70
4.1.2.- 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	71
4.2.- Modelos de sobreexpresión de α -sin mediante vectores virales adeno-asociados (AAV)	73
5.- Tomografía por Emisión de Positrones.....	78
5.1.- PET y neuroinflamación.....	78
5.1.1.- Proteína translocadora.....	78
5.1.2.- Activación microglial <i>in vivo</i> y degeneración dopaminérgica en EP	80
5.1.2.1.- [18 F]-DPA-714.....	82
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	87
1.- Hipótesis.....	87
2.- Objetivos	88
MATERIAL Y MÉTODOS	91
1.- Animales.....	91
2.- Grupos experimentales	91
3.- Desarrollo del modelo animal	92
4.- Evaluación motora	93
5.- Evaluación <i>in vivo</i> mediante tomografía por emisión de positrones.....	93
5.1.- Radioquímica.....	93
5.2.- Escáner PET y adquisición de datos	93
5.3.- Análisis de imagen.....	94
6.- Procesamiento del tejido.....	95
7.- Estudios histológicos	96
7.1.- Tinción histológica.....	96
7.1.1.- Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa (TH), molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1 (Iba-1) y α -sinucleína humana ($h\alpha$ -sin)	96
7.1.2.- Inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y tinción de violeta de cresilo.....	97
7.1.3.- Inmunofluorescencia para Iba-1 y GFAP	97
8.- Análisis histológico	98
8.1.- Estimación del número de células inmunorreactivas para TH, Iba-1 y GFAP	98
8.2.- Caracterización morfológica de la microglía.....	99
8.3.- Cuantificación por densidad óptica de la expresión de terminales dopaminérgicos en el estriado (TH) y detección de $h\alpha$ -sin en la SNpc y estriado.....	100
8.4.- Extracción de ARN de tejido y PCR semicuantitativa en tiempo real (RT-PCR)....	100
9.- Análisis estadístico	101
RESULTADOS	105
1.- Evaluación del deterioro motor.....	105
2.- Evaluación de la degeneración dopaminérgica.....	106

2.1.- Sobreexpresión de hα-sin en la SNpc y el estriado.....	106
2.2.- Cuantificación de la pérdida dopaminérgica en la SNpc	108
2.3.- Cuantificación de la expresión de terminales TH+ en el estriado	109
3.- Modificaciones en el patrón microglial	110
3.1.- Cuantificación de células microgliales Iba-1+ en la SNpc	110
3.2.- Morfología de las células microgliales Iba-1+ en la SNpc	112
3.3.- Cuantificación de células microgliales Iba-1+ en el estriado.....	113
3.4.- Morfología de las células microgliales Iba-1+ en el estriado.....	115
4.- Modificaciones en el número de astrocitos	117
4.1.- Cuantificación de células astrocitarias GFAP+ en la SNpc.....	117
4.2.- Cuantificación de células astrocitarias GFAP+ en el estriado	118
5.- Evaluación <i>in vivo</i> de la activación microglial	119
5.1.- PET <i>in vivo</i> con [¹⁸ F]-DPA-714 en la SNpc y el estriado.....	119
6.- Análisis de la expresión de mediadores inflamatorios	121
7.- Análisis de correlaciones.....	121
DISCUSIÓN	127
1.- Modelo AAV-hα-sin y degeneración dopaminérgica	127
2.- Relación temporal entre la sobreexpresión de hα-sin, microglía y lesión dopaminérgica	128
2.1.- Sustancia negra.....	128
2.2.- Estriado.....	131
3.- Relación temporal entre la sobreexpresión de hα-sin, astrocitos y lesión dopaminérgica	132
3.1.- Sustancia negra.....	132
3.2.- Estriado.....	134
4.- Utilidad del PET con [¹⁸ F]-DPA-714 para detectar la activación glial <i>in vivo</i> en relación a la muerte dopaminérgica.....	136
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA	147

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AAV	Virus adeno-asociado
ABC	Complejo avidina-biotina-peroxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNF	Factor neurotrófico dependiente de actividad
AP	Anteroposterior
APC	Célula presentadoras de antígenos
APOE	Apolipoproteína E
AQP	Acuaporina
Arg	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Aβ	β -amiloide
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BP	Potencial de unión (<i>binding potential</i>)
Ca⁺⁺	Ion Calcio
CBA	β -actina de pollo
CD206	Receptor de manosa
CDNF	factor neurotrófico dopaminérgico cerebral
CL	Cuerpo de Lewy
Cl⁻	Ion Cloro
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CMV	Citomegalovirus
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
COX-2	Ciclooxigenasa 1 o 2
CR	Receptor del complemento
CT	Tomografía computarizada
CPu	Caudado-putamen
CX3CL1	Fractalquina
CX3CR1	Receptor de fractalquina
DA	Dopamina
DAérgica	Dopaminérgica
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAT	Transportador de dopamina
DAB	Tetrahydrocloruro de 3,3'-diaminobencidina
DOR	Densidad óptica relativa
dsADN	ADN bicatenario
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EM	Esclerosis múltiple

EP	Enfermedad de Parkinson
FBP	Proyección retrospectiva filtrada
Fizz1	molécula tipo resistina α 1
GBA	Glucocerebrosidasa
gc/ml	Copias de genoma por mililitro
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT-1/EAAT1/2	Transportador de glutamato 1
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
Gpx	Glutación peroxidasa
GS	Glutamina sintetasa
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
h	Hora
H⁺	Protón
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HLA	Sistema de antígeno leucocitario humano
hα-sin	α -sinucleína humana
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
Iba-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN-γ	Interferón γ
IGF-1	Factor de crecimiento de insulina tipo 1
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
iRBD	Trastorno del comportamiento del sueño REM
IRF	Factor regulador de interferón
K⁺	Ion potasio
KD	<i>Knock Down</i>
KO	<i>Knock Out</i>
L	Lateral
LB	Linfocito B
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolisacárido
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LT	Linfocito T
LTA	Ácido lipoteicoico
LV	Lentivirus
MANF	Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos
MAO-B	Monoamino oxidasa B
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MFB	Fascículo prosencefálico medial o haz nigroestriatal
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II

mHtt	Huntingtina mutada
miR	MicroARN
MPO	Mieloperoxidasa
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina
mSOD1	Superóxido dismutasa 1 mutada
NA	Noradrenalina
Na⁺	Ion Sodio
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NHS	Suero normal de caballo
NKκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor nuclear derivado de eritroides 2
p.i.	Post-inoculación
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PGK	Fosfoglicerato quinasa
rAAV	Vector viral adeno-asociado recombinante
REM	<i>Rapid eye movement</i>
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
s.c.	Subcutánea
s	Semana
SEM	Error estándar de la media
SLAM	Molécula de activación de señalización de linfocitos
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpc	Sustancia negra <i>pars compacta</i>
SOCS1	Supresor de liberación de la citoquina 1
SOD	Superóxido dismutasa
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SR	Receptor <i>scavenger</i>
ssARN	ARN monocatenario
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TH	Tirosina hidroxilasa
TLR	Receptor de tipo <i>Toll</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TSPO	Proteína translocadora
U	Unidad
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma
V	Ventral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
vGAT	Transportadores vesiculares de GABA
vGLUT	Transportadores vesiculares de glutamato
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas 2

VOI	Volumen de interés
VTA	Área tegmental ventral
WT	<i>Wild type</i>
YM1	Proteína 3 tipo quitinasa
α-sin	α -sinucleína



INTRODUCCIÓN

1.- LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.- Generalidades

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (EA). Presenta una prevalencia del 1% en la población superior a los 60 años y hasta un 3% en sujetos de 80 años o más. La incidencia de la EP es de 8 a 18 por 100.000 personas al año (Rodríguez-Oroz et al., 2009; Lee and Gilbert, 2016).

La primera descripción de la enfermedad fue realizada por James Parkinson en 1817 en su monografía titulada «*An essay on the shaking palsy*» (Parkinson, 1817). En dicho ensayo, el autor describe 6 pacientes que él mismo había observado por las calles de Londres y que presentaban temblor de reposo y alteraciones en la marcha. Parkinson, entre otros, también relató la tendencia a las caídas y alteraciones en el lenguaje.

Unos años más tarde, Trousseau contribuyó a cambiar el concepto de la EP describiendo clínicamente la enfermedad e incluyendo el concepto de rigidez al conjunto de signos observados por Parkinson. Además, atribuyó los defectos de la marcha a las alteraciones posturales (Trousseau, 1861). Charcot amplió más tarde esta descripción diferenciando el temblor parkinsoniano del temblor esencial, y describió los cambios mentales como signos propios de la enfermedad (Charcot, 1880; Charcot, 1892).

A partir de estas descripciones originales, el espectro clínico de la EP se ha enriquecido notablemente hasta la actualidad, ya que se reconocen, además de las motoras, numerosas manifestaciones no motoras (Postuma et al., 2015). Sin embargo, los signos motores cardinales descritos inicialmente persisten como base esencial del cuadro clínico y, de hecho, siguen siendo necesarios para su diagnóstico.

En relación a su etiopatogenia, en 1919, Tretiakoff descubrió la pérdida de células pigmentadas en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) del cerebro de pacientes con EP y reafirmó los hallazgos de Heinrich Lewy sobre los cuerpos de inclusión eosinófilos que había observado en el citoplasma de dichas células. Años

después, Hornykiewicz fue pionero en sugerir que en la EP tenía lugar una pérdida dopaminérgica estriatal (Holzer and Hornykiewicz, 1959), lo que llevó a ensayar el efecto de la administración del precursor de la dopamina (DA) L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA), convirtiéndose, hasta hoy día, en el tratamiento estándar para esta enfermedad (Laloux et al., 2017).

1.2.- Características clínicas

La EP se caracteriza clínicamente por la presencia de temblor de reposo, rigidez y acinesia (DeMaagd and Philip, 2015). Estas manifestaciones motoras, denominadas signos cardinales de la enfermedad, se presentan como consecuencia de la denervación dopaminérgica del estriado provocada por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y, en menor medida, del área tegmental ventral (VTA) mesencefálica. Esta denervación estriatal provoca una disminución en la concentración de DA, principalmente en la región dorsolateral y posterior del putamen, afectando así directamente a la subregión que participa en el circuito motor y que explica en gran medida el origen de los signos cardinales (Rodríguez-Oroz et al., 2009). Sin embargo, con la progresión de la enfermedad surgen otra serie de manifestaciones motoras, como el bloqueo de la marcha o el desequilibrio, y otras no motoras tales como alteraciones autonómicas, del sueño, y trastornos cognitivos (Rodríguez-Oroz et al., 2009; DeMaagd and Philip, 2015).

1.2.1.- Aspectos motores

La enfermedad presenta un inicio asimétrico, con signos unilaterales en una extremidad, expresándose como torpeza para los movimientos finos, arrastre de un pie al caminar, tensión o dolor, o temblor de reposo intermitente. Gradualmente, se va afectando la extremidad ipsilateral y, posteriormente, el hemicuerpo contralateral. Desde el inicio de la enfermedad, existe generalmente una afectación axial en forma de hipomimia facial, disminución del parpadeo o hipofonía (debilidad anormal del volumen o timbre de voz) (DeMaagd and Philip, 2015; Postuma et al., 2015).

El temblor de reposo es un signo inicial en aproximadamente un 70% de los pacientes. Suele afectar a una extremidad superior con predominio neto distal, por lo que se ha descrito fenomenológicamente como «contar monedas». También puede aparecer en el mentón o en las extremidades inferiores. Aumenta con las maniobras que exigen mayor concentración (contar, toma de decisiones) o con el estrés. Desaparece al inicio de un movimiento voluntario con la extremidad afecta y durante el sueño (Postuma et al., 2015).

La rigidez es una resistencia aumentada y constante a la movilización pasiva de la extremidad, que presenta aumentos y disminuciones regulares en su intensidad (Valls-Solé and Valldeoriola, 2002) y que se denomina «rigidez en rueda dentada». Esta rigidez aumenta o se induce por movimientos de otras partes del cuerpo (conocido como signo de Froment) o por otras maniobras como hablar o contar en silencio (Broussolle et al., 2007). Ambos grupos musculares flexores y extensores están implicados, pero los músculos flexores de las extremidades se ven más afectados. El aumento de la resistencia depende de la velocidad y es más notorio cuando la articulación examinada se estira lentamente.

Bajo el término acinesia se engloban la bradicinesia y la hipocinesia, que son los signos generalmente más incapacitantes de la EP. La bradicinesia es la lentificación de los movimientos voluntarios, incluyendo el inicio del mismo y su ejecución (Valls-Solé and Valldeoriola, 2002) y una reducción progresiva de su amplitud hasta el cese completo durante movimientos simples repetitivos. La realización de movimientos secuenciales o simultáneos se ve seriamente perturbada y frecuentemente obstaculizada (Rodríguez-Oroz et al., 2009). La hipocinesia consiste en una frecuencia y amplitud reducidas del movimiento espontáneo, que es particularmente notable en los movimientos automáticos. Las manifestaciones típicas son la reducción de la frecuencia de parpadeo y la expresión facial, la ausencia o reducción del braceo al caminar y la ausencia de movimientos asociados durante las actividades de la vida diaria (Rodríguez-Oroz et al., 2009). Los pacientes con EP tienen un aumento importante del tiempo de movimiento que afecta tanto a movimientos simples (movimiento balístico) como a movimientos complejos (secuenciales o simultáneos). El trastorno es mayor cuanto más complejo es el movimiento, ya que, además de existir un aumento en el

tiempo de ejecución de cada secuencia motora, también se encuentra incrementado el intervalo entre los movimientos. Así, estas anomalías están más acentuadas en el caso de que varios movimientos se hagan de forma paralela, donde la simultaneidad es prácticamente imposible, ya que han perdido este automatismo motor y, por tanto, realizan los movimientos de forma secuencial.

El último aspecto motor que destaca en estos pacientes es la alteración postural y de la marcha. Presentan una anteflexión del tronco y cuello junto con flexión de codos, rodillas y caderas. Caminan con pasos cortos, arrastrando los pies y con dificultad en la iniciación y giros («imantación»), siendo esta última una manifestación de estadios más avanzados de la enfermedad. Otros signos también frecuentes en la evolución de la enfermedad son la dificultad para deglutir el alimento (disfagia) y los trastornos del habla (disartria), que pueden llegar a ser muy incapacitantes.

1.2.2.- Aspectos no motores

Como se ha mencionado anteriormente, el cuadro clínico de la EP no solo se limita a los aspectos motores, sino que en los últimos años se han descrito un amplio abanico de aspectos no motores. Entre ellos, la disfunción autonómica (Crespo-Burillo and Alarcia-Alejos, 2015), el deterioro cognitivo y la demencia (Delgado-Alvarado et al., 2016), trastornos psiquiátricos como la depresión, la apatía y la ansiedad (Reijnders et al., 2008; Pagonabarraga et al., 2015), las alucinaciones (Frei and Truong, 2017), los trastornos del ciclo sueño-vigilia (Chahine et al., 2016) y los trastornos sensitivos (Patel et al., 2014) son los más comunes. Con excepción del deterioro cognitivo, la demencia y las alucinaciones, que acontecen en fases más avanzadas de la enfermedad, la EP presenta una fase prodrómica prolongada durante la cual pueden definirse algunos de estos síntomas no motores, que pueden preceder a los signos motores cardinales en años e incluso en décadas (Goldman and Postuma, 2014). En esta fase premotora, los pacientes pueden presentar alteraciones gastrointestinales (estreñimiento), así como alteraciones del sueño REM, apatía, fatiga y pérdida de olfacción (Braak et al.,

2003; Goldman and Postuma, 2014) y que se ha sugerido que podrían ser síntomas más precoces de la enfermedad (DeMaagd and Philip, 2015).

Aunque por lo general no se consideraban específicas de la enfermedad, dichas alteraciones no motoras han ido cobrando relevancia en las últimas décadas, tanto porque pueden ser marcadores prodrómicos de la enfermedad (Postuma and Berg, 2016), como porque se intensifican conforme esta progresa, contribuyendo directamente al deterioro de la calidad de vida de los pacientes con EP. De hecho, un 28% de los pacientes indicaron en un estudio que las alteraciones no motoras eran más incapacitantes que las motoras (Barone et al., 2009).

1.3.- Anatomía patológica

El marcador anatomopatológico que define la EP es la presencia de inclusiones citoplasmáticas esféricas, hialínicas y acidófilas, conocidos como cuerpos de Lewy (CL) y descritos por primera vez en 1912 por Foster y Lewy en el tronco cerebral (Lewy, 1912). Estas inclusiones están constituidas por una acumulación de proteínas con plegamiento patológico, que los sistemas celulares de degradación y reparación no consiguen eliminar. Están compuestos principalmente por las proteínas α -sinucleína (α -sin), ubiquitina y proteínas de neurofilamento (Spillantini et al., 1997; Irizarry et al., 1998) y poseen tres capas eosinófilas: un núcleo, un cuerpo y una aureola. Estos acúmulos aparecen principalmente en la SNpc y en el *locus coeruleus* aunque también se han observado en otras estructuras cerebrales como el núcleo basal de Meynert, hipotálamo, núcleos del rafe e incluso corteza motora, así como el sistema nervioso autónomo (Braak et al., 2003).

El estudio de la extensión de la patología tipo Lewy por diversas estructuras del cerebro dio lugar al sistema de estadiaje de Braak y colaboradores (Braak et al., 2003). En su trabajo, sugieren que la patología tipo Lewy comienza en el núcleo motor dorsal del vago y el bulbo olfatorio y va afectando progresivamente con la evolución de la enfermedad a otras áreas del tronco del encéfalo como la SNpc, marcando el inicio de la fase sintomática de la EP. Es una propagación caudo-

rostral, la cual finalmente afectaría a diversas áreas corticales. Posteriormente, se planteó si el proceso degenerativo podría comenzar fuera del sistema nervioso central (SNC), ya que se han encontrado inclusiones de α -sin en ganglios simpáticos y parasimpáticos, médula adrenal, tracto gastrointestinal y genitourinario y piel de pacientes con EP (Hishikawa et al., 2001; Braak et al., 2006, 2007). Estas observaciones han dado lugar a la «*dual hit hypothesis*», por la cual se especula que un patógeno desconocido entraría en el sistema nervioso a través del bulbo olfatorio o del plexo entérico y, de manera progresiva, se irían afectando estructuras centrales. Sobre esta línea de hipótesis, en los últimos años se especula con la posibilidad de que la α -sin patológica pueda transmitirse entre células tanto del sistema nervioso periférico (SNP) al central, como dentro del propio SNC. Una de las primeras observaciones que apoyaba esta hipótesis fue el hallazgo de inclusiones de α -sin en células mesencefálicas fetales que habían sido trasplantadas a pacientes con EP (Li et al., 2008). Más recientemente, varios estudios han demostrado que las fibrillas de α -sin recombinante son capaces de introducirse en neuronas en cultivo, de inducir la formación de agregados de α -sin y, finalmente, de provocar muerte neuronal (Wu et al., 2019). Además, la inoculación intraestriatal de fibrillas preformadas de α -sin en ratones *wild type* (WT) indujo la agregación de α -sin endógena en otras regiones como la SNpc y el córtex (Luk et al., 2012). Incluso se ha comprobado que inoculando extractos purificados de CL de pacientes con EP en la SN o el estriado de ratones y macacos, se inducía el acúmulo de α -sin patológica y la degeneración nigroestriatal (Recasens et al., 2014). Estas evidencias hacen que se haya hipotetizado sobre la posible transmisibilidad de la α -sin entre células.

Estos agregados proteicos no son exclusivos de la EP, pudiendo observarse en otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia por CL o la atrofia multisistema (Peelaerts et al., 2018); ni todos los pacientes con EP los presentan, ya que hay formas genéticas de EP en las que están ausentes (Schneider and Alcalay, 2017).

1.4- Etiología

A pesar del tiempo transcurrido desde la primera descripción de la EP, la etiología de la enfermedad sigue siendo desconocida en la mayoría de casos. En su etiopatogenia, se postula una compleja interacción entre factores ambientales presumiblemente tóxicos y factores genéticos en el contexto del envejecimiento. Solo una minoría de casos se debe a causas genéticas o medioambientales claramente definidas. En la mayoría de los casos se trataría de una interacción entre varios genes, el efecto modificador de alelos de susceptibilidad, la influencia de agentes medioambientales sobre la expresión de los genes y los cambios moleculares, estructurales, celulares y funcionales propios del envejecimiento (Kalinderi et al., 2016; Kim and Alcalay, 2017).

1.4.1.- Factores ambientales

Antes de la descripción de las primeras formas genéticas de EP, se consideraba que su etiología se relacionaba con alteraciones en la función mitocondrial primaria o secundaria a tóxicos ambientales. Estudios epidemiológicos asociaban una mayor incidencia de EP al ámbito rural y al uso de sustancias con acción sobre la cadena respiratoria mitocondrial o el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) presentes en pesticidas, herbicidas y algunos alimentos (Pang et al., 2019). Además, algunos agentes neurotóxicos exógenos como el monóxido de carbono o metales pesados se asociaban a la EP. Esto se vio reforzado tras observar que la exposición a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un neurotóxico que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, inducía la muerte de neuronas dopaminérgicas de la SNpc, remediando la sintomatología clínica de la EP (Langston and Ballard, 1984). Más tarde, se demostró que la exposición a otras sustancias químicas con capacidad similar para inhibir el complejo I mitocondrial (pesticidas como el paraquat o la rotenona), causaban también parkinsonismo. Estos tóxicos producen una alteración en el potencial de membrana mitocondrial y una disminución en la producción de adenosín trifosfato (ATP), lo que se asocia con un incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres citoplasmáticos

(Huang et al., 2016), que llevan a la muerte celular. La evidencia actual establece una asociación positiva entre la exposición a pesticidas y el riesgo de padecer EP, indicando que los factores ambientales juegan un papel relevante en casos de EP con inicio tardío (Kalia and Lang, 2015).

Aunque diversos estudios epidemiológicos han intentado detectar factores ambientales potencialmente de riesgo, a su vez, también han descubierto factores que podrían disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad, como son el consumo de tabaco y de café. Los mecanismos exactos detrás de estas asociaciones no se conocen, pero el café y el humo del cigarrillo contienen compuestos como la cafeína y la nicotina, respectivamente, posiblemente neuroprotectores. Estos compuestos se unen a los receptores de adenosina A, que serían los que median dichos efectos neuroprotectores (Scheperjans et al., 2015). Además, el tabaquismo y el consumo de café afectan la composición del microbioma intestinal, favoreciendo la proliferación de algunas bacterias como *Bifidobacterium*, con propiedades antiinflamatorias (Derkinderen et al., 2014).

1.4.2.- Factores genéticos

Un año después del descubrimiento del primer locus implicado en la EP (*PARK1*), se identificó, por el mismo equipo, el gen *SNCA* (Polymeropoulos et al., 1997), de herencia autosómica dominante y que codificaba para la proteína α -sin, que posteriormente se comprobó que era el componente mayoritario en los CL (Spillantini et al., 1998).

Las duplicaciones y triplicaciones de este gen son uno de los factores de riesgo más importantes en la EP familiar (Taguchi et al., 2017). Estas multiplicaciones se asocian con un parkinsonismo de inicio temprano que cursa con demencia precoz. La primera mutación en este gen que se asoció con la EP fue la A53T. Desde entonces, se han identificado otras mutaciones como la A30P, E46K, H50Q, G51D y A53E. Asimismo, estudios de asociación de todo el genoma (en inglés, *Genome-Wide Association Study*, GWAS) han demostrado que los

polimorfismos de un solo nucleótido en este gen también aumentan el riesgo de desarrollar EP esporádica (Koprach et al., 2017).

Posteriormente, se han identificado otros genes asociados a la EP (Sekiyama et al., 2014), por lo que el factor genético ha cobrado mayor relevancia, si bien representa una proporción minoritaria (<10%) de pacientes con EP.

Las formas genéticas dominantes más comunes de la EP comprenden mutaciones en el gen que codifica la proteína *Leucine-Rich Repeat Kinase 2* (LRRK2). *LRRK2* codifica una proteína quinasa grande y compleja que consta de múltiples dominios bien conservados. Está presente en gran parte en el citoplasma, pero también se asocia con la membrana externa mitocondrial. Se han sugerido múltiples funciones para LRRK2 (Esteves et al., 2014), que incluyen andamiaje de proteínas, unión a sustratos, fosforilación de proteínas (como la α -sin) y modulación de la autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Orenstein et al., 2013), mecanismo que puede causar la agregación de α -sin.

Han sido identificadas al menos 6 mutaciones patógenas de esta proteína (G2019S, R1441C/G/H, I2020T y Y1699C) (Zhao et al., 2018). Entre ellas, la más común es la G2019S, que se presenta tanto en formas familiares como esporádicas de la enfermedad. Los síntomas clínicos y la neuropatología de la EP asociada a mutaciones en *LRRK2* generalmente son indistinguibles de la EP idiopática, si bien los pacientes con mutaciones diferentes a G2019S (R144C, Y1699C, I2020T) pueden no tener patología con CL y, a veces, presentan ovillos neurofibrilares de tau (Bae and Lee, 2015). Estas mutaciones pueden llegar a representar hasta un 40% de los casos familiares de EP en ciertas regiones, como el País Vasco, en España (sustitución R1441G) (Ruiz-Martínez et al., 2010) y en torno a un 15% en algunas etnias, como los Judíos *Ashkenazis* (sustitución G2019S) (Lee et al., 2017). Los pacientes con mutaciones en este gen presentan una neuropatología de la enfermedad muy variable, aunque en todos ellos son observables los signos cardinales de la EP (Bouhouche et al., 2017).

Por otro lado, se han descrito varios genes de herencia autosómica recesiva implicados en la patogénesis de la enfermedad. Entre estos destacan: el gen *PARK2* o gen de la parkina, que codifica para una ubiquitin ligasa E3 que ubiquitina las

proteínas mitocondriales para ser degradadas por el sistema UPS en respuesta al daño mitocondrial (Foote and Statsyuk, 2018); *PINK1*, que codifica para una serina treonina quinasa que marca a la mitocondria para degradarla por mitofagia (Sen et al., 2015); y *PARK7*, que codifica para el oncogén DJ-1, una chaperona que actúa como sensor del estrés oxidativo (Biosa et al., 2017). Todos ellos producen casos de inicio precoz y herencia autosómica recesiva homocigota o heterocigota compuesta (Kasten et al., 2018), pero sin presencia de agregados de α -sin ni CL en el tejido *post mortem* en la mayoría de los casos. El fenotipo clínico observado con estas tres mutaciones es muy similar (Kalinderi et al., 2016; Kim and Alcalay, 2017).

Se ha descrito en los últimos años una gran prevalencia a nivel mundial de mutaciones en el gen que codifica la proteína glucocerebrosidasa (GBA) en pacientes con EP. En homocigosis, las mutaciones causan la enfermedad de Gaucher, pero los sujetos con un solo alelo afectado tienen un mayor riesgo (30% a la edad de 80 años) de desarrollar EP (O'Regan et al., 2017). A diferencia de otras formas genéticas de EP, las mutaciones de *GBA1* son relativamente comunes en la población general con una prevalencia que oscila entre el 2,3 y el 9,4% (Sidransky and Lopez, 2012).

1.5.- Fisiopatología

Los mecanismos de degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas no son bien conocidos. La evidencia acumulada hasta la actualidad sugiere que la etiología de la EP es probablemente una combinación de envejecimiento y de múltiples mecanismos patológicos subyacentes a la degeneración dopaminérgica. Estas afectan, fundamentalmente, aunque no de forma exclusiva, a la función mitocondrial, la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la degradación proteica por la vía del proteasoma y de la autofagia y, el más relevantes para esta tesis doctoral, la neuroinflamación (Figura 1), que se detallará en el siguiente apartado (Athauda and Foltynie, 2015).

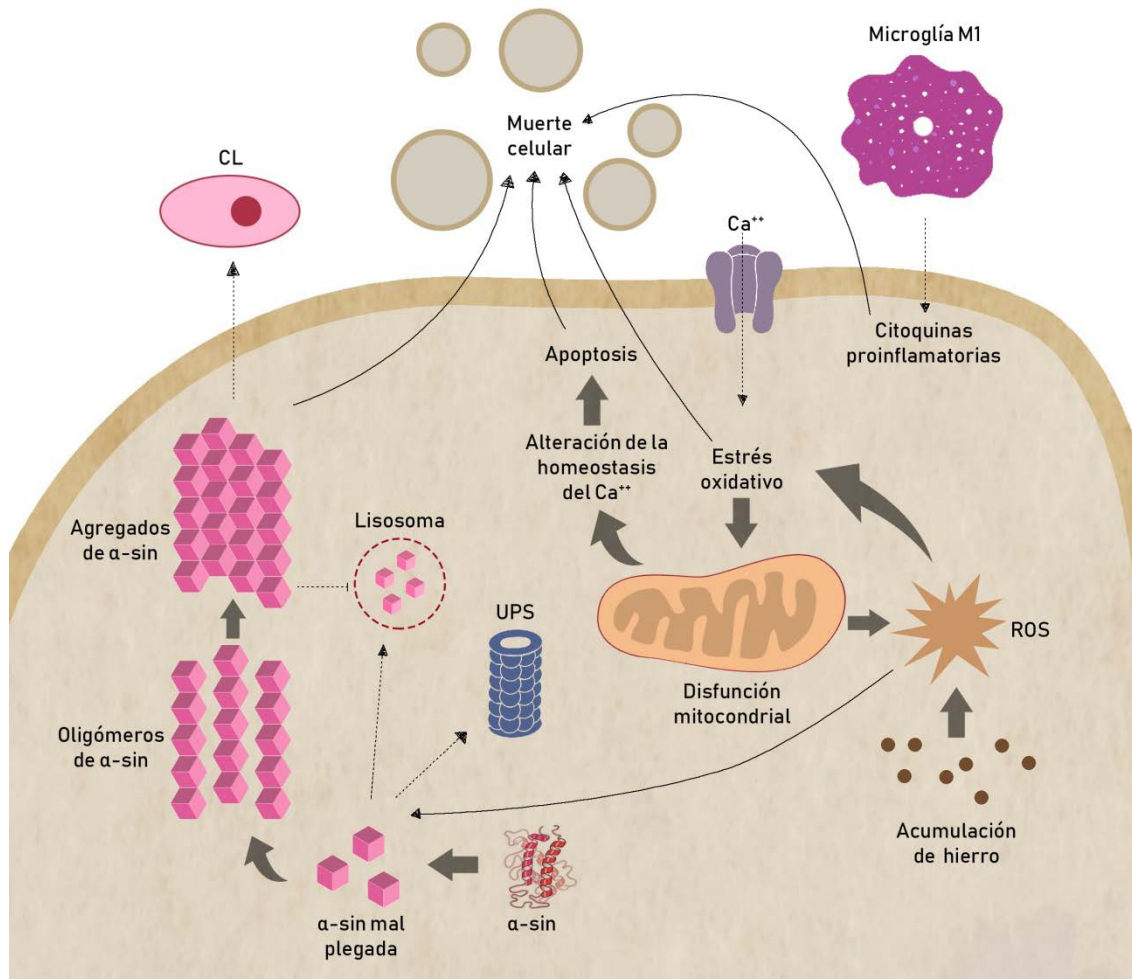


Fig. 1. Mecanismos patogénicos en la EP. Modificado de Athauda y Foltynie, 2015. **Ca⁺⁺**: Calcio; **CL**: cuerpo de Lewy; **UPS**: sistema ubiquitin-proteasoma; **ROS**: especies reactivas de oxígeno; **α-sin**: α-sinucleína.

1.5.1.- Neuroinflamación

Múltiples líneas de investigación sugieren que la inflamación puede contribuir a la degeneración de neuronas dopaminérgicas y a la progresión de la EP. Concretamente, el papel de la inflamación en la patogenia de la EP se propuso tras el descubrimiento por parte de McGeer y colaboradores de la presencia de microglía activada en la SNpc y en el putamen (McGeer et al., 1988; McGeer and McGeer, 2004), así como en otras áreas cerebrales como el hipocampo, la corteza cingulada y la corteza temporal de cerebros de pacientes con EP (Imamura et al., 2003). Del mismo modo, este aumento de microglía activada en la SNpc se ha corroborado *in vivo* mediante tomografía por emisión de positrones (PET) con el

radiotrazador [^{11}C]-(*R*)-PK11195 (Ouchi et al., 2005; Bartels et al., 2010; Iannaccone et al., 2013; Edison et al., 2013; Gerhard, 2016).

Estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos también destacan que la inflamación puede ser importante en el inicio o la progresión de la EP (Hirsch and Hunot, 2009).

Variaciones en el locus que codifica para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase 2 (MHC-II) se han descubierto que aumentan la susceptibilidad a EP (Aliseychik et al., 2018). Esta proteína está implicada en el reconocimiento inmunológico y la señalización entre células del sistema inmune y proteínas inflamatorias, como citoquinas y sus receptores (Holmans et al., 2013). Igualmente, se han descrito incrementos de los niveles de citoquinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de determinados enzimas relacionados con la inflamación, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en la SNpc y el estriado de pacientes con EP (Hirsch and Hunot, 2009; Du et al., 2016; Joers et al., 2017).

Los estudios experimentales apoyan la hipótesis de que la neuroinflamación puede estar implicada en la muerte celular dopaminérgica de la EP. De hecho, la degeneración dopaminérgica inducida por distintas neurotoxinas como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o el MPTP cursa con activación glial y liberación de citoquinas (Haddadi et al., 2014; Yao and Zhao, 2018). Asimismo, en ratas, la inyección intranigral de lipopolisacárido (LPS), una endotoxina derivada de la membrana externa de las bacterias gram-negativas empleada como un potente inductor de la vía inflamatoria, causa activación microglial y degeneración dopaminérgica (Reinert et al., 2014; Flores-Martinez et al., 2018). En el momento actual, se desconoce el factor o factores que inducen la activación de la microglía en la EP, así como el momento en que ocurre.

También se ha descrito un aumento de factores proinflamatorios en plasma en pacientes con EP como son la interleuquina (IL) 6, el receptor soluble de IL-2, y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). En líquido cefalorraquídeo (LCR) también se han encontrado diferencias en los niveles de IL-6, IL-1 β , IL10 y TNF- α entre pacientes con EP y controles (Dufek et al., 2015; Delgado-Alvarado et al., 2017).

Por último, en tejido *post mortem* de pacientes con EP se ha observado, de nuevo, un aumento de estas citoquinas proinflamatorias tanto en SNpc como en estriado, así como de otros intermediarios inflamatorios como iNOS y COX-2 (Mogi et al., 2007; Hirsch and Hunot, 2009; Du et al., 2016; Joers et al., 2017).

Por otro lado, la captura defectuosa de la DA en las vesículas de neurotransmisores aumenta la presencia de DA citosólica, induciendo entre otros factores la agregación de la α -sin como protofibrillas, lo que conllevaría inflamación y la generación de ROS. Esto crea un ambiente inflamatorio que conduce a la disfunción y muerte neuronal (Barcia et al., 2011; Joers et al., 2017). Se conoce que ciertos grupos neuronales son más vulnerables a ROS, entre los que se encuentran las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Buhlman, 2017), lo que podría explicar que esta población neuronal sea la más afectada en la enfermedad.

Todos estos datos sugieren que se podría establecer un círculo vicioso en el que la microglía aumenta la liberación de factores proinflamatorios en respuesta al daño celular, lo que a su vez induciría un mayor daño neuronal.

2.- LAS CÉLULAS GLIALES. MICROGLÍA Y ASTROCITOS.

Las células gliales representan el 90% de las células presentes en el parénquima del SNC. En un inicio, se denominaron *nervenkitt* (pegamento de los nervios), derivando posteriormente a glía (del griego, pegamento), ya que durante muchas décadas se mantuvo la idea de que la neuroglía solo tenía la función de mantener a las neuronas unidas (Beardsley and Hauser, 2014). Sin embargo, las células gliales son un conjunto de células muy diversas con múltiples funciones y presentes en un alto número en el sistema nervioso. Desde el punto de vista de la respuesta inmune, destacan la astrogliá y la microglía, que se describirán a continuación. En los últimos años, las células gliales han sido consideradas en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria (Fields et al., 2014).

2.1.- Microglía

Las células microgliales son las principales reguladoras de la respuesta inmune innata del SNC tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Ginhoux and Prinz, 2015). Constituyen aproximadamente el 10% de la población celular del cerebro adulto (Salter and Stevens, 2017) y el 10–15% del total de células gliales (Greter and Merad, 2013).

Fue identificada en 1919 por el histólogo español Pío del Río Hortega mediante el desarrollo de un método de impregnación argéntica con carbonato de plata amoniacal (Rio-Hortega, 1937). Por sus aportaciones, se le considera el padre de la microglía, ya que, gracias a esta tinción, describió meticulosamente las características morfológicas básicas de la microglía, observó sus ramificaciones y predijo su función fagocítica (Nayak et al., 2014).

La microglía es conocida como los macrófagos residentes del SNC, pero a diferencia de los macrófagos perivasculares, así como de los astrocitos y los oligodendrocitos, este tipo celular deriva de progenitores de origen mesodérmico que migran al SNC desde la pia madre durante la embriogénesis temprana. Estas células colonizan el SNC antes de su vasculogénesis (Ginhoux and Prinz, 2015). Posteriormente, los precursores microgliales (de morfología ameboide) se dispersan a través del parénquima neuronal y adquieren un fenotipo distintivo llamado «*surveilling microglia*» o microglía vigilante, que los distingue claramente de los monocitos derivados de la sangre (von Bernhardi et al., 2016). Este tipo celular, originalmente conocido como microglía en reposo, se caracteriza por un pequeño cuerpo celular con procesos finos, largos y ramificados (Robillard et al., 2016). Aunque se establecen de forma ubicua por el SNC, la densidad y la ubicación varían de unas regiones a otras. La microglía es más numerosa en el telencéfalo, seguido de diencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo, que contiene el menor número de estas células (Lawson et al., 1990; Savchenko et al., 2000; von Bartheld et al., 2016). Sin embargo, la SNpc es la región cerebral más poblada con el 12% de microglía (Lawson et al., 1990). Además, dentro de una misma región anatómica existen diferencias en la cantidad de microglía entre la sustancia blanca y gris tanto en roedor como en humano. En roedores hay más microglía en la sustancia gris que en la blanca, mientras que en los humanos ocurre al contrario (Ma et al.,

2017). Esto conlleva que se produzcan diferencias morfológicas, así como de respuesta inmune, entre ambas zonas. Aunque las causas y las consecuencias de esta diversidad siguen siendo objeto de especulación, se cree que la citoarquitectura de una región del cerebro determina en gran medida la morfología de la microglía que reside en la misma. Por ello, además de diferencias en la densidad, encontramos que la microglía de la sustancia gris y blanca es diferente. Mientras que la microglía de esta última cuenta con una arborización bipolar, la de la sustancia gris se dispone con procesos en forma radial (Lawson et al., 1990). Asimismo, se ha postulado que la microglía que reside en la sustancia blanca tiene un nivel basal de activación más alto (Carson et al., 2007).

En condiciones fisiológicas, estas células exploran continuamente el espacio extracelular circundante y se comunican directamente con las neuronas, los astrocitos y los vasos sanguíneos. Este rastreo lo llevan a cabo a través del constante movimiento de sus procesos, extendiendo y retrayendo pequeñas protuberancias que escanean el parénquima cerebral (Kabba et al., 2018). Cada célula microglial tiene su propio territorio, de unos 50 μm de diámetro, mostrando muy poca superposición con la célula vecina. Esto les permite responder rápidamente a un daño o infección adoptando un fenotipo activado (Nayak et al., 2014).

Se ha descrito que la interacción de CD200, una glicoproteína expresada en la membrana de las neuronas, con su ligando CD200L, expresado en microglía, mantiene inhibida la activación de las células microgliales (Hoek et al., 2000; Xie et al., 2017). Sin embargo, en situaciones donde se produzca un daño celular y tisular, se pierde esta inhibición y, por tanto, la microglía inicia una cascada de señales que comienza con la liberación de citoquinas de carácter proinflamatorio como IL-6 o TNF- α , (Costello et al., 2011; Dentese et al., 2014), promoviendo la expresión de factores como las moléculas de adhesión, las anafilotoxinas del sistema del complemento o las quimiocinas (Schmidt et al., 2005; Xie et al., 2017). Estos factores favorecerán la infiltración masiva de células circulantes, principalmente macrófagos y linfocitos, dando lugar al establecimiento de la respuesta inflamatoria adaptativa (Jin and Yamashita, 2016).

2.1.1.- Funciones de la microglía

La microglía es indispensable para el desarrollo normal del cerebro. Los estudios realizados durante la última década han revelado que la microglía interactúa con las neuronas durante el desarrollo y la vida adulta (Figura 2). La interrupción de estas interacciones puede tener un impacto negativo severo en el desarrollo y la función del SNC.

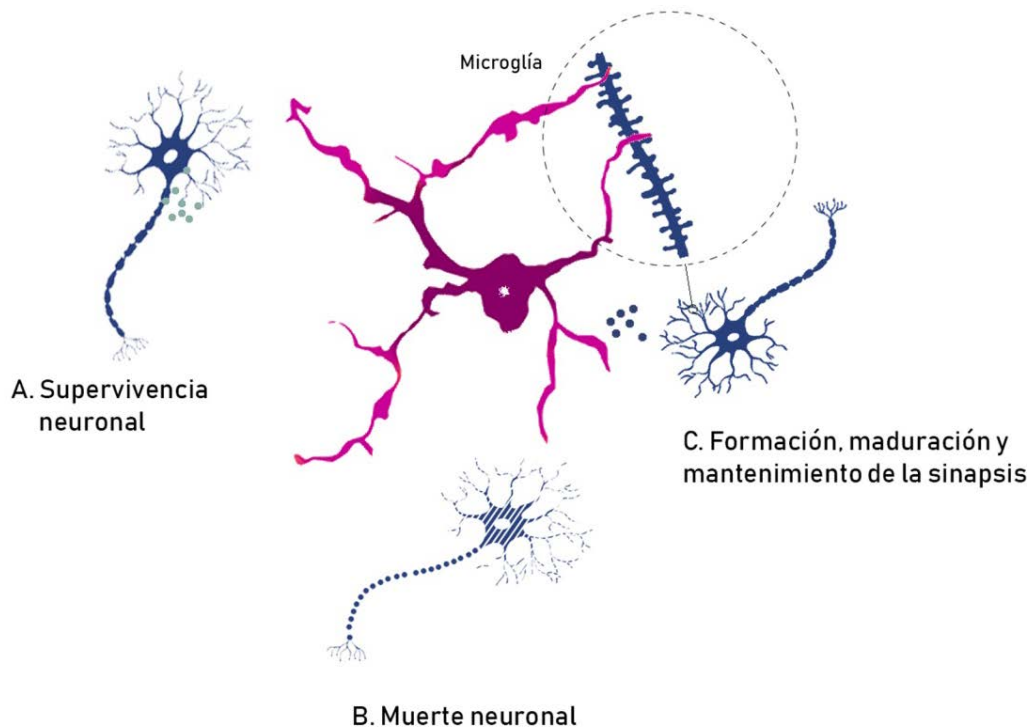


Fig. 2. Funciones de la microglía. Esquema resumen de las funciones más relevantes que desarrolla la microglía en el SNC.

2.1.1.1.- *Supervivencia neuronal*

Durante el desarrollo temprano y adulto, la microglía libera varios factores neurotróficos que contribuyen al entorno celular que propicia la supervivencia neuronal y la formación de circuitos neuronales y diferenciación neuronal (Nayak et al., 2014). Algunos de los factores tróficos liberados, como el factor de crecimiento insulina tipo 1 (IGF-1), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), desempeñan un papel importante en el desarrollo neuronal, así como en su mantenimiento y función

(Salter and Stevens, 2017). Por ejemplo, el IGF-1 promueve la supervivencia de las neuronas corticales de la capa V durante el desarrollo postnatal (Ueno et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que induce la diferenciación de las células progenitoras neuronales derivadas del hipocampo de ratas adultas a oligodendrocitos (Hsieh et al., 2004). Además, este factor protege a los cultivos celulares de oligodendrocitos inmaduros de rata de la apoptosis mediada por glutamato (Ness and Wood, 2002). El NGF fue la primera proteína de la familia de las neurotrofinas identificada. Promueve el crecimiento de neuritas, la formación de sinapsis y la diferenciación neuronal (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951). El BDNF, además de promover la proliferación y la diferenciación de las neuronas, participa en la forma y el número de espinas dendríticas (Salter and Stevens, 2017). Asimismo, en hipocampo, regula las formas de plasticidad sináptica relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Parkhurst et al., 2013).

2.1.1.2.- Muerte neuronal

Aproximadamente la mitad de las neuronas inmaduras mueren durante el desarrollo del cerebro y lo hacen principalmente a través de la muerte celular programada. Neuronas que sufren errores en la diferenciación o en la formación de circuitos neuronales, así como las que realizan funciones transitorias también deben ser eliminadas. Este proceso se puede iniciar por factores intrínsecos de la neurona o por otras células como la microglía, que están preparadas para inducir la apoptosis y eliminar los restos celulares resultantes (Nayak et al., 2014).

Esta muerte neuronal programada mediada por la microglía durante el desarrollo se ha descrito en varias regiones cerebrales donde la acción proapoptótica de la microglía está mediada por NGF. De manera similar, la microglía induce la muerte por apoptosis de las neuronas de Purkinje al liberar ROS y la de las motoneuronas a través de la secreción de TNF- α en el embrión (Salter and Stevens, 2017).

La muerte neuronal inducida durante el desarrollo exige un sistema de limpieza activo y eficiente para eliminar los restos celulares resultantes. Este

proceso está mediado por la señalización a través del receptor TREM2, expresado por la microglía (Biber et al., 2019). TREM2 promueve la fosforilación de la proteína adaptadora DAP12 que, posteriormente, induce la reorganización del citoesqueleto y la fagocitosis, así como la expresión de moléculas que atraen a la microglía (Takahashi et al., 2005). La microglía participa en esta limpieza a través de la fagocitosis sin iniciar una respuesta inflamatoria ni expresar citoquinas proinflamatorias (Salter and Stevens, 2017). De hecho, la sobreexpresión de TREM2 puede disminuir el potencial proinflamatorio de la microglía. Las neuronas dañadas, a su vez, también liberan quimiocinas como la fractalquina (CX3CL1) que reclutan a la microglía para que participe activamente en la fagocitosis. Esta actividad fagocítica es importante no solo en el desarrollo del SNC, sino también para el mantenimiento de redes neuronales saludables en el cerebro adulto (Salter and Stevens, 2017).

2.1.1.3.- Formación, maduración y mantenimiento de las sinapsis

La actividad fagocítica microglial también es crucial para la homeostasis sináptica (Salter and Stevens, 2017). Estas células participan en el *pruning* o poda sináptica durante el desarrollo, lo que tiene consecuencias para la actividad sináptica. Una función sináptica adecuada depende de varios factores tróficos y señales sinaptogénicas, algunas de las cuales derivan de la microglía. Es el caso del receptor DAP12, así como de CX3CL1. Se ha observado que ratones deficientes para esta molécula muestran alteraciones importantes en sus sinapsis (Paolicelli et al., 2011). Asimismo, durante el desarrollo, la proteína del complemento C1q se expresa en neuronas y puede promover la activación de C3, cuyo receptor (CR3) se expresa en microglía (Sekar et al., 2016). Así, la activación del complemento tiene el potencial de desencadenar la fagocitosis y la eliminación sináptica por parte de la microglía (Lui et al., 2016). En conjunto, estos datos indican que la microglía participa en el desarrollo y mantenimiento sináptico, lo que tiene importantes implicaciones para la homeostasis cerebral normal, ya que la alteración de esta actividad podría causar trastornos neurológicos (Salter and Stevens, 2017).

Por otro lado, estudios *ex vivo* en cultivos organotípicos hipocampales mostraron que la microglía también puede modular la actividad sináptica regulando la densidad de sinapsis, los receptores glutamatérgicos y el número de espinas dendríticas (Ji et al., 2013).

En cuanto a la plasticidad sináptica, estudios de imagen ultraestructural y dinámica han demostrado que la microglía participa activamente en la remodelación de la arquitectura sináptica en zonas como la corteza visual, donde la exposición a un estímulo sensorial como la luz influye en la localización y la morfología de la microglía. Por el contrario, la privación de luz induce que la microglía forme estructuras fagocíticas para eliminar espinas dendríticas. Estos datos indican que la microglía está íntimamente asociada con las sinapsis y responde a cambios sinápticos provocados por estímulos ambientales que modulan su actividad (Tremblay et al., 2010). La poda axonal programada y la eliminación selectiva de las sinapsis defectuosas son fundamentales para el establecimiento de circuitos neuronales maduros funcionales durante el desarrollo cerebral. Distintos estudios en ratones con alteraciones en el receptor de CX3CL1 (CX3CR1) o en DAP12, sugieren que estas células tienen un papel importante no solo en la formación, sino en la maduración funcional de las sinapsis (Roumier et al., 2004; Paolicelli et al., 2011).

2.1.2.- Activación microglial: cambios morfológicos y químicos

La microglía es extremadamente plástica, existiendo diferentes morfologías y composición química según su estado de actividad, dependiendo de las necesidades y demandas de su microambiente (Bachtell et al., 2017). Una alteración de homeostasis cerebral que indique un peligro para el SNC (como infecciones, tumores, etc.) provoca cambios rápidos y profundos en la morfología de la célula microglial, la expresión génica y el comportamiento funcional. Todo ello se define como «activación microglial» (Fan et al., 2017). Fenotípicamente, la complejidad de los procesos celulares se reduce y la microglía adquiere una apariencia ameboide (Sanchez-Guajardo et al., 2010; Jyothi et al., 2015), regulando positivamente una variedad de marcadores de activación de superficie y

produciendo y liberando sustancias inflamatorias como citoquinas, que son pequeñas moléculas de señalización secretadas por la glía para la comunicación inter e intracelular durante la inflamación. Estos factores están involucrados en múltiples trastornos del SNC (Gao et al., 2015). Dependiendo del tipo y la persistencia de las señales detectadas, la microglía puede entrar en diferentes estados de activación, produciendo distintas combinaciones de señales pro y antiinflamatorias (Bachtell et al., 2017).

Se distinguen **cuatro tipos morfológicos** claramente definidos (Figura 3). La microglía vigilante o **tipo A**, no tiene citoplasma visible y presenta un núcleo redondo denso y procesos largos y delgados con poca ramificación (Sanchez-Guajardo et al., 2010). La microglía **tipo B** o en estado de alerta aparece en las primeras 24 horas después del insulto, y el cambio más evidente es la retracción de las ramificaciones e hipertrofia del soma, dando lugar a una apariencia celular más robusta. Durante esta etapa se produce un incremento de moléculas con función inmune y de la migración celular. La microglía **tipo C** se caracteriza por el proceso de extensión y adhesión a estructuras lesionadas, por lo que se produce un aumento de integrinas (proteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular) y una reducción aún más marcada de las ramificaciones, lo que implica cambios en la expresión de componentes del citoesqueleto. Presentan una morfología con cuerpo alargado e irregular, núcleo ensanchado y menos definido, y con procesos más cortos, de grosor variable y con poca ramificación. La microglía **tipo D** presenta un fenotipo ameboide con capacidad fagocítica, cuya función sería la de eliminar los restos celulares causados por daños físicos o determinadas patologías. Estas células tienen un gran cuerpo celular que se fusiona con los procesos, el núcleo ocupa la mayor parte del cuerpo celular; los procesos son pocos, gruesos y cortos. La morfología de la microglía tipo D parece indistinguible de los macrófagos periféricos (Sanchez-Guajardo et al., 2010; Jyothi et al., 2015).

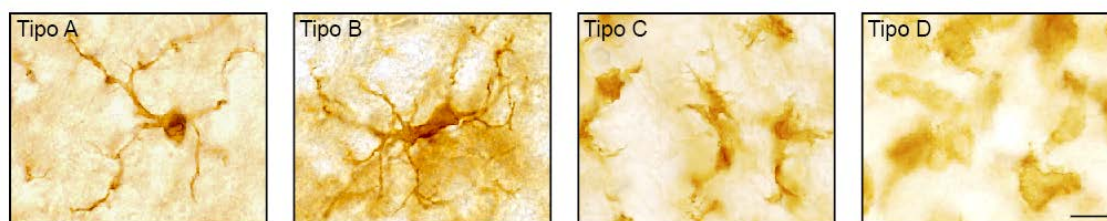


Fig. 3. Representación de los 4 subtipos de microglía en función de su grado de activación. Aumento 100X, barra de escala 40 μ m.

En cuanto a los **cambios químicos**, que son elementos adicionales del proceso de activación microglial, se encuentran la inducción y la reorganización de las moléculas de superficie para las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, los cambios en los enzimas intracelulares, la liberación de múltiples factores y compuestos con efectos proinflamatorios e inmunorreguladores (ROS, citoquinas, ATP y derivados del ácido araquidónico), así como factores de crecimiento (Bhatia et al., 2016; Kabba et al., 2018).

Entre los factores más estudiados se encuentran las citoquinas y las quimiocinas. Si bien ambos se expresan a niveles basales muy bajos en condiciones fisiológicas (Smith et al., 2012), la expresión y secreción, principalmente por microglía, pero también por astrocitos, se incrementan notablemente en respuesta al daño al SNC (Kabba et al., 2018). La secreción microglial de diversas citoquinas puede modular las células de manera paracrina, es decir, afectando a una célula vecina, o de forma autocrina, afectando a la misma célula que la secretó mediante ciclos de retroalimentación positiva o negativa (Hanisch, 2002; Kuno et al., 2005; Merson et al., 2010; Smith et al., 2012).

Se puede diferenciar entre activación microglial **aguda** o **crónica**, y se ha sugerido que esto depende, no solo de la duración de la señal externa, sino también del factor específico responsable del proceso de activación (estrés, infección, inflamación, señales de neuronas dañadas) (Hirbec et al., 2017). Se ha demostrado que la activación microglial que se produce durante situaciones de estrés, difiere de la que se produce durante la infección/inflamación (Sugama et al., 2009). La activación microglial *aguda* produce aumento de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimiocinas y es considerada generalmente beneficiosa, ya que es

autolimitada e intenta minimizar daños y reparar el tejido afectado (Chen et al., 2016). La activación microglial *crónica* es una respuesta inflamatoria prolongada que produce un aumento continuado de mediadores inflamatorios, estrés oxidativo y nitrosativo (aumento de especies reactivas de nitrógeno, RNS). Puede producirse por la persistencia de los estímulos inflamatorios o por el fallo en los mecanismos de resolución del daño (Chen et al., 2016). Esto perpetúa el ciclo inflamatorio, aumentando la activación de la microglía, promoviendo su proliferación y resultando en mayores aumentos de factores inflamatorios (Chen et al., 2016; Tang and Le, 2016). Además, se produce la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE), que incrementa la infiltración de macrófagos periféricos en el parénquima cerebral, lo que contribuye a prolongar la inflamación (Chen et al., 2016; Jin and Yamashita, 2016). La neuroinflamación crónica y la activación de la microglía juegan un papel central en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas (Chen et al., 2016).

Durante el proceso de activación, la microglía puede moverse activamente hacia la lesión o hacia agentes infecciosos siguiendo gradientes quimiotácticos. Las densidades locales de microglía también pueden aumentar por proliferación para aumentar la defensa y la protección y restauración de la homeostasis tisular (Kettenmann et al., 2011). La activación de la microglía no es un proceso irreversible, por lo que, si no existe un daño adicional a partir de un momento tras un insulto, se observa una disminución del número de células activadas, perdiendo progresivamente marcadores de activación hasta volver al estado basal.

2.1.2.1.- Polarización M1/M2

La categorización de los estados de activación de la microglía corresponde a los resultados que se obtuvieron de estudios en macrófagos periféricos (Ransohoff, 2016). Así, la microglía puede diferenciarse en dos estados de polarización: la activación clásica o M1 y la activación alternativa o M2 (Figura 4) (Moehle and West, 2015; Tang and Le, 2016). Esta subdivisión se basa en la idea de que la microglía M1 a menudo se asocia con funciones proinflamatorias, mientras que la M2, con funciones antiinflamatorias, desempeñan un papel en la remodelación,

reparación y restablecimiento de los tejidos (Tang and Le, 2016). Debido a las similitudes entre ambos tipos celulares, para la microglía se adoptó la misma nomenclatura que para los macrófagos periféricos, si bien es cierto que poseen diferencias en cuanto a expresión génica.

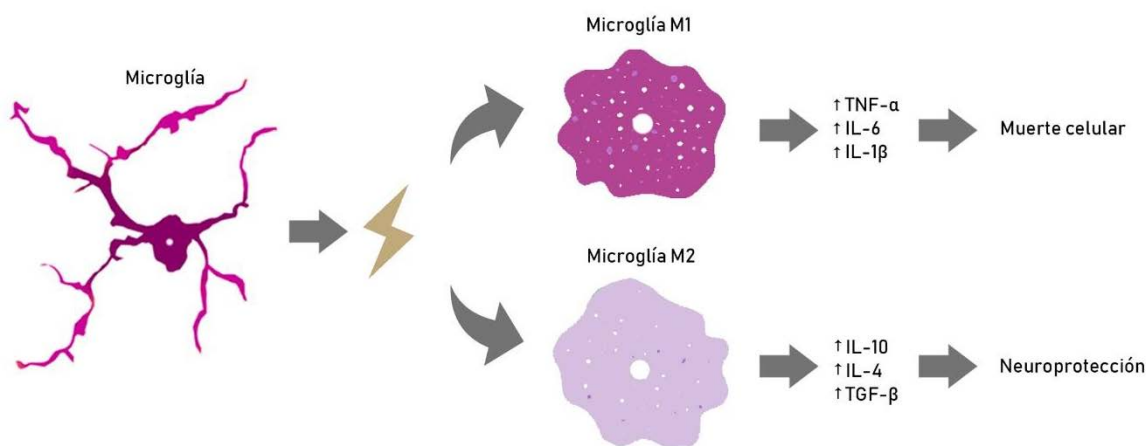


Fig. 4. Polarización de la microglía en respuesta a un daño en los estados de activación clásico (M1), donde libera citoquinas proinflamatorias que conducen a muerte celular, o alternativo (M2), donde se liberan citoquinas antiinflamatorias con función neuroprotectora. Modificado de Czeh et al., 2011. **IL:** interleuquina; **TGF- β :** factor de crecimiento transformante β ; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α .

2.1.2.1.1.- Estado de activación M1

El fenotipo M1, o estado de activación «clásico», está asociado con funciones proinflamatorias y pro-muerte neuronal (Tabla 1).

Cuando la microglía alcanza este estado de activación, secreta una serie de factores solubles y expresa marcadores intracelulares y de superficie celular. Concretamente, se produce la liberación de varias citoquinas proinflamatorias que incluyen el TNF- α , la IL-6, IL-12 y la IL-1 β , que han sido ampliamente utilizadas como marcadores fenotípicos de la respuesta M1, y quimiocinas como CCL2 y CXCL10, que han sido implicadas en la ruptura de la BHE y el reclutamiento de linfocitos en el SNC (Goldmann and Prinz, 2013; Palma et al., 2018). Otros marcadores adicionales del estado M1 incluyen la sobreexpresión en la superficie celular microglial del MHC-II, el incremento de los marcadores de diferenciación CD86 y CD16/32 y el aumento de la expresión intracelular de iNOS por parte de la microglía (Moehle and West, 2015; Palma et al., 2018).

Para inducir y estudiar el estado M1 en la microglía activada *in vitro* e *in vivo*, se han utilizado estímulos como el interferón gamma (IFN- γ) y el LPS. Los receptores de IFN- γ activados provocan el reclutamiento de la *Janus* quinasa 1 y 2 (JAK1/2), que a su vez fosforila y activa a STAT1 y a factores reguladores de interferón (IRF), principalmente IRF1 (Hu and Ivashkiv, 2009; Palma et al., 2018). La cascada de transducción de señal induce cambios transcripcionales que regulan positivamente la expresión de citoquinas, receptores y otros genes asociados con la respuesta M1 (Moehle and West, 2015). El LPS se une al receptor tipo *Toll* 4 (TLR4). Esta unión estimula a varios factores de transcripción que provocan una sobreexpresión transcripcional de un conjunto de genes como el IFN- γ (Hu and Ivashkiv, 2009). Estas cascadas de activación de los TLR inducen a la microglía hacia el estado M1 (Palma et al., 2018).

2.1.2.1.2.- Estado de activación M2

El estado de activación «alternativo» o M2 está asociado con la cicatrización y la eliminación de restos de tejido. El fenotipo M2 se subdivide en M2a, M2b y M2c (Tabla 1). Estos tres estados tienen cierta superposición bioquímica, pero tienen mecanismos de activación y efectores distintos (Moehle and West, 2015).

La categoría M2a fue la primera en ser descrita. La IL-4 es el estímulo prototípico de la microglía M2a y puede unirse a tres pares de receptores diferentes. Cada par de receptores, a través de la vía de señalización JAK/STAT, pone en marcha cambios transcripcionales como la sobreexpresión de citoquinas antiinflamatorias. Esto incluye el receptor de manosa (CD206), los receptores *scavenger* (SR) y el supresor de liberación de la citoquina 1 (SOCS1) (Martinez et al., 2013). Además, los macrófagos M2a secretan poliaminas e IL-10, que bloquean la producción de citoquinas proinflamatorias (Lu et al., 2013).

La microglía activada M2b se asocia con un aumento selectivo de la fagocitosis, así como con la regulación de las respuestas proinflamatorias. Para estimular esta respuesta se requiere la activación de TLR, que provoca la fusión de receptores Fc (receptores de unión de anticuerpos) donde se une la

inmunoglobulina G (IgG) que liberan los linfocitos B (LB). A continuación, se liberan citoquinas proinflamatorias que ponen en marcha la respuesta inmune adaptativa, activando los linfocitos T (LT) *helper* (Moehle and West, 2015). El estado M2b difiere notablemente del estado M2a en cuanto a citoquinas secretadas y cambios asociados en la expresión génica. Así, la microglía M2b se caracteriza por su elevada liberación de IL-10, la sobreexpresión de CD86 en su superficie celular, así como por mantener niveles bajos de citoquinas proinflamatorias (Moehle and West, 2015).

La última subcategoría de activación M2 es M2c. Esta microglía está asociada con la reparación tisular, la reparación de la matriz extracelular y la desactivación de la respuesta M1. IL-10 es el principal estímulo para la microglía M2c. Esta citoquina se une a su receptor y activa otros componentes de la vía JAK/STAT diferentes a los de M2a. Esta señalización da como resultado la supresión de la mayoría de las citoquinas proinflamatorias. Además, también estimula la liberación de las quimiocinas CXCL13 y CXCL4, implicadas en la quimioatracción de LBs y en la unión a heparina, respectivamente (Moehle and West, 2015).

Hay que tener en cuenta que la clasificación M1/M2 es una simplificación que representa estados extremos. El proceso de activación corresponde a un amplio espectro de subestados específicos que combinan características fisiológicas determinadas (Palma et al., 2018). Se han descrito fenotipos intermedios (Mosser and Edwards, 2008) que pueden ejercer efectos beneficiosos o perjudiciales dependiendo de si el daño es agudo (como una lesión en la médula espinal o el accidente cerebrovascular) o crónico (como las enfermedades neurodegenerativas), de la duración y momento de esa señal, del microambiente, de la interacción con otros tipos de células e incluso de la edad de un organismo (Kabba et al., 2018).

	M1	M2		
		M2a	M2b	M2c
Estímulo	LPS, IFN- γ , LTA, GM-CSF, dsADN, ssARN,	IL-4/IL-13	TLR e IgG	IL-10
Citoquinas secretadas	IL-10, IL-1, IL-23, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-18	IL-10, IL-12, IL-23, IL-1Ra	IL-10, IL-12, IL-23, IL-1 β , TNF- α , IL-6	IL-10, IL-12, IL-23, TGF- β
Quimiocinas secretadas	CCL-2, 3, 4, 5, 11, 17, 22, CXCL-1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16	CCL-17, 18, 22, 24	CCL-1	CCL-16, 18 CXCL-13
Marcadores de superficie celular	CD86, CD16/32, MHC-II	CD206, SRs	CD86, MHC-II	SLAM, CD206
Marcadores intracelulares	iNOS	Arg, YM1*, Fizz1*	iNOS	Arg

Tabla 1. Resumen de algunos de los estímulos, marcadores y factores liberados por los fenotipos microgliales M1 y M2. * Indica marcadores que solo funcionan en roedores al no tener análogos humanos conocidos. Modificado de Moehle and West, 2015 y Palma et al. 2018. **Arg:** arginasa 1; **CCL y CXCL:** quimiocinas; **CD206:** receptor de manosa; **dsADN:** ADN bicatenario; **Fizz1:** molécula tipo resistina α 1 **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; **IFN- γ :** interferón γ ; **IgG:** inmunoglobulina G; **IL:** interleuquina; **iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible; **LTA:** Ácido lipoteicoico; **LPS:** Lipopolisacárido; **MHC-II:** complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; **SLAM:** Molécula de activación de señalización de linfocitos; **SRs:** receptor *scavenger*; **ssARN:** ARN monocatenario; **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante β ; **TLR:** receptor *toll-like*; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α ; **YM1:** proteína 3 tipo quitinasa.

2.2.- Astrogliá

Los astrocitos representan el 20-40% de todas las células gliales y son el grupo más heterogéneo en morfología y función (Carta et al., 2017; Verkhratsky and Nedergaard, 2018). La proporción de astrogliá-neuronas varía de una región a otra del cerebro (Verkhratsky and Nedergaard, 2018) y, además, cada zona tiene propiedades fisiológicas distintas (Bayraktar et al., 2015; Schitine et al., 2015). La primera constancia de su existencia fue aportada en 1865 por Otto Dieters (Dieters, 1865), discípulo de Virchow, quien las denominó células de Dieters, aunque debido a su apariencia estrellada, en 1893 Michael von Lenhossek pasó a llamarlas astrocitos (Von Lenhossek, 1893). Una década después de su descubrimiento, Camillo Golgi los visualizó en el SNC y ahondó en el concepto de «pegamento» del cerebro para estas células (Golgi, 1871). Sin embargo, fueron los estudios de Ramón y Cajal los que revelaron por primera vez el pleomorfismo de

los astrocitos, (Cajal, 1897). Asimismo, hasta 1919 no se reconocieron como tipos celulares separados de microglía y oligodendrocitos (Rio-Hortega, 1932).

La hipótesis más aceptada del origen embrionario de los astrocitos es que provienen de la glía radial, que deriva del ectodermo, cuya función es la de formar un entramado que guía la migración neuronal desde la zona ventricular. Posteriormente, se divide asimétricamente de manera autorrenovable y genera, primero neuronas y luego glía. Además, los astrocitos también pueden originarse a partir de la proliferación de astrocitos diferenciados y de células gliales NG2 (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

2.2.1.- Tipos de astrocitos

Clásicamente se clasifican en dos subtipos según su morfología. El primero de ellos, los astrocitos protoplásmicos, están en la sustancia gris y tienen numerosos procesos finos, la mayoría de ellos complejos. Estos procesos entran en contacto con las neuronas y con los capilares sanguíneos, estableciendo terminales perivasculares (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). El complejo vaso sanguíneo-astrocito-neurona se conoce como unidad neurovascular (Figura 5) y es lo que forma la BHE. Algunos astrocitos protoplásmicos también forman pies subpiales en la superficie de la piamadre (von Bernhardt et al., 2016).

El segundo subtipo, los astrocitos fibrosos, se encuentran en la sustancia blanca. Sus procesos son largos (hasta 300 μm), pero mucho menos complejos que los de la astrogía protoplásmica. Los procesos de los astrocitos fibrosos también establecen pies perivasculares o subpiales. La unidad neurovascular, en este caso, consiste en enviar numerosas extensiones (procesos perinodales) que entran en contacto con los axones en los nódulos de Ranvier (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). Los estudios de Cai et al., 2007 y Gressens et al., 1992 sugieren que los dos subtipos clásicos se generan por vías diferentes, aunque se desconocen los progenitores que dan lugar a cada uno de ellos (Tabata, 2015).

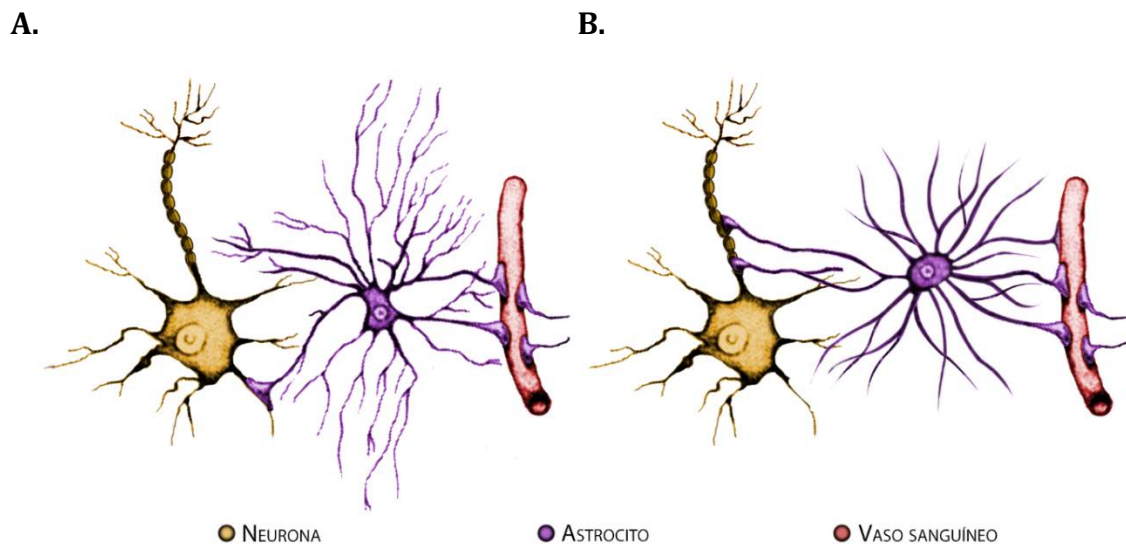


Fig. 5. Astrocito protoplásmico (A.) y fibroso (B.), neurona y vaso sanguíneo formando una unidad neurovascular. Modificado de Del Abril Alonso et al., 2016.

Si bien estos subtipos son los mayoritarios, por el momento se conocen nueve tipos de células astrogliales, entre los que se encuentran la glía radial en el SNC en desarrollo, la glía de Müller en la retina, la glía de Bergmann en el cerebelo, los tanicitos en los órganos periventriculares, la hipófisis y los núcleos del rafe o la *glia limitans*, una barrera de astrocitos que se localizan muy cerca de la piamadre, donde forman numerosos pies astrocitarios que ayudan a aislar el parénquima cerebral de los compartimentos vascular y subaracnoideo (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Es importante destacar que los microvasos están rodeados por pies de astrocitos que proporcionan una vaina contigua pero no superpuesta alrededor del capilar (Simard et al., 2003). Los astrocitos definen su propio dominio anatómico, ya que sus procesos ocupan un espacio tridimensional donde no se solapan con los del astrocito adyacente. De hecho, la activación astrogliar conlleva, en muchos casos, la pérdida del dominio individual de dichos procesos. Además, el grado de solapamiento generalmente está relacionado con la severidad de la astrogliosis, siendo característica la pérdida total de la individualidad en la gliosis severa (Rossi, 2015). Estudios de gliosis en modelos experimentales de epilepsia han demostrado que la organización del dominio se pierde en astrocitos reactivos, pero, sin embargo, se mantiene en un modelo murino de EA, sugiriendo que la

organización del dominio también puede jugar un papel en la patología de las enfermedades neurodegenerativas (Oberheim et al., 2008).

El soma y los principales procesos de los astrocitos están enriquecidos con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés), una proteína del filamento intermedio (Carta et al., 2017). Esta, junto con la proteína de unión a calcio S100 β se consideran marcadores de astrocitos, si bien es cierto que la expresión de GFAP es mayor en los astrocitos protoplasmáticos, que constituyen el 50% de este tipo celular, mientras que en los astrocitos fibrosos, su expresión es más reducida (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Conjuntamente, los astrocitos adultos expresan marcadores adicionales como vimentina, glutamina sintetasa (GS), proteína de unión a lípidos cerebrales y la aldehído deshidrogenasa L1. GFAP y vimentina, junto con los microtúbulos y los filamentos de actina, constituyen el citoesqueleto de los astrocitos (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

2.2.2.- Funciones de los astrocitos

Desde que se descubrieron y durante el transcurso del siglo XX, se tenía la idea de que los astrocitos eran células exclusivamente auxiliares de las neuronas, sin funciones más allá del soporte estructural de estas (García-Marín et al., 2007; Kettenmann and Verkhratsky, 2008). Sin embargo, en las últimas décadas, la importancia de estas células se ha reconsiderado debido no únicamente a la evidencia sobre su participación en la microarquitectura del parénquima, sino también en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, el almacenaje y distribución de sustratos energéticos, en el control del desarrollo y supervivencia de las neuronas, el desarrollo y modulación de la transmisión sináptica, la propagación de los impulsos nerviosos y la defensa del cerebro, entre otras (Figura 6) (von Bernhardi et al., 2016). Además, los astrocitos individuales están integrados en sincitios funcionales entre ellos a través de uniones gap entre sus procesos (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

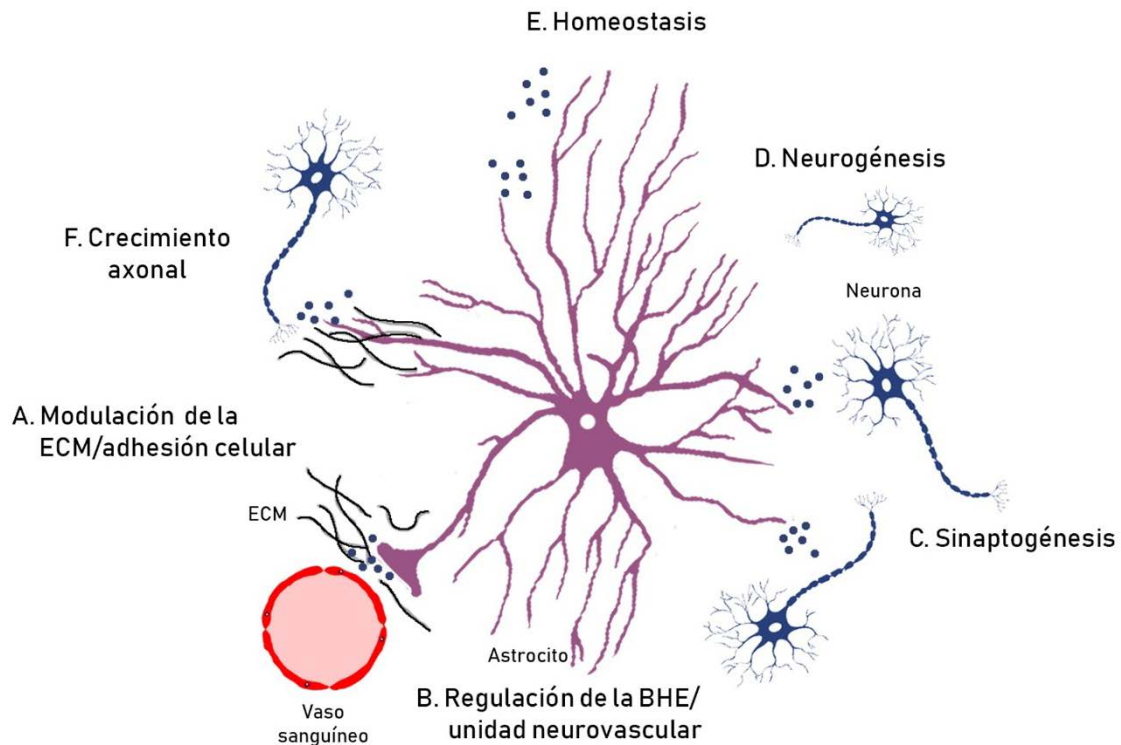


Fig. 6. Funciones de los astrocitos. Esquema resumen de las funciones más relevantes que desarrollan los astrocitos en el SNC. Modificado de Jha et al., 2018. **BHE:** barrera hematoencefálica; **ECM:** matriz extracelular.

2.2.2.1.- Mantenimiento de la BHE

El mecanismo de aislamiento más importante del SNC para la limitación del daño durante la inflamación periférica es la existencia de la BHE (Galea et al., 2007). La BHE la forman principalmente las uniones estrechas entre las células endoteliales que conforman los vasos del SNC. De esta forma, permite selectivamente regular el movimiento de iones, moléculas y células entre la sangre y el cerebro (Daneman and Prat, 2015). En este sentido, los astrocitos juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la BHE al liberar factores de crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y la angiopoyetina-1 (Alvarez et al., 2013; Wong et al., 2013). La permeabilidad de la BHE está estrictamente regulada y su desajuste es una característica temprana y significativa de las enfermedades del SNC, especialmente en afecciones inflamatorias (Dallasta et al., 1999; Sandoval and Witt, 2008). La lesión de la BHE puede provocar edema, excitotoxicidad, daños

metabólicos, una potenciación de la inflamación al infiltrarse células periféricas de forma no controlada y la inhibición de la reparación tisular en el cerebro (Argaw et al., 2009).

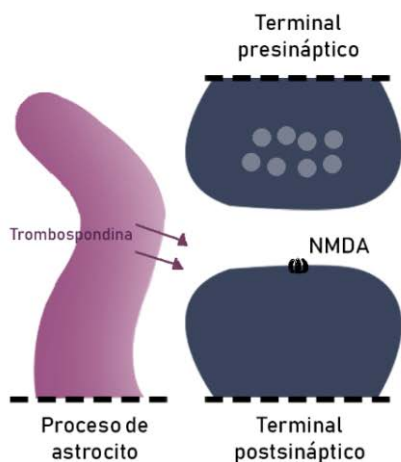
2.2.2.2.- Formación, maduración y mantenimiento de las sinapsis

Los astrocitos son células químicamente excitables capaces de modificar su concentración de calcio (Ca^{++}) intracelular y producir ondas de Ca^{++} , potenciando o disminuyendo la actividad neuronal cercana. Dicho efecto se ha asociado a una breve modulación de la fuerza sináptica, demostrando así una estrecha relación astrocito-sinapsis. Estos hallazgos, junto con la expresión funcional de receptores, dieron lugar a la hipótesis de la «sinapsis tripartita» (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Según esta hipótesis, las sinapsis tienen tres componentes: el terminal presináptico, la membrana postsináptica y el astrocito asociado. Los procesos de los astrocitos poseen receptores para los neurotransmisores que se liberan en las sinapsis que revisten y que, por tanto, activan tanto a la neurona postsináptica como al astrocito asociado. Las membranas de los astrocitos envuelven aproximadamente el 80% de las sinapsis grandes, que son las más activas funcionalmente, y alrededor de la mitad de las pequeñas (von Bernhardi et al., 2016). Se estima que un único astrocito cortical de ratón entra en contacto con más de 100.000 sinapsis, mientras que un astrocito humano puede contactar con hasta 2.000.000 de sinapsis (Bachtell et al., 2017). Al mismo tiempo, durante la sinapsis se genera un potencial postsináptico en la neurona y una señal de Ca^{++} en el astrocito. Las señales de Ca^{++} se propagan a través del sincitio astrocítico y desencadenan la liberación de neurotransmisores como glutamato, purinas o DA de los astrocitos vecinos a través de exocitosis lisosomal (Lalo et al., 2014; Guillamón-Vivancos et al., 2015), que a su vez enviarán señales a otras membranas neuronales pre y postsinápticas.

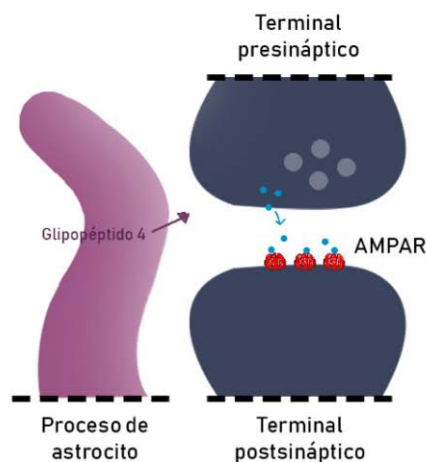
Además del mantenimiento, los astrocitos regulan la formación, maduración y función de las sinapsis neuronales (von Bernhardi et al., 2016), incluidas las glutamatérgicas, GABAérgicas, glicinérgicas y colinérgicas (Allen and Eroglu, 2017), mediante la secreción de factores reguladores (Figura 7A), como

trombospondina, hevin, glicicanos, SPARC (del inglés *secreted protein acidic and rich in cysteine*) y TNF- α (Allen, 2014). La trombospondina y el hevin inducen la formación de sinapsis estructuralmente maduras, pero no funcionales (Allen and Eroglu, 2017). El glucopéptido 4 (Figura 7B) recluta receptores AMPA en la superficie de las dendritas, lo que induce la formación de sinapsis y su actividad. TNF- α , regula la inserción de receptores de glutamato y el factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF), que aumenta la densidad de los receptores NMDA en las membranas postsinápticas. Por el contrario, la glicoproteína SPARC bloquea la formación de sinapsis inducida por hevin y disminuye los niveles de AMPA en las sinapsis (Allen and Eroglu, 2017). Por último, los astrocitos participan en la eliminación de las sinapsis (Figura 7C), que es la base para la plasticidad de la comunicación neuronal. Este proceso se realiza por las vías fagocíticas MEGF10 y MERTK, (Chung et al., 2013) y la liberación de señales como TGF- β que inducen la expresión de la proteína C1q, iniciadora de la vía del complemento (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Chung et al., 2015; Allen and Eroglu, 2017). C1q es también reconocida por la microglía, que eliminan estas sinapsis por fagocitosis. Además, los astrocitos por sí mismos pueden engullir y eliminar las sinapsis en el cerebro en desarrollo (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Posteriormente, los procesos de astrocitos invaden la hendidura sináptica rellenando el hueco que deja la sinapsis eliminada, siendo este proceso especialmente robusto en condiciones neuropatológicas (von Bernhardi et al., 2016).

A. Control astrocítico de la formación estructural de sinapsis



B. Control astrocítico de la formación funcional de sinapsis



C. Control astrocítico de la eliminación de sinapsis

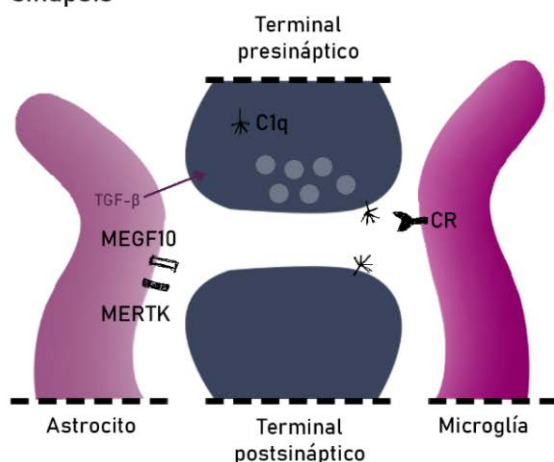


Fig. 7. Funciones sinápticas de los astrocitos. Los astrocitos realizan funciones específicas para la formación estructural de las sinapsis (A) así como de la funcional (B). Además, junto con la microglía, llevan a cabo *pruning* o eliminación de sinapsis (C). Modificado de Allen and Eroglu, 2017. **CR:** receptor del complemento; **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante β .

2.2.2.3.- *Modulación del glutamato*

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC y los astrocitos tienen la maquinaria necesaria para regular su disponibilidad al poder degradarlo y generarlo de nuevo (von Bernhardi et al., 2016). Los astrocitos recaptan la mayor parte del glutamato que se libera en las sinapsis a través del

transportador de glutamato 1 (GLT-1) y del transportador de glutamato/aspartato (GLAST) (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Por otra parte, una vez el astrocito ha captado el glutamato, este se convierte en glutamina por la enzima GS, específica de los astrocitos (Schousboe et al., 2014), la cual se recapta a los terminales presinápticos neuronales, donde se recicla para sintetizar de nuevo glutamato a través de la enzima glutaminasa, a fin de mantener la transmisión sináptica. Los astrocitos también expresan la enzima piruvato carboxilasa, por lo que son una fuente para la síntesis *de novo* de glutamato (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Los astrocitos perisinápticos también eliminan rápidamente los neurotransmisores del espacio intersticial, evitando su acumulación extrasináptica y limitando su difusión a las sinapsis cercanas (Murphy-Royal et al., 2017). Este proceso ocurre tan rápido gracias a la red astrocítica que forman estas células a través de las uniones gap entre ellas.

La captación de glutamato por los astrocitos es crucial para el correcto funcionamiento de las neuronas, ya que cuando se libera en exceso, se vuelve excitotóxico y puede desencadenar la muerte neuronal (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

2.2.2.4.- Mantenimiento de la homeostasis iónica

La homeostasis cerebral es el proceso subyacente al mantenimiento de la estabilidad de la función cerebral en respuesta a los cambios resultantes de las condiciones fisiológicas o fisiopatológicas (Jha et al., 2018). Para mantener dicha estabilidad del medio interno, los astrocitos regulan la concentración extracelular de iones de potasio (K^+), hidrógeno (H^+), y cloro (Cl^-), de hierro, de neurotransmisores, de metabolitos y los movimientos de agua (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

El aumento de la concentración extracelular de K^+ se produce como resultado de la actividad sináptica y los astrocitos son capaces de amortiguarlo

captándolo a través de los canales Kir4.1. y difundiendo dicho exceso por el sincitio astroglial hacia zonas donde el gradiente de concentración sea favorable para su liberación (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

El aumento de los protones en el medio extracelular proviene principalmente del metabolismo neuronal y, secundariamente, de la exocitosis de neurotransmisores. Los astrocitos regulan el pH extracelular secretando el H⁺ en cotransporte en el proceso de absorción de glutamato a través del transportador EAAT1/2 o secretándolo al espacio extracelular a través del transportador de sodio (Na⁺) (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

La homeostasis del hierro es esencial para la función celular normal. La desregulación aguda de la homeostasis del hierro puede participar en efectos patogénicos de larga duración que subyacen al daño neuronal y la muerte (Belaidi and Bush, 2016). Los astrocitos utilizan mecanismos que incluyen una mayor expresión del factor nuclear derivado de eritroides 2 (Nrf2), glutatión y catalasa para combatir el estrés oxidativo, que probablemente sea una de las consecuencias del exceso de hierro libre y, por tanto, de neurotoxicidad. Muchos de los componentes del transporte de hierro se observan en el secretoma astrocítico, que es un conjunto de proteínas secretadas por estas células. Incluyen el receptor de transferrina, la hefestatina, la ceruloplasmina y las cadenas pesada y ligera de ferritina-1, que es una proteína especializada en el depósito del hierro (Belaidi and Bush, 2016). A pesar de que los astrocitos no tienen un alto requerimiento metabólico de hierro, tienen la capacidad de almacenar y exportar hierro de manera muy eficiente. Además, el exceso de hierro en el microambiente de los astrocitos regula la expresión de ferritina, que se une y neutraliza el hierro ferroso, evitando así sus efectos sobre el estrés oxidativo (Belaidi and Bush, 2016).

Por último, los procesos de los astrocitos son ricos en el canal de agua acuaporina 4 (AQP4). Estos canales están agrupados densamente a lo largo de estos procesos que entran en contacto con los vasos sanguíneos y desempeñan un papel crítico en la regulación de la homeostasis de los fluidos en el SNC (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

2.2.2.5.- Soporte metabólico

Los astrocitos proporcionan apoyo metabólico a las neuronas. La hipótesis de la transferencia glucosa-lactato propone que los astrocitos internalizan glucosa, la metabolizan a lactato y la liberan como un sustrato energético para las neuronas. Además, los astrocitos son las únicas células cerebrales que sintetizan glucógeno y controlan el depósito de energía manteniendo la actividad neuronal durante la hipoglucemia y durante períodos de alta actividad neuronal (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Durante la hipoglucemia, el glucógeno del astrocito se descompone en glucosa, se transforma en lactato y se transfiere a las neuronas adyacentes (dendritas en la sustancia gris y axones en la sustancia blanca) donde se usa anaeróticamente como combustible (Verkhratsky and Nedergaard, 2018). Asimismo, la mayor acumulación de glucógeno astrocítico ocurre en áreas de alta densidad sináptica. Durante períodos de alta actividad neuronal se generan grandes cantidades de ATP, lo que provoca la inhibición de la enzima fosfofructoquinasa (principal enzima reguladora de la glucólisis), conduciendo a un deterioro de la glucólisis neuronal. Por tanto, el lactato expulsado de los astrocitos pasaría a ser el principal sustrato energético para las neuronas (Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Asimismo, como los astrocitos son parte de la unidad neurovascular, coordinan la actividad neuronal con el flujo sanguíneo local según la demanda metabólica. El aumento de la actividad de las neuronas induce señales de Ca^{++} en los astrocitos, lo que lleva a la liberación de agentes vasoactivos como la prostaglandina E, NO o ácido araquidónico, que regulan el flujo sanguíneo local (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

2.2.3.- Astrogliosis

Los astrocitos son capaces de responder a todos los tipos de daño del SNC con una gran variedad de cambios que se conocen como astrogliosis, un proceso marcado por el aumento de los niveles de GFAP, la liberación adicional de citoquinas inflamatorias y cambios morfológicos (Gorshkov et al., 2018).

Según la gravedad del daño o enfermedad, existen tres grados de astrogliosis. El primer grado o astrogliosis leve-moderada consiste en alteraciones en la expresión génica de la proteína GFAP de forma proporcional al grado de reactividad de los astrocitos (Wanner et al., 2013) junto con la hipertrofia del cuerpo celular y sus procesos, pero sin proliferación ni pérdida de los dominios individuales de cada célula (Sofroniew, 2014). Este tipo de astrogliosis puede remitir y, generalmente, se asocia con traumatismos leves no penetrantes y no contusivos y con activación inmune innata difusa (infecciones virales o bacterianas). También se puede encontrar en áreas que están a cierta distancia del foco de la lesión (Sofroniew, 2014).

El segundo grado, o astrogliosis reactiva difusa grave, conlleva una sobreexpresión pronunciada de GFAP, hipertrofia celular, proliferación celular y cierta pérdida de los dominios individuales de cada célula con superposición de procesos de astrocitos vecinos. Estos cambios pueden extenderse por áreas adyacentes a la lesión y pueden ocurrir en diversas situaciones, como lesiones neurodegenerativas crónicas, trauma difuso, isquemia difusa o ciertos tipos de infección. Debido a que puede haber una considerable reorganización tisular, se reduce el potencial de que esta reactividad remita y el tejido vuelva a su estructura normal, por lo que existe una gran tendencia hacia una reorganización tisular de larga duración (Sofroniew, 2014).

Por último, cuando la lesión es muy severa, aparece la astrogliosis reactiva severa con formación de una cicatriz glial compacta en el tejido dañado. Estas cicatrices derivan casi completamente de astrocitos recién proliferados con formas alargadas (Wanner et al., 2013), cuyos procesos celulares se superponen y se entrelazan para formar bordes compactos que rodean y demarcan áreas de daño tisular, necrosis e inflamación (Wanner et al., 2013), lo que impide la regeneración axonal y la migración celular. Puede haber varias fuentes de astrocitos formadores de cicatrices: recién divididos, que incluyen astrocitos maduros que vuelven a entrar en el ciclo celular y proliferan (Bardehle et al., 2013), progenitores celulares endimarios o células progenitoras NG2 en el parénquima local (Sofroniew, 2014), que son células progenitoras en el sistema nervioso inmaduro y adulto que dan lugar a oligodendrocitos (Lopez Juarez et al., 2016) y a astrocitos,

secundariamente (Bernhardi et al., 2016). La astrogliá reactiva tiene una función esencial al restringir la diseminación de la inflamación al parénquima del SNC. Además, la formación de cicatrices astrogliales está asociada con una reorganización tisular sustancial y cambios estructurales que persisten incluso cuando los insultos desencadenantes han desaparecido (Sofroniew, 2014).

2.2.3.1- Regulación de la astrogliosis

La evidencia actual indica que los aspectos específicos de la astrogliosis reactiva pueden ser regulados individualmente por una amplia variedad de moléculas reguladoras y de señalización inter e intracelulares, según se requiera en diferentes situaciones (Sofroniew, 2014).

En cuanto a la **señalización extracelular**, la astrogliosis puede ser inducida, regulada o modulada por moléculas pequeñas, como purinas, transmisores y hormonas esteroides, por factores de crecimiento, citoquinas, proteínas séricas o moléculas asociadas a la neurodegeneración como β -amiloide ($A\beta$). Estas señales pueden derivar de muchas fuentes diferentes y pueden liberarse por daño o muerte celular, o por mecanismos de señalización específicos. Muchos tipos de células pueden liberar estos reguladores moleculares de astrogliosis, como células propias del SNC, incluyendo neuronas y microglía, así como por células no neurales que ingresan en el SNC, como los leucocitos derivados de la médula ósea, los fibrocitos y los agentes infecciosos microbianos (Burda and Sofroniew, 2014).

Por otro lado, muchos reguladores moleculares extracelulares de astrogliosis son capaces de iniciar cascadas de **señalización intracelular**. Así, vías de señalización asociadas como cAMP, STAT3, NF κ B, Rho-quinasa, JNK o Ca^{2+} , entre otros, pueden inducir la expresión de GFAP o vimentina, elementos clave de la astrogliosis. También hay evidencia de que los microARN (miR), tales como miR-21 y miR-181 y las enzimas reguladoras de miR, como Dicer, pueden modular la astrogliosis y las funciones reactivas de los astrocitos, agregando otro nivel de regulación (Sofroniew, 2014).

2.2.3.2.- Polarización A1/A2

Mediante el estudio a gran escala del perfil genético de los astrocitos reactivos, Zamanian y colaboradores identificaron dos grupos de astrocitos reactivos en base a marcadores moleculares distintos (Zamanian et al., 2012; Liddelw et al., 2017). De forma análoga a la microglía, los astrocitos están emergiendo como células que pueden ejercer funciones proinflamatorias consideradas neurotóxicas (fenotipo A1) o funciones antiinflamatorias predominantemente protectoras (fenotipo A2), ambas vías reguladas por cascadas de señalización específicas (Sofroniew, 2015; Liddelw et al., 2017). Esta nomenclatura, al igual que ocurre con la microglía, es solo descriptiva, ya que ambos tipos celulares muestran un espectro continuo de cambios moleculares (Martinez and Gordon, 2014; Heppner et al., 2015).

2.2.3.2.1.- Estado de activación A1

La secreción por parte de la microglía proinflamatoria de citoquinas como IL-1 α , TNF y C1q, polarizan a los astrocitos hacia perfiles proinflamatorios y potencialmente citotóxicos (Liddelw et al., 2017). Los astrocitos A1 producen numerosas moléculas proinflamatorias, que incluyen diversas citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y pequeñas moléculas como las prostaglandinas y óxido nítrico (NO) (Carta et al., 2017). Estas moléculas han demostrado previamente ser destructivas para las sinapsis, sugiriendo que los astrocitos con fenotipo A1 pueden tener funciones nocivas (Liddelw and Barres, 2017a).

A través de estudios con modelos de animales *knock out* (KO) para elementos de la respuesta inflamatoria se están identificando las cascadas de señalización intracelular y las moléculas efectoras intercelulares que median estas funciones proinflamatorias de los astrocitos A1. Por ejemplo, NF κ B y SOCS3 son reguladores proinflamatorios de la transcripción en los astrocitos en la lesión traumática y la inflamación autoinmune del SNC (Okada et al., 2006; Brambilla et al., 2009; Liddelw et al., 2017). CCL2 y CXCL10 son efectores intercelulares

liberados específicamente por los astrocitos y se encargan de reclutar leucocitos perivasculares en la inflamación autoinmune del SNC (Kim et al., 2014; Mills Ko et al., 2014; Moreno et al., 2014).

Las cascadas de señalización multimolecular también están siendo definidas en los últimos años. Por ejemplo, en respuesta a la estimulación por IL-1 β , los astrocitos generan y liberan factor VEGF, que aumenta la permeabilidad de la BHE y promueve la extravasación de leucocitos (Argaw et al., 2009, 2012).

2.2.3.2.2.- Estado de activación A2

Los astrocitos reactivos A2 son inducidos por daños como la isquemia, situación en la que se produce la regulación positiva de muchos factores neurotróficos que promueven la supervivencia y el crecimiento de neuronas, así como trombospondinas, que promueven la reparación de sinapsis. Esta regulación sugiere que los astrocitos A2 pueden tener funciones reparadoras. En esta línea, estudios previos han demostrado que los astrocitos reactivos inducidos por la isquemia promueven la recuperación y reparación del SNC (Gao et al., 2005; Zador et al., 2009; Hayakawa et al., 2014).

El papel de los astrocitos A2 ante una lesión no está claro, pero numerosos estudios en diversos modelos de lesión y enfermedad del SNC están permitiendo actualmente la identificación gradual de los mecanismos moleculares específicos (Sofroniew, 2015). Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, los astrocitos provocan la infiltración de leucocitos a través de la alteración de la BHE mediada por VEGF (Argaw et al., 2009, 2012). Sin embargo, bajo diferentes circunstancias, los astrocitos liberan moléculas que promueven la reparación endotelial de la BHE, como *Sonic hedgehog* (Alvarez et al., 2011, 2013). Además, la secreción de apolipoproteína E (APOE) impide que aumente la permeabilidad de la BHE (Sofroniew, 2015). Por lo tanto, los astrocitos A2 demuestran ser reguladores fundamentales de las propiedades endoteliales de la BHE, según el contexto, a través de mecanismos moleculares de señalización específicos. Por otro lado, hay estudios que indican que la vía de señalización gp130-JAK2-STAT3 es un regulador

crítico de las funciones antiinflamatorias de los astrocitos al mediar la formación de cicatrices que restringen la propagación de leucocitos y patógenos microbianos tras distintos tipos de lesión (Sofroniew, 2015).

Las moléculas efectoras intercelulares que median en las funciones antiinflamatorias de los astrocitos también están siendo identificadas. Por ejemplo, en respuesta a IL-10, los astrocitos liberan moléculas como TGF- β , que promueven la remisión de la inflamación (Cekanaviciute et al., 2014). Además, algunas de estas moléculas liberadas por los astrocitos tienen efectos antiinflamatorios sobre la microglía y los monocitos (Sofroniew, 2015).

Una forma indirecta de regulación antiinflamatoria es la activación de mecanismos de señalización intracelular que suprimen los activadores proinflamatorios. Por ejemplo, la señalización de TNF- α no solo induce la producción de NF κ B, sino que, mediante otra ruta, también induce su supresión y la de quimiocinas proinflamatorias liberadas por leucocitos (Wang et al., 2013; Catrysse et al., 2014). Así, la regulación temporal de todos estos mecanismos puede contribuir a disipar la inflamación del SNC a lo largo del tiempo.

3.- NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN

La neuroinflamación es un complejo mecanismo de protección del organismo dirigido a aislar la zona del SNC afectada, destruir las células dañadas y restaurar la integridad tisular. Estas respuestas de defensa del huésped son generalmente beneficiosas, ya que limita la supervivencia y la proliferación de patógenos invasores y promueve la supervivencia del tejido. Sin embargo, cuando la neuroinflamación se vuelve crónica, en lugar de ser protectora, es perjudicial para el SNC (Figura 8) (Kabba et al., 2018).

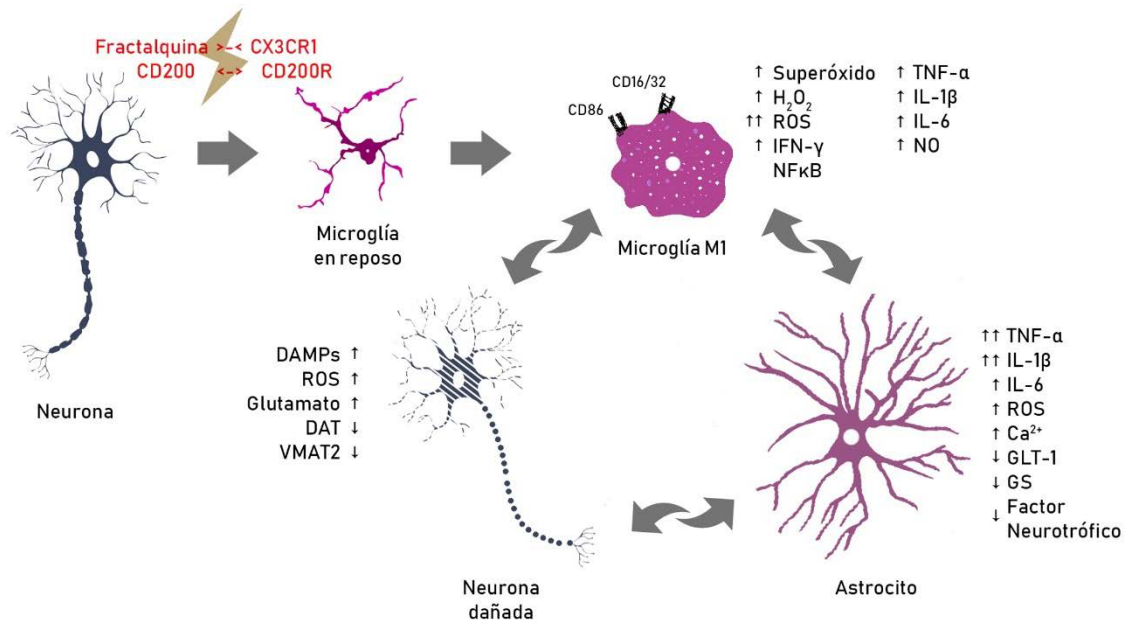


Fig. 8. Activación de las células gliales. Ante un daño, se pierde la interacción entre CD200 neuronal y su receptor y, a su vez, la fractalquina es secretada por las neuronas para unirse a su receptor microglial. Esto provoca la activación de la microglía en reposo hacia el fenotipo M1, que secreta moléculas proinflamatorias. A su vez, esto provoca la astrogliosis. Los astrocitos reactivos también liberan citoquinas proinflamatorias e inhiben la liberación de moléculas antiinflamatorias. Microglía y astrocitos se comunican entre sí perpetuando el daño neuronal y estableciendo un círculo vicioso de inflamación y neurodegeneración. Modificado de Beardsley and Hauser, 2014 y Du et al., 2016. **Ca⁺⁺**: ion calcio; **DAMP**: patrones moleculares asociados a daño; **DAT**: transportador de dopamina; **GLT-1**: receptor de glutamato; **GS**: glutamina sintetasa; **H₂O₂**: peróxido de hidrógeno; **IFN-γ**: interferón γ; **IL**: interleuquina; **NFκB**: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas; **NO**: óxido nítrico; **ROS**: especies reactivas de oxígeno; **TNF-α**: factor de necrosis tumoral α; **VMAT2**: transportador vesicular de monoaminas 2.

Por otro lado, la neurodegeneración se caracteriza por la pérdida de poblaciones selectivas de neuronas en las regiones cerebrales relacionadas con funciones concretas (Kabba et al., 2018). Las enfermedades neurodegenerativas más conocidas y estudiadas incluyen la EP, la EA, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis múltiple (EM), que durante mucho tiempo se ha considerado una enfermedad principalmente inflamatoria autoinmune (Lassmann et al., 2012). Sin embargo, en la EM se han descrito alteraciones axonales que están asociadas con la neuropatología clínica (Baufeld et al., 2017), reconociendo que la enfermedad es una combinación de procesos inflamatorios y neurodegenerativos, generalmente en las etapas avanzadas de la enfermedad (Chaudhuri, 2013; Kawachi and Lassmann, 2017).

Así, la división que tradicionalmente se hacía entre enfermedades inflamatorias y enfermedades neurodegenerativas cambia con el concepto de neuroinflamación no solo en la EM sino en el resto de enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha demostrado que, en todas estas enfermedades, la microglía y los astrocitos son los principales mediadores celulares de la inflamación durante el proceso de muerte neuronal (Walker and Jucker, 2015).

La característica más distintiva de la **microglía** es su rápida activación en respuesta al cambio patológico en el SNC. Aunque tiene un papel crítico en la defensa del huésped al eliminar microorganismos invasores y células neoplásicas, o al secretar factores neurotróficos, la microglía puede agravar los efectos de la inflamación y causar degeneración neuronal (Salter and Stevens, 2017). Se postula que la microglía activada puede ser el desencadenante activo de la muerte neuronal, que a su vez activa a los astrocitos y que esta activación y la inflamación resultan, principalmente, de la formación de agregados de proteínas endógenas (Fricker et al., 2018). Las alteraciones de las funciones fisiológicas de la microglía como son los mecanismos de liberación de moléculas inflamatorias y de fagocitosis están altamente asociados a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Fricker et al., 2018).

Se ha demostrado que la secreción de *intermediarios inflamatorios* está alterada en varias enfermedades neurodegenerativas como EP, EA, EH o ELA, de forma que, tanto en modelos animales como tejido *post mortem* y biofluidos (LCR y plasma) de pacientes con estas enfermedades, se ha visto que las proteínas del complemento, las citoquinas y las quimiocinas están sobreexpresadas (Silvestroni et al., 2009; Wild et al., 2011; Kobayashi et al., 2013; Heneka et al., 2014; Hong et al., 2016; Joers et al., 2017).

La disminución de la *fagocitosis* en las células microgliales puede contribuir a la acumulación de proteínas, como ocurre en la EP con la α -sin (Tremblay et al., 2019), en ELA con la superóxido dismutasa (SOD) mutada (mSOD1) (Heneka et al., 2014), en EA con el A β (Griciuc et al., 2013) y en EH con la huntingtina mutada (mHtt) (Kwan et al., 2012). En EP, esta alteración conduce a la agregación de α -sin y, por consiguiente, a otras alteraciones como la disfunción de la mitocondria

(Tapias et al., 2017) o la autofagia (Tremblay et al., 2019), ya que estas proteínas tienen capacidad inmunoestimulante.

Los **astrocitos** reactivos también juegan un papel crucial en las enfermedades neurodegenerativas. Tienen un abanico más amplio de funciones que la microglía y, en condiciones patológicas, algunas se encuentran alteradas. Esto incluye cambios en la homeostasis del glutamato, del metabolismo energético y la homeostasis de iones (Ben Haim et al., 2015; Robel et al., 2015; Seidel et al., 2015), entre otras.

La alteración de la captación de glutamato es probablemente una de las disfunciones de los astrocitos más estudiadas en las enfermedades neurodegenerativas (Soni et al., 2014). La captación ineficiente de glutamato conduce a una sobreestimulación de sus receptores, que causa la muerte neuronal por exitotoxicidad, siendo éste un mecanismo patológico ampliamente descrito en las enfermedades neurodegenerativas (Ben Haim et al., 2015).

La agregación de proteínas mal plegadas de manera intra o extracelular es una característica central de muchas enfermedades neurodegenerativas. Las proteínas mal plegadas se degradan por dos vías intracelulares principales: la autofagia y el sistema UPS. El sistema UPS ha sido ampliamente estudiado en neuronas de modelos de enfermedades neurodegenerativas e incluso es un objetivo de la neuroprotección (Margulis and Finkbeiner, 2014; Popovic et al., 2014) pero en astrocitos y microglía, el sistema no se ha investigado tan en profundidad. Se sugiere que los astrocitos son más eficientes que las neuronas en la eliminación de proteínas tóxicas, ya que por un lado los agregados proteicos se encuentran principalmente en las neuronas (Jansen et al., 2014) y, por otro lado, el sistema UPS es más activo en las células gliales tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, una menor actividad del sistema UPS en neuronas contribuye de manera importante a la acumulación preferencial de proteínas mal plegadas en las neuronas, tal y como se observa en la EP (de la que se hablará más adelante) o la EH (Ben Haim et al., 2015). Por otro lado, se ha visto que las subunidades del proteasoma están reguladas negativamente en astrocitos de pacientes con EA (Simpson et al., 2011). Además, en las enfermedades neurodegenerativas, los astrocitos reactivos pueden expresar una forma específica del proteasoma,

llamada inmunoproteasoma, que está formada por las subunidades inducibles por citoquinas $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$. El inmunoproteasoma se detecta en astrocitos reactivos alrededor de placas amiloides en ratones y pacientes con EA (Orre et al., 2013) y en la médula espinal de ratones de ELA (Puttapparthi and Elliott, 2005).

En resumen, sin el proceso de neuroinflamación, la eliminación de patógenos y la recuperación de lesiones del SNC podrían verse comprometidas. Sin embargo, en las enfermedades neurodegenerativas, las moléculas dañinas liberadas de forma constante por la microglía y/o los astrocitos reactivos, generalmente, eclipsan a las moléculas beneficiosas, por lo que se considera que el efecto global de la activación glial es perjudicial (Le et al., 2016).

3.1.- Neuroinflamación y enfermedad de Parkinson

3.1.1.- Microglía en la enfermedad de Parkinson

El papel de la inflamación en la patogenia de la EP se propuso tras el descubrimiento por parte de McGeer y colaboradores de la presencia de microglía activada en la SNpc y en el putamen de pacientes con EP (McGeer et al., 1988; McGeer and McGeer, 2004), así como en otras áreas cerebrales como el hipocampo, la corteza cingulada y temporal (Imamura et al., 2003) y el *locus coeruleus* (Hirsch and Hunot, 2009).

3.1.1.1.- Liberación de intermediarios inflamatorios

Se ha demostrado que existe una relación entre el aumento de mediadores inflamatorios y la EP a través de diversos tipos de estudios.

En **tejido post mortem** de pacientes con EP, Mogi y colaboradores (Mogi et al., 1994a) observaron un aumento de *citoquinas proinflamatorias* como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IFN- γ en el estriado. En la SNpc también se han hallado niveles elevados de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ (Mogi et al., 2007; Hirsch and Hunot, 2009; Joers et al., 2017) y del receptor de TNF- α , que se expresa en las neuronas dopaminérgicas, (Hirsch and Hunot, 2009). El aumento de estas moléculas provoca la expresión de

otros intermediarios inflamatorios como iNOS y COX-2, que también se han visto elevadas en la SNpc de pacientes con EP (Hirsch and Hunot, 2009; Du et al., 2016; Joers et al., 2017).

Por otro lado, Yamada y colaboradores fueron los primeros en demostrar la participación del sistema del complemento en la EP al observar que los LB eran positivos para las proteínas C3d, C4d, C7 y C9 (Yamada et al., 1992). Más tarde, (McGeer and McGeer, 2004) observaron que había un aumento en los niveles de ARN mensajero (ARNm) para proteínas del complemento en las regiones cerebrales afectadas por la EP (McGeer et al., 2017).

Estos cambios moleculares observados en el cerebro de pacientes con EP han sido reproducidos en varios modelos animales de la enfermedad. Así, tanto en modelos inducidos por neurotoxinas (MPTP, 6-OHDA o LPS) como por sobreexpresión de α -sin, se han observado niveles aumentados de mediadores proinflamatorios como NO, IFN- γ , IL-6, y TNF- α (Hirsch and Hunot, 2009; Joers et al., 2017).

En el estriado de pacientes con EP también se han hallado niveles elevados de *mediadores antiinflamatorios* como TGF- β y el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Mogi et al., 1994b, 1995). Sin embargo, en modelos animales de parkinsonismo inducidos por MPTP y por LPS, la expresión de las citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 y de los marcadores CD206, YM-1, Arg-1 y FIZZ-1, se han observado disminuidos en la SNpc (Joers et al., 2017). Algunos estudios donde se mide el nivel de IL-4 en tejido de animales con parkinsonismo inducido por MPTP muestran que esta citoquina está aumentada. Lo mismo ocurre con IL-13. Estas citoquinas son consideradas antiinflamatorias, sin embargo, estos estudios muestran efectos citotóxicos en neuronas y glía (Mori et al., 2016), lo que podría explicar su aumento de expresión en estos modelos.

Asimismo, mediante estudios de microarrays se confirmó el incremento de la expresión de genes relacionados con la inflamación como los de la vía de NF κ B en la SNpc de pacientes con EP (Moran et al., 2007; Moran and Graeber, 2008; Simunovic et al., 2009). NF κ B ha sido reconocida como una vía clave en la activación de la microglía y el aumento de la producción de citoquinas

proinflamatorias (Fellner et al., 2013). Por tanto, la activación persistente de NFκB en neuronas y glía se ha asociado con la neurodegeneración en la EP tanto en modelos animales como en tejido *post mortem* de pacientes con EP (Dresselhaus and Meffert, 2019), mientras que la inhibición de esta vía confiere neuroprotección en modelos animales de parkinsonismo y cultivos microgliales al amortiguar las respuestas inflamatorias (Feng et al., 2019). En general, los factores de transcripción que promueven la inflamación, como NFκB, STAT3, AP1 y TLR, están regulados positivamente en la EP, mientras que las vías neuroprotectoras como mTOR, TGF-β e YY1, que protegen contra la toxicidad de la α-sin, están reguladas negativamente en la microglía de pacientes con EP (Pal et al., 2016).

En el LCR de pacientes con EP también se ha descrito un aumento de los niveles de *citoquinas proinflamatorias* como TNF-α, IL-1β e IL-6 (Yu et al., 2014; Du et al., 2016; Delgado-Alvarado et al., 2017; Joers et al., 2017; Chen et al., 2018) y de quimiocinas como CXCL10 o CXCL12 (Liu et al., 2019), sugiriendo que la microglía adquiere un fenotipo proinflamatorio en la enfermedad (Joers et al., 2017). El IFN-γ, sin embargo, se ha visto reducido en LCR de pacientes con EP con deterioro cognitivo leve (Yu et al., 2014).

Por otro lado, hay estudios que no observaron diferencias en el LCR de pacientes con EP frente al de individuos sanos en proteínas implicadas en la inflamación como la proteína C reactiva o la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (Joers et al., 2017). Sin embargo, estas proteínas se han correlacionado con la depresión y la fatiga de pacientes con EP, sugiriendo un papel para la producción de citoquinas en síntomas no motores de la enfermedad (Joers et al., 2017). Las proteínas del complemento C3b y C4b, al contrario de lo que ocurre en tejido, están disminuidas en el LCR de pacientes con EP (Finehout et al., 2005).

La quimiocina CX3CL1 ha sido estudiada en LCR, pero hay resultados variables. Mientras que Gui y colaboradores observaron una expresión reducida de CX3CL1 en exosomas extraídos del LCR de pacientes con EP comparados con controles sanos (Gui et al., 2015), Shi y colaboradores afirmaron no encontrar diferencias entre pacientes y controles. De hecho, los niveles de CX3CL1 tendían a ser mayores en los pacientes con EP que en los controles, los cuales correlacionaban con una peor progresión clínica (Shi et al., 2011). Este aumento de

CX3CL1 también ha sido observado más recientemente por Liu y colaboradores (Liu et al., 2019).

En cuanto a *mediadores antiinflamatorios*, en LCR de pacientes con EP se han encontrado niveles aumentados de TGF- β 1 (Masuda et al., 2017; Chen et al., 2018) y TGF- β 2 (Vawter et al., 1996), los cuales juegan un papel en la inhibición de la inflamación y la reparación de tejido cerebral dañado. También se ha reportado aumento en las citoquinas IL-12, IL-4 e IL-10 (Joers et al., 2017; Liu et al., 2019).

En **plasma** de pacientes con EP también se ha descrito un aumento de *factores proinflamatorios* como las citoquinas IL-6, TNF- α , INF- γ (Pal et al., 2016), IL-1 e IL-2 (Brodacki et al., 2008) y quimiocinas como RANTES (Qin et al., 2016; Liu et al., 2019), que correlacionan con la severidad de la EP. En esta misma línea, se ha demostrado que un incremento de los niveles de IL-6 en suero de pacientes con EP correlaciona negativamente con la gravedad de la enfermedad (Delgado-Alvarado et al., 2017; Green et al., 2019). En plasma de pacientes con EP también hay un aumento de mediadores inflamatorios como la proteína del complemento C3c (Goldknopf et al., 2006) y el ARNm de iNOS (Wu et al., 2014) respecto a controles sanos.

Por otro lado, hay estudios que han encontrado anticuerpos que reconocen varios componentes de las neuronas dopaminérgicas en el suero de pacientes con EP (Hirsch and Hunot, 2009). También se ha detectado un incremento de LT reactivos frente a una disminución de los LT no activados, lo que indica infiltración linfocítica en el SNC. Además, estos LT reactivos muestran un fenotipo proinflamatorio (Hirsch and Hunot, 2009).

Las *citoquinas antiinflamatorias* IL-12, IL-4 e IL-10, se han encontrado elevadas en plasma de pacientes con EP (Joers et al., 2017) mientras que los de EGF están disminuidos. De hecho, niveles bajos de este factor de crecimiento está correlacionado con una cognición más pobre en EP (Lim et al., 2016) y con los déficits motores de la enfermedad (Jiang et al., 2015).

En resumen, los estudios en humanos han demostrado un aumento de las citoquinas pro y antiinflamatorias en pacientes con EP, lo que sugiere que ambos fenotipos pueden coexistir en algunas etapas de la enfermedad y es probable que

los cambios complejos en los estados activados de la microglía potencien la neuropatología de la EP (Joers et al., 2017). Estos cambios celulares y moleculares observados en los cerebros de pacientes con EP se han reproducido en varios modelos animales. Así, se ha observado activación microglial y secreción de mediadores proinflamatorios en modelos animales de parkinsonismo inducidos por tóxicos, modelos genéticos y modelos inducidos por sobreexpresión de α -sin, como se describirá más adelante. Sin embargo, en los modelos animales, las citoquinas antiinflamatorias y los factores de crecimiento se ven reducidos, lo que sugiere que la degeneración de las neuronas dopaminérgicas inducida por toxinas está asociada con la prevalencia de microglía proinflamatoria en detrimento de la antiinflamatoria, y que esto puede aumentar la degeneración neuronal (Joers et al., 2017).

3.1.1.2.- Estudios genéticos

Los estudios genéticos también han aportado pruebas de la implicación de la neuroinflamación en la EP. Varios estudios genéticos han investigado la asociación entre el polimorfismo en genes relacionados con el sistema inmune y la EP. Así, se ha descrito que los polimorfismos en los genes del sistema de antígeno leucocitario humano (*HLA*) (Aliseychik et al., 2018) constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de EP. *HLA* codifica las principales proteínas del MHC. Las sustituciones de un solo nucleótido en las regiones codificantes de los genes *HLA-DP*, *HLA-DQ* y *HLA-DR* afectan la capacidad de la molécula MHC-II de formar complejos estables con péptidos, lo que afecta directamente la eficiencia de la presentación del antígeno (Aliseychik et al., 2018).

El papel de *LRRK2* en la respuesta inmune se propuso por primera vez debido a su expresión en LB, células dendríticas y macrófagos (Gardet et al., 2010) y en células microgliales aisladas de ratón (Gillardon et al., 2012). Estudios en los que se administraba LPS a cultivos celulares de microglía transgénica para *LRRK2* con la mutación R1441G o de neuronas corticales, mostraban aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , and IL-6 y niveles reducidos de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 en comparación con los

controles (Gillardon et al., 2012). Además, posteriormente, otros trabajos confirmaron un vínculo entre la mutación G2119S y una respuesta inflamatoria inducida por LPS elevada, que incluía la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e iNOS (Kim et al., 2012; Moehle et al., 2012).

Por último, polimorfismos en los genes *TNFA*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL8* e *IL18*, que codifican para citoquinas, el gen que codifica para iNOS y el del receptor de monocitos CD14 han sido asociados con el riesgo de padecer EP (Gupta et al., 2014; Tufekci et al., 2012). La alta expresión de estos mediadores puede contribuir a una degeneración neuronal dopaminérgica más rápida. En este contexto, un perfil genético proinflamatorio más alto confiere un mayor riesgo de desarrollar EP (Lindenau et al., 2017; Redenšek et al., 2019).

3.1.1.3.- Agregación de α -sin y microglía

Como en otras enfermedades neurodegenerativas, en la EP, la formación de agregados proteicos puede inducir la activación microglial. Varios estudios demostraron que los CL extracelulares en la SNpc a menudo están rodeados por microglía y mediadores inflamatorios (McGeer et al., 1988; Yamada et al., 1992). A nivel del estriado, la α -sin se asocia con la aparición de microglía activada, el aumento en la expresión de MHC-II y niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IFN- γ y TNF- α , lo que se asocia a depleción de terminales dopaminérgicos (Chung et al., 2010a; Sanchez-Guajardo et al., 2010).

En el tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EP, la microglía también expresa niveles más altos de CD68, lo que indica **actividad fagocítica** (McGeer et al., 1988; Croisier et al., 2005). La participación de la fagocitosis microglial en la patogénesis de la EP se ve respaldada por el hecho de que la microglía capta y elimina los restos de neuronas dopaminérgicas *in vivo* (Tremblay et al., 2019). Estos datos sugieren que los agregados de α -sin extracelular serían detectados e internalizados por la microglía, provocando aumento en las ROS y liberación de citoquinas proinflamatorias (Sanchez-Guajardo et al., 2010; Zhang et al., 2018; Tremblay et al., 2019). Además, la agregación de α -sin se acompaña de activación

de la vía NF κ B, infiltración de LT CD4⁺ y depósito de IgG alrededor de las neuronas en proceso degenerativo (Harms et al., 2013). Sánchez-Guajardo y colaboradores describieron dos patrones distintos de cambios inflamatorios según el grado de muerte celular. El primero consiste en un cambio temprano y transitorio en el número de microglía activada y una expresión del MHC-II asociado al incremento en la expresión de α -sin con ausencia de muerte neuronal en la SNpc. La segunda respuesta, que ocurre cuando hay muerte neuronal, sería más prolongada y correlacionaría con la expresión de CD68 y la infiltración de LT. Por tanto, uno de los primeros eventos en la inflamación asociada con la sobreexpresión de α -sin es el aumento de expresión de MHC-II en microglía activada (Sanchez-Guajardo et al., 2010; Harms et al., 2013). De hecho, MHC-II es un elemento crítico para la activación microglial inducida por α -sin (Harms et al., 2013). El aumento de los niveles de MHC-II implica mayor reconocimiento de antígenos por parte de la microglía, lo que aumenta la proliferación de LT CD4⁺ y promueve la expresión de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias (Harms et al., 2013). Además, la presencia de neuromelanina dentro de la microglía activada apoya la idea que las neuronas dopaminérgicas dañadas en la SNpc probablemente se fagocitan, lo que permite que la α -sin patógena se someta a procesamiento y a la presentación del antígeno por parte de la microglía (Martin-Bastida et al., 2017).

Las neuronas en proceso de neurodegeneración pueden secretar tanto monómeros como agregados de α -sin a través de la exocitosis (Jucker and Walker, 2018; Whiten et al., 2018). El estudio de Feng y colaboradores demostró que la forma agregada es la que activa la microglía (Feng et al., 2019) y, que además, es la que inhibe la fagocitosis microglial a través del bloqueo de la señalización Fc γ R (Park et al., 2008; Choi et al., 2015). Asimismo, las neuronas apoptóticas pueden secretar moléculas conocidas como señales *find me* como es el caso de CX3CL1, que cuando se une a su receptor microglial, provoca su migración hacia la célula dañada (Tremblay et al., 2019).

Watson y colaboradores demostraron, a través de un modelo animal que sobreexpresaba α -sin, que los agregados y no las formas monoméricas de esta proteína causaban una respuesta inflamatoria selectiva concomitante a la pérdida neuronal, con expresión aumentada de citoquina TNF- α y receptores TLR en la

SNpc y el estriado (Watson et al., 2012). Además, se sugiere que estos agregados proteicos inducen una respuesta microglial M1 (al activar la vía NFκB) a través de su reconocimiento por parte de los receptores TLR4 o TLR1/2 (Feng et al., 2019). Stefanova y colaboradores mostraron que la deficiencia de TLR4 impide la capacidad de la microglía para eliminar la α -sin en un modelo de ratón transgénico con ablación de TLR4 y que sobreexpresaba α -sin humana (h α -sin), lo que resultó en una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, muerte neuronal y disfunción motora (Stefanova et al., 2011). Los agregados de proteínas compuestos por α -sin pueden generarse *in vitro*, y se ha demostrado que estos interactúan, además, con otros receptores microgliales como CD36 y CD11b (Zhang et al., 2007; Su et al., 2008; Lee et al., 2010). Estos datos sugieren que la función fagocítica de la microglía es importante para ralentizar la progresión de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación patológica de proteínas (Nayak et al., 2014).

La α -sin, además de por las neuronas, se degrada por la microglía tanto por el sistema UPS como por **la autofagia**, y esta última vía se incrementa en varios modelos animales de EP inducidos por toxinas, lo que sugiere que la autofagia puede ser el principal mecanismo para el aclaramiento de α -sin. Sin embargo, cuando este sistema se satura, la α -sin se acumula y se vuelve neurotóxica (Nash et al., 2017; Tremblay et al., 2019).

Se sabe que las mutaciones en el gen de DJ-1 están asociadas con EP autosómica recesiva. Varios estudios que observaron que el *knock down* (KD) o pérdida de actividad de DJ-1 conduce a un aumento de las respuestas inflamatorias de la microglía a la DA y a un aumento de la neurotoxicidad (Nash et al., 2017). Además, reduce la expresión de la balsa lipídica de la superficie celular en la microglía, lo que deteriora su capacidad de captar α -sin soluble y de eliminarla a través de la autofagia (Tremblay et al., 2019).

3.1.2.- Astrocitos en la enfermedad de Parkinson

El marcaje de la proteína GFAP mediante inmunohistoquímica fue clave para la descripción de la astrogliosis en la EP, encontrándose una mayor densidad

de células positivas para GFAP alrededor de las neuronas dopaminérgicas en tejido *post mortem* de pacientes (Damier et al., 1993). El número de astrocitos GFAP⁺ fue inversamente proporcional a la depleción de neuronas dopaminérgicas (Damier et al., 1993), lo que indica que los astrocitos tienen un papel relevante en la regulación de la neuroinflamación en la EP (Jiang et al., 2018). Además, estos astrocitos eran distróficos (Braak et al., 2007).

3.1.2.1.- Liberación de intermediarios inflamatorios

Se ha descrito que los astrocitos reactivos expresan enzimas como COX-2 y mieloperoxidasa (MPO) y liberan **mediadores proinflamatorios** como las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6, quimiocinas que incluyen MCP-1 α , MIP- α , CXCL-8, MAC, CCL2, CCL3 y CCL5, la proteína del complemento C3 y pequeñas moléculas como prostaglandinas y NO, que aumentan el estrés oxidativo (Brück et al., 2016; Carta et al., 2017; Liddelw and Barres, 2017b; Loria et al., 2017). El aumento de dichos factores inflamatorios causa un efecto nocivo sobre la supervivencia neuronal (Liddelw and Barres, 2017a) y promueven la infiltración de macrófagos y linfocitos en el parénquima cerebral, ya que se sabe que esta liberación se produce al borde de los vasos sanguíneos, cerca de las áreas de degeneración, dañando la BHE y haciéndola más permeable (Jiang et al., 2018). De hecho, solo la disfunción de los astrocitos es suficiente para que se produzca degeneración y muerte neuronal (Loria et al., 2017). Las quimiocinas secretadas están involucradas en funciones como la migración de la microglía y progenitores neurales, la regulación de la actividad microglial, la proliferación y supervivencia de los astrocitos y la plasticidad y transmisión sináptica. Además, inducen la liberación de glutamato y la síntesis de más citoquinas y quimiocinas en los astrocitos (More et al., 2013). En el caso de la MPO, que es un enzima relacionado con el estrés oxidativo que se expresa en astrocitos reactivos durante la inflamación, se han encontrado niveles aumentados en el cerebro de pacientes con EP y modelos animales de parkinsonismo inducido por MPTP. MPO oxida el nitrito no reactivo (cuya concentración se incrementa en la EP) a nitrito reactivo y, por lo tanto, es capaz de nitrosilar a una gran cantidad de proteínas (More et al., 2013).

La liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los astrocitos viene inducida por la microglía, debido a que los astrocitos se comunican con la microglía para amplificar la respuesta inmune y activar mecanismos apoptóticos, induciendo la muerte neuronal dopaminérgica. Esta comunicación es bidireccional, ya que la liberación de mediadores inflamatorios por parte de los astrocitos activados también podría aumentar la activación de la microglía, contribuyendo a la pérdida progresiva de la función neuronal (Loria et al., 2017). El objetivo de esta comunicación entre células gliales es promover la supervivencia neuronal, pero la activación glial sostenida en el tiempo podría favorecer la degeneración dopaminérgica (Loria et al., 2017). La activación de los astrocitos se considera una respuesta que, aunque inicialmente es beneficiosa, luego resulta perjudicial a medida que avanza la enfermedad (Ben Haim et al., 2015). Por ejemplo, en tejido *post mortem* de pacientes con EP, la exposición de astrocitos no reactivos al IFN- γ inicia la expresión de las moléculas del MHC-II en estas células, lo que hace que las células astrogiales se comporten como células presentadoras de antígenos (APC) (Vardjan et al., 2015). Esto provocaría la activación de la vía NF κ B, que puede aumentar la liberación de la proteína del complemento C3a por parte de los astrocitos y, a su vez puede contribuir a la neurodegeneración al estimular la liberación de citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo/nitrosativo y la expresión de iNOS y COX-2 (Lian et al., 2016; Bellaver et al., 2017; Diniz et al., 2019).

Por otro lado, los astrocitos ejercen funciones neuroprotectoras liberando una variedad de **factores tróficos** (Fujita et al., 2018) que incluyen BDNF, GDNF, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico dopaminérgico cerebral (CDNF) y el factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF). La expresión de BDNF se demostró en los astrocitos que rodean a las neuronas dañadas de la SNpc en cerebros de pacientes con EP (Knott et al., 2002). Hay discrepancias en los resultados obtenidos con este factor, ya que en LCR se ha reportado tanto incremento (Pöyhönen et al., 2019) como disminución (Nagatsu and Sawada, 2005) en pacientes con EP, mientras que en tejido *post mortem*, el BDNF está disminuido en la SNpc (More et al., 2013). Esta discrepancia podría deberse a que este factor se estudia por inmunohistoquímica en la SNpc, y solo se detecta en las neuronas dopaminérgicas que sobreviven (More et al., 2013). CDNF

y MANF han demostrado ejercer efectos beneficiosos en la protección y reparación neuronal dopaminérgica en varios modelos de parkinsonismo (Carta et al., 2017). Por otro lado, en los astrocitos del estriado en un modelo animal de 6-OHDA, la expresión del ARNm de GDNF, que es la neurotrofina que más protección confiere a las neuronas dopaminérgicas (Papa et al., 2014), se encuentra aumentada (Pöyhönen et al., 2019). Una sobreexpresión moderada de GDNF a través de vectores virales es suficiente para observar un efecto protector contra una lesión inducida por 6-OHDA (Tenenbaum and Humbert-Claude, 2017).

Además, los astrocitos pueden tener funciones neuroprotectoras a través de la sobreexpresión de Nrf2, que controla la biosíntesis de moléculas antioxidantes como el glutatión y la hemooxigenasa-1, así como genes reguladores del ciclo celular. La expresión de Nrf2 en los astrocitos confiere neuroprotección en el modelo de parkinsonismo inducido por MPTP, y aumenta la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de α -sinucleinopatía (Ferrer, 2017).

El glutatión es un péptido antioxidante que liberan los astrocitos en respuesta al estrés oxidativo. El estudio de Sandhu y colaboradores describió en cocultivos celulares de neuronas y astrocitos que son estos últimos los que liberan glutatión en respuesta a la toxicidad inducida por 6-OHDA (Sandhu et al., 2009). Este péptido está disminuido en la SNpc de pacientes con EP (Rizor et al., 2019). La actividad de los enzimas relacionados con el glutatión, como la glutatión peroxidasa (Gpx), cuya principal función biológica es proteger al organismo del daño oxidativo, aumenta en los astrocitos del estriado tanto en pacientes como en modelos animales de EP (Brück et al., 2016). El nivel de Gpx correlaciona negativamente con la depleción dopaminérgica de pacientes con EP (Damier et al., 1993). Savaskan y colaboradores demostraron que el nivel de la proteína Gpx4 aumenta en los astrocitos tras una lesión neurodegenerativa de la corteza entorrinal. En muestras corticales de pacientes con EP, las proteínas Gpx3 y Gpx4 también están elevadas en comparación con los sujetos control (Savaskan et al., 2007). De hecho, se encontró que los niveles de proteínas oxidadas eran significativamente más altos en la SNpc en comparación con la corteza frontal y los ganglios basales, lo que sugiere que el daño oxidativo en la EP es específico de la

región cerebral y puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Rizor et al., 2019). Sin embargo, en otros estudios, la actividad de los enzimas antioxidantes Gpx, SOD y catalasa está disminuida en la SNpc (Rizor et al., 2019) y en LCR (Martín de Pablos et al., 2015) de pacientes con EP y, como consecuencia, se observan niveles elevados de metabolitos oxidativos que provocan daño en el ADN (Rizor et al., 2019). Otros enzimas como la glutatión transferasa, ferroxidasa, ferritina y ceruloplasmina también están significativamente reducidos en el LCR de pacientes con EP respecto a controles sanos (Maarouf et al., 2012).

Además, el sulfuro de hidrógeno, un posible agente antiinflamatorio y neuroprotector, disminuye su expresión tras la activación astrogliar, lo que indica un posible papel en la neurodegeneración (Brück et al., 2016). Por último, GDF15, un miembro de la superfamilia de la TGF- β liberada por los astrocitos, confiere neuroprotección contra el MPTP en un modelo de cocultivo de astrocitos y neuronas dopaminérgicas procedentes de SNpc de rata (Kostuk et al., 2019).

3.1.2.2.- Disfunciones de los astrocitos en la EP

Los astrocitos durante la EP sufren alteraciones en sus funciones fisiológicas, lo que, podrían estar favoreciendo la neurodegeneración. Estas alteraciones se han demostrado a través del uso de modelos animales de EP y el estudio de los factores genéticos anteriormente mencionados que contribuyen con la enfermedad. Así, en modelos de ratón MPTP, se ha observado que la expresión del transportador de **glutamato** GLT-1 en la SNpc y, por tanto, la captación de glutamato, está disminuida en los astrocitos (Zhan et al., 2017; Zhang et al., 2017). Otros apuntan a que una de las causas del aumento en la captación de glutamato es la alteración de los transportadores vesiculares de GABA (vGAT) y glutamato (vGLUT) (Cabezas et al., 2014).

La proteína DJ-1 se expresa en astrocitos y su deficiencia provoca que estas células muestren una absorción de glutamato alterada (Tabla 2). Se demostró que este efecto se debe a una disminución en la expresión del transportador EAAT2. Esta reducción en la absorción de glutamato puede dar lugar a altos niveles de

glutamato en el espacio extracelular, lo que conduce a la excitotoxicidad neuronal y, más tarde, a neurodegeneración (Booth et al., 2017). La deficiencia de DJ-1 en los astrocitos también reduce la capacidad de proteger las neuronas contra la neurotoxicidad en los modelos de rotenona y 6-OHDA (Booth et al., 2017).

Como se ha explicado anteriormente, los astrocitos reactivos secretan NO, una molécula de señalización celular. Un mecanismo de señalización de NO es la S-nitrosilación. Algunos estudios han demostrado que los transportadores de glutamato astrocíticos EAAT1 y EAAT2 son nitrosilados y que esto provoca la inhibición reversible de la captación de glutamato. En modelos animales KO para *NOS1* (gen que codifica para el enzima NOS) exhibieron una disminución en la S-nitrosilación y, como consecuencia, aumentó la absorción de glutamato y se reestableció el ciclo de glutamato-glutamina en comparación con los ratones WT (Rizor et al., 2019).

La alteración de la S-nitrosilación también conduce a defectos como el mal plegamiento y agregación de proteínas y la interrupción de la **homeostasis iónica** (Rizor et al., 2019). Una S-nitrosilación aberrante aumenta el número y la permeabilidad de los hemicanales conexina-43 en los astrocitos de cultivos primarios de rata, lo que puede acelerar el deterioro neuronal (Rizor et al., 2019). La homeostasis del K^+ también se ve alterada, ya que se ha demostrado que la expresión del canal Kir4.1 aumenta en la EP (Rizor et al., 2019). La secreción de BDNF por parte de los astrocitos se ha relacionado con este canal de K^+ . Es este sentido, se ha observado que la inhibición de los canales Kir4.1 atenúa el tamponamiento de K^+ , aumenta la excitabilidad neuronal y aumenta la expresión de BDNF (Ohno et al., 2018), por lo que un aumento de expresión de canales de K^+ podría reducir la secreción de este factor neurotrófico, resultando en la disminución de la neuroprotección que los astrocitos ofrecen a las neuronas dopaminérgicas (Chen and Chan, 2005).

Las proteínas asociadas a la EP PINK1, parkina y DJ-1 regulan el **metabolismo de la glucosa** en astrocitos (Tabla 2). La expresión de PINK1 mutada conduce a una disminución de la captación de glucosa (Joe et al., 2018). La parkina interviene en la glucólisis, ya que regula directamente a su enzima

limitante, la piruvato quinasa M2, lo que altera el metabolismo general de la célula y su supervivencia (Joe et al., 2018). DJ-1 en los astrocitos metaboliza el metilglioxal, un producto tóxico de la glucólisis, a D-lactato. El metilglioxal se ha asociado con diabetes, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, la deficiencia de DJ-1 disminuye este metabolismo, lo que lleva a la acumulación de metilglioxal (Joe et al., 2018). Además, provoca que los astrocitos no puedan proteger del estrés oxidativo a las neuronas dopaminérgicas en cocultivo (Gorshkov et al., 2018).

Algunas de estas proteínas anteriormente mencionadas, además de GBA, también regulan la **función mitocondrial** en astrocitos (Tabla 2) (Joe et al., 2018). Así, la expresión de PINK1 mutada disminuye la producción de ATP y el consumo de oxígeno, mientras que aumenta la generación de ROS (Amo et al., 2011). Los astrocitos KO para *PINK1* muestran disfunción mitocondrial al disminuir el potencial de membrana y aumento de los niveles de ROS intracelular (Choi et al., 2013). Esto también contribuye a la disminución de la proliferación y diferenciación de astrocitos durante el desarrollo embrionario, al igual que la parkina (Joe et al., 2018). La parkina ha sido ampliamente implicada en la mitofagia. Se ha descubierto que, en los astrocitos KO para *PARK2*, se producía un incremento de los niveles de daño en las mitocondrias (Booth et al., 2017). DJ-1 tiene un papel en el mantenimiento de las mitocondrias de los astrocitos, ya que la pérdida de función de esta proteína reduce la motilidad mitocondrial y la fisión de las mismas de la misma manera que el tratamiento con rotenona (Booth et al., 2017). Las neuronas y astrocitos KO para *GBA* muestran una disminución del potencial de membrana mitocondrial en reposo y una mayor fragmentación mitocondrial, la cual es más severa en los astrocitos que en las neuronas (Booth et al., 2017).

LRRK2 se ha implicado ampliamente en la vía de la **autofagia** de los astrocitos (Tabla 2) en varios modelos de EP. Durante el inicio de la autofagia, la proteína LC3, una proteína relacionada con la biogénesis del autofagosoma, se lipida (es decir, se le añaden moléculas hidrofóbicas) y se transporta a la membrana de las vesículas autofágicas. La inhibición de la actividad de LRRK2 aumenta la lipidación de LC3 en cultivo de astrocitos primarios humanos. Esto

puede indicar o bien una inducción de la formación de autofagosoma o bien la inhibición de la degradación del mismo. Además, se ha demostrado que la expresión de LRRK2 con algunas de las mutaciones que causan EP (R1441C, Y1699C y G2019S) en los astrocitos primarios de ratones portadores de la mutación, produce un aumento en el tamaño del lisosoma. Este efecto depende de la actividad de LRRK2 y está asociado con una reducción en el pH lisosómico. Por otro lado, cultivos primarios de astrocitos KO para *GBA* mostraron una reducción de LC3, lo que indica una disminución de esta vía en los astrocitos durante la EP (Booth et al., 2017).

Como ya se ha explicado, los astrocitos protegen a las neuronas del estrés oxidativo a través de la **eliminación de ROS** o de la **expresión de factores de crecimiento** (Tabla 2). En relación con el primer mecanismo, la parkina regula los niveles de glutatión en los astrocitos, por tanto, en astrocitos KO para *PARK2*, el nivel de glutatión se encuentra disminuido comparado con los WT, lo que implica una reducción en la capacidad neurotrófica de los astrocitos (Joe et al., 2018). En cuanto a los factores de crecimiento, se ha demostrado que la deficiencia de DJ-1 reduce la expresión de GDNF y BDNF en astrocitos (Choi et al., 2018).

En definitiva, ha quedado probado que la disregulación de las funciones específicas de los astrocitos provocada por alteraciones en los genes relacionados con la EP, contribuye a la disfunción de los astrocitos en la enfermedad.

Funciones de los astrocitos	Genes que regulan la función astrogial
Homeostasis del glutamato	<i>PARK7</i> (DJ-1)
Metabolismo de la glucosa	<i>PINK1, PARK2</i> (parkina), <i>PARK7</i>
Función mitocondrial	<i>PINK1, PARK2, PARK7, GBA1</i> (GBA)
Proliferación	<i>PINK1, PARK2</i>
Autofagia	<i>LRRK2, GBA1</i>
ROS intracelular	<i>PINK1, PARK2</i>
Producción de factores de crecimiento	<i>PARK7</i>

Tabla 2. Implicación de algunos de los genes (y proteínas que codifican) relacionados con el desarrollo de EP en las funciones de los astrocitos. Modificado de Joe et al., 2018. **GBA:** glucocerebrosidasa; **ROS:** especies reactivas de oxígeno.

3.1.2.3.- Agregación de α -sin y astrocitos

Braak y colaboradores describieron que el patrón de distribución topográfica de los astrocitos reactivos en tejido *post mortem* de pacientes con EP era muy similar al de los CL, indicando que la astrogliosis parece acompañar la formación de cuerpos de inclusión neuronales. En este estudio, los autores hipotetizan que la causa más probable de la reacción astrocítica puede ser la α -sin. Por tanto, del mismo modo que en la microglía, la mayoría de los estudios apuntan a la α -sin como un estimulador exógeno de astrocitos (Braak et al., 2007).

En cerebros *post mortem* de pacientes con EP, se observaron inclusiones de α -sin en astrocitos y neuronas (Wakabayashi et al., 2000; Hishikawa et al., 2001; Braak et al., 2007), lo que planteó la sugerencia de que los astrocitos captan la α -sin secretada por las neuronas (Lee et al., 2010; Braidy et al., 2013; Fellner et al., 2013; Rannikko et al., 2015), ya que los astrocitos no la expresan, al igual que la microglía. Por tanto, la detección de α -sin en estas células sugiere que deriva de neuronas y que, posteriormente, se transfiere intercelularmente. Song y colaboradores observaron que solo la astrogλία protoplasmática humana muestra una acumulación elevada de α -sin en la EP, mientras que no observaron cambios significativos en la astrogλία fibrosa (Song et al., 2009).

Los modelos animales de EP han demostrado que la acumulación de agregados de α -sin en los astrocitos promueve la secreción de ROS y de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o CXCL-1, lo que resulta en la activación microglial (Fujita et al., 2018) y viceversa, ya que también se ha demostrado que la microglía activada por fibrillas de α -sin induce la reactividad de los astrocitos (Yun et al., 2018). Las formas mutadas de α -sin inducen la expresión de IL-6 en astrocitos (Zhang et al., 2017). Sin embargo, el papel de la IL-6 en la neuroinflamación y en la EP es complejo. Aunque inicialmente se pensaba que era una citoquina puramente proinflamatoria, estudios posteriores han demostrado que también posee propiedades antiinflamatorias como, por ejemplo, antagonizar las acciones de la IL-1 β y el TNF- α , entre otras. La IL-6 es capaz tanto de inducir la agregación de ubiquitina, α -sin y tau en cultivos de células gliales (Bick et al., 2008) como de

neuroproteger neuronas dopaminérgicas en el modelo animal inducido por MPTP (Zhang et al., 2017).

La captación de α -sin por parte de los astrocitos ocurre a través de una vía de endocitosis independiente del receptor TLR4 (Fellner et al., 2013; Rannikko et al., 2015), si bien las altas concentraciones de α -sin extracelular inducen una respuesta inflamatoria dependiente de TLR4 en cultivos primarios de astrocitos (Fellner et al., 2013; Rannikko et al., 2015). La supresión de TLR4 supone una disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias y ROS tras el tratamiento con α -sin (Fellner et al., 2013), destacando el papel de TLR4 en la activación astrogliar pero no en la internalización de α -sin. Por tanto, cuando la α -sin es secretada por las neuronas, los astrocitos pueden endocitarla y degradarla, lo que conlleva la acumulación y formación de inclusiones de α -sin en los astrocitos como se observa en los cerebros de pacientes con EP. Mientras que la α -sin oligomérica se acumula intracelularmente alrededor de los núcleos de los astrocitos, las fibrillas de α -sin se localizan en las ramificaciones de estas células (Lindenau et al., 2017).

Una vez dentro de los astrocitos, la α -sin se degrada a través de la vía lisosómica (Lee et al., 2010), por lo que los astrocitos pueden conferir neuroprotección a las neuronas dopaminérgicas al eliminar el exceso de α -sin tóxica extracelular (Papa et al., 2014; Loria et al., 2017). Sin embargo, la acumulación excesiva de agregados puede perpetuar la toxicidad neuronal (Loria et al., 2017).

La acumulación de α -sin desencadena la disregulación de otras funciones astrocíticas (Booth et al., 2017), como la **absorción de glutamato**. Este efecto se ha demostrado en un modelo de ratón en el que se sobreexpresaba α -sin con la mutación A53T bajo un promotor específico de astrocitos (Gu et al., 2010). Estos ratones desarrollaron astrogliosis antes del inicio de los signos de la EP. Los astrocitos afectados mostraron una expresión disminuida de los transportadores de glutamato GLAST1 y GLT1, lo que provoca una disminución de la homeostasis del glutamato extracelular y, posteriormente, excitotoxicidad (Papa et al., 2014). Esto causa degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y, en menor medida, en la VTA (Brück et al., 2016).

En el estudio de Hoshi y colaboradores se investigó la relación entre la expresión de **AQP** y la agregación de α -sin en distintas zonas del cerebro de pacientes con EP (Hoshi et al., 2017). Obtuvieron que los astrocitos expresan más AQP1 y 4 en el neocórtex que en la corteza límbica y el tronco cerebral. Sin embargo, esos astrocitos no contenían α -sin. Observaron que había una correlación negativa entre los niveles de AQP1 y 4 y α -sin en estos pacientes. Estos resultados indican que la sobreexpresión de α -sin disminuye la expresión de canales AQP. Gu y colaboradores también demostraron que se producía una localización anormal del canal AQP4 en los astrocitos, por lo que el transporte de agua, así como la BHE, están alterados en presencia de agregados de α -sin (Gu et al., 2010).

Los astrocitos también tienen un papel importante en el **metabolismo** de los ácidos grasos en el cerebro, ya que un estudio de cultivos primarios de astrocitos de ratón KO para *SNCA* demostró que la incorporación y distribución de los ácidos araquidónico y palmítico estaba interrumpida en astrocitos (Booth et al., 2017). La agregación de α -sin también produce alteraciones en el metabolismo del colesterol, que es un componente estructural de las membranas celulares y un precursor de las hormonas esteroideas. También contribuye a la formación de sinapsis y a la actividad neuronal; por lo tanto, los defectos en la homeostasis del colesterol pueden tener graves consecuencias en la función cerebral (Booth et al., 2017). La síntesis y la degradación del colesterol están altamente compartimentadas en astrocitos y neuronas, respectivamente (Pfrieger and Ungerer, 2011). En cultivos de neuronas dopaminérgicas se ha visto que la sobreexpresión de α -sin provoca un aumento en la concentración de los metabolitos oxidados del colesterol y, a su vez, estos metabolitos inducen la agregación de α -sin y la formación de CL (Bosco et al., 2006).

Además, algunos estudios afirman que la captación de α -sin por los astrocitos conduce a la alteración de la **función mitocondrial** en estas células. Así, la sobreexpresión de α -sin en un modelo de ratón conduce a alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrial de los astrocitos (Schmidt et al., 2011).

La sobreexpresión de α -sin WT y con las mutaciones A53T y A30P en líneas celulares de astrocitos inmortalizados, promueve la disminución de LC3-II y el aumento de los niveles de la proteína p62, lo que sugiere la inhibición de la **autofagia**. Cuando estas células se trataron con rotenona, hubo una pérdida de potencial de membrana mitocondrial, especialmente en células que expresan las α -sin mutadas. Esta alteración en la autofagia podría conducir a la apoptosis de los astrocitos (Erustes et al., 2018). En cultivos de astrocitos a los que se añadía α -sin oligomerizada, demostraron que la proteína se internaliza rápidamente en los lisosomas de los astrocitos. Sin embargo, la digestión lisosómica de la α -sin oligomerizada no se completa. Esta disfunción podría estar causada directamente por las inclusiones de α -sin o indirectamente por eventos secundarios derivados de dicha acumulación (Lindenau et al., 2017).

En conclusión, ha sido ampliamente demostrado que la microglía y los astrocitos participan en la fisiopatología de la EP, ya que tanto estudios *in vivo* como *post mortem* en modelos animales y pacientes con EP muestran una gran interacción entre inflamación y muerte dopaminérgica. Las células gliales están implicadas en la homeostasis normal del cerebro. En general, los astrocitos participan en la modulación sináptica de estas células, en su soporte trófico y en el mantenimiento de niveles fisiológicos de moléculas y neurotransmisores, mientras que la microglía participa en la vigilancia inmune y la actividad fagocítica. Ante estímulos moleculares procedentes del parénquima circundante, estas células se activan. En la EP, puede que el estímulo más importante sea la agregación de α -sin. Se ha descrito que la sobreexpresión de α -sin estimula la activación microglial y astrogial, así como la liberación de citoquinas proinflamatorias. La secreción de estas citoquinas induce la acumulación de α -sin en células gliales, provocando una disfunción en la actividad fagocítica y la autofagia de estas células. Además, la acumulación de α -sin en astrocitos parece ser responsable de la liberación de citoquinas proinflamatorias y de glutamato excitotóxico. Por tanto, la activación de la microglía y los astrocitos inducida por α -sin, así como la alteración de sus funciones, se ha asociado a la muerte dopaminérgica, si bien no se conoce si esto antecede a la muerte neuronal o es un hecho concomitante que podría intervenir en la progresión de la muerte dopaminérgica.

4.- MODELOS ANIMALES EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Los modelos animales constituyen una herramienta muy útil, ya que permiten estudiar mecanismos patogénicos y posibles agentes terapéuticos en la EP. El modelo animal ideal debería reproducir las características histopatológicas, bioquímicas y los cambios fisiopatológicos asociados con la EP (Beal, 2001; Van Kampen and Robertson, 2017). Sin embargo, al igual que con otras enfermedades neurodegenerativas, la EP no ha sido observada espontáneamente en animales. En consecuencia, los rasgos más característicos de la enfermedad han sido imitados en animales a través de la administración de diferentes agentes neurotóxicos o fármacos que perturban la neurotransmisión dopaminérgica o provocan cambios histopatológicos semejantes a la EP en el SNC con un rango variable de fidelidad.

Los modelos animales más utilizados clásicamente para el estudio experimental de la EP son los resultantes de la exposición a neurotoxinas como la 6-OHDA, el MPTP, la rotenona y la metanfetamina en roedores y primates (Bezard et al., 2013). Más tardíamente, también se han desarrollado distintos modelos genéticos y transgénicos de la enfermedad, así como de sobreexpresión de α -sin mediada por vectores virales adeno-asociados (AAV). Todos ellos remedan en mayor o menor medida algunos de los rasgos más característicos de la EP. A continuación, se describen los modelos más relevantes en los estudios de neuroinflamación y degeneración dopaminérgica.

4.1.- Modelos inducidos por neurotóxicos

4.1.1- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

El MPTP es un compuesto que actúa como una protoxina lipófila que cruza la BHE, por lo que puede ser administrado sistémicamente de forma intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.) o intravenosa (i.v). Una vez cruzada la BHE, se convierte en el metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) en los astrocitos (Ransom et al., 1987) y neuronas serotoninérgicas (Riachi et al., 1989) por acción de la monoamino oxidasa B (MAO-B). Posteriormente, el MPP⁺ es capturado por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de

dopamina (DAT) y se acumula en las mitocondrias, donde ejerce su efecto tóxico (Nicklas et al., 1987; Przedborski et al., 2004; Richardson et al., 2007). El MPP+ produce neurodegeneración a través del bloqueo de los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones I, III y IV (Desai et al., 1996). Como consecuencia, la producción de ATP se reduce y la cantidad de ROS intracelular aumenta, alterando la homeostasis celular e induciendo la muerte celular (Jackson-Lewis et al., 1995; Tatton and Kish, 1997; Novikova et al., 2006). Esto provoca una degeneración bilateral del tracto nigroestriatal (Taylor et al., 2013).

La administración sistémica de MPTP da como resultado un parkinsonismo bilateral que imita el patrón específico de la lesión nigroestriatal de la EP en humanos (Bezard et al., 2013).

La mayoría de los estudios sobre neuroinflamación, signos motores y muerte dopaminérgica inducidos por MPTP se han realizado en ratones (L'Episcopo et al., 2010; Chung et al., 2010; Gupta et al., 2011; Esposito et al., 2012; Ghosh et al., 2012; Lee et al., 2012; Roy et al., 2012; Wang et al., 2012), donde el MPTP induce una rápida activación microglial en la SNpc desde los primeros días tras la inoculación de la toxina (Członkowska et al., 1996), así como infiltración de LT (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999; Hirsch and Hunot, 2009). En primates no humanos, se ha observado microglía reactiva sostenida en el tiempo en la SNpc después de la administración de MPTP (Hurley et al., 2003; McGeer et al., 2003; Barcia et al., 2004). Esta activación se desencadena de forma concomitante a la depleción dopaminérgica y persiste durante, al menos, 35 meses (Vázquez-Claverie et al., 2009).

4.1.2.- 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

La 6-OHDA es una neurotoxina análoga tanto a DA como a noradrenalina (NA) que tiene una alta afinidad por los transportadores de membrana de ambos neurotransmisores, por lo que puede producir lesión en los sistemas dopaminérgicos y noradrenérgicos en el SNC y en el SNP. A diferencia del MPTP, la 6-OHDA no puede atravesar la BHE, por lo que se inyecta directamente en el

cerebro, mayoritariamente se inyecta de manera unilateral en la SNpc, en el fascículo prosencefálico medial o haz nigroestriatal (del inglés *medial forebrain bundle*; MFB), o de manera unilateral o bilateral en el estriado (Ungerstedt, 1971) que, en general, se asocia con más morbimortalidad.

El mecanismo de acción de la 6-OHDA consiste en inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, produciendo H₂O₂, radicales libres y quinonas, provocando un rápido descenso en enzimas antioxidantes y, en conjunto, daño en la estructura y metabolismo celular (Hutchison et al., 1994; Glinka et al., 1997; Blum et al., 2001).

Se ha demostrado que la 6-OHDA provoca respuesta inflamatoria (Schober, 2004; Tufekci et al., 2012; Taylor et al., 2013), que incluye astrogliosis (Gomide et al., 2005; Wachter et al., 2010), activación microglial (Akiyama and McGeer, 1989; Cicchetti et al., 2002; Marinova-Mutafchieva et al., 2009), aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α (McCoy et al., 2006; Goes et al., 2014) y disminución de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y de enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión (Sandhu et al., 2009). Sin embargo, el perfil inflamatorio observado en animales lesionados con 6-OHDA es altamente variable y dependiente del momento y el sitio de la inyección, ya que, en el núcleo de inyección, la activación microglial será anterior y más robusta.

Otros neurotóxicos como la rotenona, el paraquat o el maneb también alteran la respiración mitocondrial. Sin embargo, el uso de estos compuestos para generar modelos animales es problemático, ya que la muerte neuronal que se obtiene varía entre los estudios y su administración a menudo causa altas tasas de mortalidad, siendo modelos difíciles de replicar y usar (Manning-Bog et al., 2002; Miller, 2007; Greenamyre et al., 2010; Johnson and Bobrovskaya, 2015).

En resumen, los modelos animales basados en la administración de neurotoxinas no reproducen las características de la EP en su conjunto. Esto es debido a que las lesiones resultan agudas y muy severas que no replican la progresividad que se observa en los pacientes. Esto provoca que su aplicabilidad para estudios de neuroinflamación crónica sea muy limitada (Potashkin et al., 2010). Asimismo, estos modelos emulan etapas tardías de la enfermedad donde las

neuronas ya han degenerado, sin que se puedan estudiar los pasos que causan dicha muerte y los estadios precoces de la misma. Por tanto, los efectos tóxicos agudos de estos compuestos pueden indicar respuestas inflamatorias debido a respuestas de estrés generalizadas que no se parecen a la EP, siendo una de las mayores limitaciones para los estudios de neuroinflamación (Blesa and Przedborski, 2014; Boix et al., 2015). En definitiva, existe la fuerte necesidad de desarrollar otro tipo de modelos que reproduzcan con mayor fidelidad los cambios neuropatológicos progresivos que se observan en la EP idiopática.

4.2.- Modelos de sobreexpresión de α -sin mediante vectores virales adeno-asociados (AAV)

El descubrimiento de la α -sin en 1997 como un actor clave en la patogénesis de la EP familiar (Polymeropoulos et al., 1997) e idiopática (Spillantini et al., 1997), permitió nuevas alternativas a la hora de replicar los cambios de la enfermedad en animales (Ulusoy et al., 2010). Se desarrollaron varios ratones transgénicos de α -sin que expresaban la forma nativa o mutada bajo diferentes promotores (Magen and Chesselet, 2010). Sin embargo, a pesar de que estos animales replicaban algunas características de la enfermedad como la acumulación anormal de α -sin en las células (Oliveras-Salvá et al., 2013), no lograron reproducir la pérdida progresiva y específica de neuronas dopaminérgicas ni la manifestación de síntomas parkinsonianos (Bezard et al., 2013).

Posteriormente, se desarrollaron modelos animales con vectores virales adeno-asociados recombinantes (rAAV) y lentivirales (LV) que codifican para α -sin (nativa o mutada) y que se inoculaban en la SNpc (Bourdenx et al., 2015). Esto hace que los rAAV sean de los más utilizados para estudios preclínicos de trastornos neurológicos por ser una herramienta eficaz y segura (Kaplitt et al., 2007; Marks et al., 2010; Bartus et al., 2013; Weinberg et al., 2013; Ojala et al., 2015).

Los primeros rAAV que se generaron fueron del serotipo 2 (rAAV2) (Bourdenx et al., 2014). Aunque el rAAV2 es el serotipo mejor estudiado, en los

últimos años se han descubierto e implementado nuevos serotipos híbridos de AAV, como rAAV2/1, rAAV2/5, rAAV2/6, rAAV2/7, rAAV2/8 y rAAV2/9, que muestran una mayor transducción y diseminación de la expresión de α -sin (Koprach et al., 2010; Lundblad et al., 2012; McFarland et al., 2009), entre los que el serotipo 2/9 es el más eficiente (Bourdenx et al., 2014).

Mediante vectores rAAV se han sobreexpresado α -sin, h α -sin nativa o las formas mutadas A53T y A30P en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con una buena transducción del vector y expresión de h α -sin nativa o mutada durante largos períodos de tiempo (Kirik et al., 2002; Klein et al., 2002) y una pérdida progresiva de neuronas en la SNpc y de terminales dopaminérgicos en el estriado de forma temprana. Por ejemplo, 10 días después de la inyección del vector rAAV6- α -sin nativa en la SNpc, hay una reducción significativa en las tasas de recaptación de DA en el estriado, lo que sugiere alteraciones en el DAT (Lundblad et al., 2012). Esto ocurre antes del inicio de la muerte dopaminérgica y sugiere que los defectos sinápticos y axonales contribuyen al desarrollo de los síntomas de la EP mucho antes de que se produzca la muerte neuronal, lo cual coincide con el patrón observado en humanos demostrado por Kordower y colaboradores (Kordower et al., 2013).

En cultivos celulares, las formas mutadas exhiben la misma propensión a la oligomerización que la forma nativa, pero tienen distintas habilidades para formar inclusiones. La mutación A30P produce un menor porcentaje de células con agregados respecto a la nativa y la A53T, que no presentan diferencias entre sí (Lázaro et al., 2014). Sin embargo, otros estudios mantienen que, en animales, la A53T es más tóxica que la forma nativa (Oliveras-Salvá et al., 2013; Lu et al., 2015; Van der Perren et al., 2015).

Algunas de las consideraciones más importantes, además del tipo de α -sin y el serotipo de AAV que se emplea, son el promotor, cómo se purifica el virus y el número de partículas víricas. De ello depende la variabilidad en el grado de depleción dopaminérgica observada (Volpicelli-Daley et al., 2016). Los promotores más comunes para dirigir la expresión de α -sin incluyen los promotores híbridos de citomegalovirus (CMV), β -actina de pollo (CBA), fosfoglicerato quinasa (PGK) y

sinapsina I humana. La purificación de rAAV también es crítica para obtener un alto rendimiento de infección y para eliminar contaminantes, tales como proteínas celulares residuales y endotoxinas que podrían producir muerte neuronal inespecífica (Volpicelli-Daley et al., 2016). Por otro lado, el número de partículas víricas (*titer*) es importante para que la transducción se dé con eficacia. Una vez el ADN se traduce a proteína, es conveniente saber que la cantidad de la misma puede variar. Lo más usual es que, al inocular el vector, haya un aumento de, aproximadamente, 2-4 veces en los niveles de α -sin total en comparación con los que había de la proteína endógena, niveles similares a los que podría causar la triplicación del gen *SNCA* en pacientes con EP (Volpicelli-Daley et al., 2016). En base a estos factores, la expresión de rAAV- α -sin unilateralmente en la SNpc causa lesión dopaminérgica y remedia el cuadro motor de las lesiones de este tipo cuando se alcanza un umbral de pérdida de neuronas dopaminérgicas en torno al 40-50% (Oliveras-Salvá et al., 2013).

Por otro lado, la sobreexpresión de α -sin nativa o con la mutación A53T mediada por AAV en la SNpc induce una reacción inflamatoria (Tabla 3) (Daher et al., 2015; Allen Reish and Standaert, 2015; Daher et al., 2014; Daniel et al., 2015). Cuando se sobreexpresa la α -sin-A53T, estos cambios se caracterizan por la activación de la microglía y la expresión de marcadores inflamatorios cuando la extensión de la α -sin es avanzada y existe muerte dopaminérgica (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012; Castro-Sánchez et al., 2018; Crabbé et al., 2019a, 2019b). Sin embargo, la inoculación del vector en estos estudios es unilateral, lo que difiere de lo que ocurre en la EP (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012; Castro-Sánchez et al., 2018; Crabbé et al., 2019a, 2019b). Aun así, la mayoría de estos estudios obtienen alteraciones gliales de forma concomitante o posterior a la muerte dopaminérgica, en parte provocado por la elección de puntos temporales tardíos a la inoculación del vector viral (a partir de 4 semanas), donde el inicio de dicha depleción no puede constatarse (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012; Castro-Sánchez et al., 2018). Además, un único estudio en un modelo de ratón por inoculación de vector viral y sobreexpresión de α -sin nativa y con mutación A53T ha cuantificado astrogliosis, pero la evaluación se ha realizado

únicamente a 4 semanas y con una pérdida dopaminérgica mucho más avanzada (Castro-Sánchez et al., 2018). Por otro lado, un alto porcentaje de estos estudios no evalúa el estado motor de los animales ni la depleción dopaminérgica tanto en SNpc como en estriado, limitándose a establecer solo la extensión de la α -sin y la respuesta microglial sin tener en cuenta los parámetros de pérdida neuronal asociada a dicha sobreexpresión en ambos núcleos (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012).

En resumen, el modelo de lesión con sobreexpresión de α -sin mediada por rAAV, en concreto la A53T, es un modelo prometedor que replica la mayoría de las características de la EP de humanos, ya que se producen alteraciones motoras, muerte dopaminérgica en la SNpc, se observan agregados de α -sin en muchas regiones cerebrales como SNpc, estriado, córtex o hipocampo, así como respuesta inflamatoria temprana.

Pero los trabajos realizados hasta el momento no han estudiado todos los parámetros en conjunto ni las fases más tempranas previas a la degeneración dopaminérgica. Esto conlleva que no se tenga una cronología del proceso inflamatorio y la muerte dopaminérgica tras la sobreexpresión de α -sin A53T en la SNpc y su agregación en la vía nigroestriatal. Por ello, nuestro estudio mediante inoculación bilateral de α -sin A53T, que aúna todos estos factores y la correlación de todos los parámetros entre sí, permitirá conocer la relación temporal entre expresión de α -sin, depleción dopaminérgica y neuroinflamación y establecer las bases para poder desarrollar estudios que proporcionen un objetivo terapéutico que pueda prevenir o ralentizar la progresión de la EP.

Referencia	Animal	Vector α -sinucleína	Dosis	Sitio de inyección	Tiempos	Depleción DAérgica en SNpc	Depleción DAérgica en estriado	Glía	Test de evaluación motora		
Chung et al., 2009	Rata	AAV2-A53T (control AAV2-GFP)	1.8×10^{12} gc/ml	SNpc, unilateral	4 semanas	ns	-	↑ Iba-1 y citoquinas proinflamatorias en estriado pero no en SNpc	-		
					8 semanas	ns					
					17 semanas	32%					
					24 semanas	56%					
Sánchez-Guajardo et al., 2010	Rata	rAAV2/5-WT (control rAAV2/5- eGFP)	6.2×10^{13} gc/ml	SNpc, unilateral	4 semanas	ns	-	↑ 250% de Mac1 en SNpc vs. GFP. Ns en estriado ns vs. GFP en SNpc o estriado ns vs. GFP en SNpc. ↑ MHC-II en estriado	-		
					8 semanas	ns					
					15 semanas	ns					
		rAAV2/5-WT (control rAAV2/5- eGFP)	6.7×10^{13} gc/ml		4 semanas	50%				ns vs. GFP en SNpc o estriado	
					8 semanas	50%					↑ 200% de Mac1 en SNpc vs. GFP. Ns en estriado
					15 semanas	50%					
Barkholt et al., 2012	Mono	rAAV2/5-WT (control rAAV2/5- GFP)	2.1×10^{13} gc/ml	SNpc, unilateral	1 año	-	-	↑ 100% de Iba-1 en SNpc vs. Lado intacto y vs. GFP	-		
		rAAV2/5-A53T (control rAAV2/5- GFP)	4.9×10^{13} gc/ml							↑ 85% de Iba-1 en SNpc vs. Lado intacto y vs. GFP	
Castro-Sánchez et al., 2018	Ratón	AAV9-WT (control AAV9-null)	1.2×10^{12} gc/ml	SNpc, unilateral	4 semanas	55%	20%	↑ GFAP, Iba-1 y citoquinas proinflamatorias vs. Control	<i>Elevated body swing test</i> . Alteraciones motoras a 4 semanas		
		AAV9-A53T (control AAV9-null)				85%	20%	↑ GFAP, Iba-1 y citoquinas proinflamatorias vs. Control			
Henrich et al., 2018	Ratón	rAAV1/2-A53T (control rAAV1/2- Luciferasa)	5.1×10^{12} gc/ml	<i>Locus coeruleus</i> , unilateral	1 semana	ns	-	ns ↑ x3 de Iba-1 en LC vs. Control - ↑ x5 de Iba-1 en LC vs. Control	-		
					3 semanas	16% en LC					
					6 semanas	34% en LC					
					9 semanas	56% en LC					
Crabbé et al., 2019a	Rata	rAAV2/7-A53T (control rAAV2/7eGFP)	9×10^{11} gc/ml	SNpc, unilateral	2 semanas	-	-	ns en SN y estriado ↑ 84% de [¹⁸ F]-DPA-714 (autorradiografía) en SNpc, ns en estriado ↑ 71% de [¹⁸ F]-DPA-714 en SNpc, ns en estriado ns en SNpc, ↑ [¹⁸ F]-DPA-714 en el estriado	Test del cilindro y <i>catwalks</i> . Alteraciones motoras desde las 2 semanas		
					4 semanas	-					
					6 semanas	-					
					9 semanas	94%					
Crabbé et al., 2019b	Rata	rAAV2/7-A53T (control rAAV2/7- eGFP)	9×10^{11} gc/ml	SNpc, unilateral	4, 14, 28, 42 y 63 días	-	-	↑ [¹⁸ F]-DPA-714 (autorradiografía) en SNpc a día 28 y 42	Test del cilindro. Alteraciones motoras desde el día 14		

Tabla 3. Estudios de sobreexpresión de α -sin-A53T a través de vectores AAV en los que se han medido alteraciones gliales realizados hasta el momento. **DAérgica:** dopaminérgica; **Gc/ml:** copias del genoma por mililitro; **LC:** *locus coeruleus*; **SNpc:** Sustancia Negra *pars compacta*.

5.- TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES

El PET es una técnica de imagen capaz de medir *in vivo* la actividad metabólica y proteica de los diferentes tejidos, por lo que su uso en investigación está muy difundido (Phelps, 2000a, 2000b; Strome et al., 2006).

5.1.- PET y neuroinflamación

5.1.1.- Proteína translocadora

La proteína translocadora (TSPO), originalmente denominada receptor periférico de benzodiazepinas, es una proteína de 18 kDa que se encuentra en la membrana mitocondrial externa en una variedad de tejidos de todo el cuerpo (Vivash and O'Brien, 2016), pero los niveles más altos se encuentran en tejidos con células sintetizadoras de esteroides como las glándulas adrenales, las gónadas o el cerebro (Lacapère and Papadopoulos, 2003; Papadopoulos et al., 2006). En el SNC, se expresa en microglía, astrocitos y otras células inmunes, teniendo un papel relevante en la inmunomodulación (Scarf and Kassiou, 2011). En el cerebro sano la expresión de TSPO es muy reducida, sin embargo, cuando la glía se activa, la densidad de este receptor se incrementa notablemente (Figura 9) (Gerhard, 2016). Esto se podría atribuir, en parte, a los macrófagos infiltrados, en los que el receptor está presente de forma abundante, pero se ha demostrado que el aumento de la expresión de TSPO también se produce en presencia de una BHE intacta, cuando no existe infiltración de macrófagos periféricos. Como resultado, la expresión de TSPO se ha considerado un marcador de neuroinflamación y su expresión cerebral aumentada se asocia con activación microglial y con pérdida neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Alam et al., 2017).

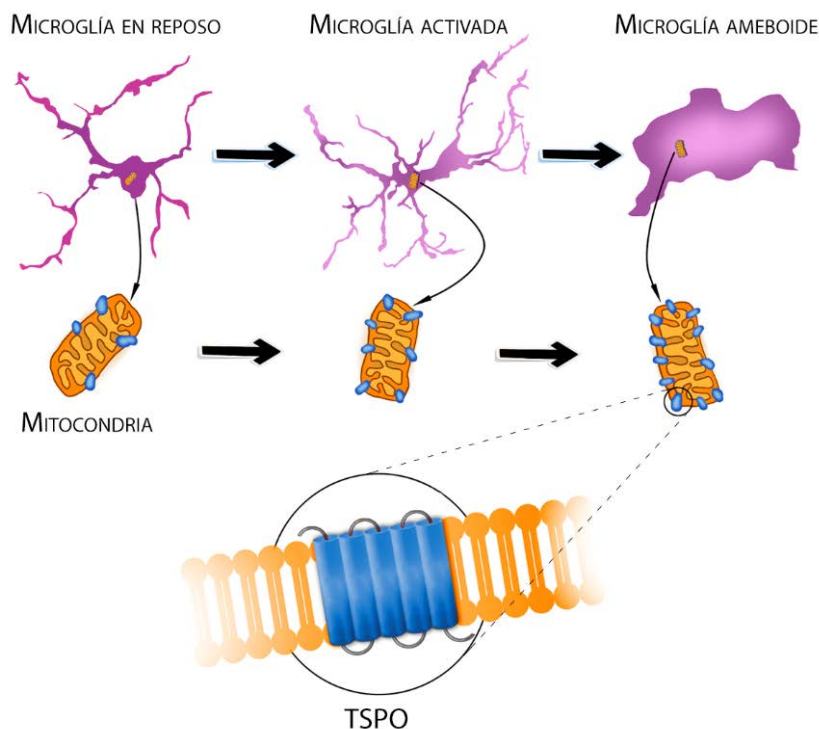


Fig. 9. Aumento en la expresión de TSPO en la mitocondria de la microglía a medida que esta va incrementando su estado de activación. Modificado de Gerhard et al., 2016. **TSPO:** proteína translocadora.

El desarrollo de ligandos de TSPO marcados con isótopos emisores de positrones de corta duración (^{11}C y ^{18}F) surgió a mediados de la década de 1980 y han sido utilizados principalmente en humanos y modelos animales de diferentes enfermedades (Luus et al., 2010; Schweitzer et al., 2010; Trapani et al., 2013). Mediante la determinación de la localización de la microglía activada se podría determinar la participación de estas células en etapas concretas de la degeneración dopaminérgica y estudiar si tienen un papel en la iniciación o progresión de la muerte dopaminérgica, como causa primaria o secundaria.

Algunos estudios indican que los astrocitos expresan TSPO, por lo que se ha sugerido que podrían contribuir a la señal de PET (Albrecht et al., 2018), cuestionando la especificidad de los marcadores. Dado que los astrocitos y la microglía juegan papeles muy diferentes, es crucial determinar si existen radiotrazadores *in vivo* que se unan específicamente a la microglía reactiva o también a los astrocitos.

5.1.2.- Activación microglial *in vivo* y degeneración dopaminérgica en EP

El radiotrazador PET para medir neuroinflamación más utilizado hasta la fecha ha sido [¹¹C]-PK11195 (Vivash and O'Brien, 2016).

Se ha utilizado tanto en modelos animales como en pacientes de múltiples enfermedades neurológicas (Venneti et al., 2013; Schain and Kreisl, 2017), incluyendo EP (Ouchi et al., 2005; Bartels et al., 2010; Edison et al., 2013; Iannaccone et al., 2013; Kobylecki et al., 2013). Así, en el modelo de rata lesionada con 6-OHDA, se observó un aumento en la captación de [¹¹C]-PK11195 en la SNpc y el estriado, que se confirmó con la tinción *post mortem* de la microglía, mostrando que estas células estaban activadas (Cicchetti et al., 2002). También se ha descrito aumento estriatal y nigral de la captación de [¹¹C]-PK11195 en el modelo de ratón MPTP que, sin embargo, no fue paralelo al de la expresión de TSPO medido por sus niveles de transcripción en el estriado (Belloli et al., 2017).

Con relación a los estudios en pacientes con EP, se han realizado estudios PET con [¹¹C]-(R)-PK11195 en pacientes en diferentes etapas de la enfermedad, de los cuales se han obtenido resultados heterogéneos y no concluyentes. En pacientes no tratados previamente para la EP, la captación de [¹¹C]-(R)-PK11195 fue mayor en el mesencéfalo (Ouchi et al., 2005; Iannaccone et al., 2013) y el putamen (Iannaccone et al., 2013). La captación en el mesencéfalo se correlacionó inversamente con la disponibilidad de DAT (medida a través de [¹⁸F]-DOPA) en el putamen y la gravedad de los síntomas motores (Ouchi et al., 2005). En pacientes más avanzados, se encontró un incremento significativo en la captación de [¹¹C]-(R)-PK11195 en los ganglios basales y las regiones corticales frontal y temporal, pero no se observaron cambios en el mesencéfalo (Gerhard et al., 2006). En este caso, no se observó correlación con la gravedad de los signos motores o la captación de [¹⁸F]-DOPA en el putamen. En otro estudio, no encontraron aumento de los valores de [¹¹C]-(R)-PK11195 en el mesencéfalo y el putamen contralateral al lado más afecto (Bartels et al., 2010). Aunque los estudios en sujetos en etapas premotoras de la EP son escasos, un estudio en pacientes con trastorno del comportamiento del sueño REM (iRBD) idiopático mostró una captación de [¹¹C]-(R)-PK11195 más alta en la SNpc y el estriado, pero no hubo correlación entre este hallazgo y la reducción de estriatal del PET con [¹⁸F]-DOPA (Stokholm et al., 2017).

Por lo tanto, existe un alto grado de variabilidad en los hallazgos de los estudios clínicos en pacientes con EP. Esto podría deberse a las diferencias entre las cohortes estudiadas o los métodos de análisis (Bartels et al., 2010), pero también al uso de [^{11}C]-(*R*)-PK11195. Este radiotrazador tiene varias limitaciones, entre las que se encuentran su naturaleza altamente lipófila, su baja biodisponibilidad, la alta unión no específica y su sensibilidad limitada para visualizar neuroinflamación leve, lo que lo hace inadecuado para su uso en el diagnóstico precoz y la detección de efectos sutiles de la intervención terapéutica. Además, una desventaja inherente para los estudios clínicos con [^{11}C]-(*R*)-PK11195 es que está radiomarcado con ^{11}C , que tiene una vida media más corta (20.38 minutos) que el ^{18}F (109.8 minutos), lo que supone una menor versatilidad en su uso (Alam et al., 2017). Por lo tanto, es necesario un trazador PET más sensible y específico. Para ello se han desarrollado radioligandos de TSPO de segunda generación (Chauveau et al., 2008), entre los que destacan [^{11}C]-PBR28, [^{11}C]-DAA-1106, [^{18}F]-FEDAA1106 y [^{18}F]-DPA-714.

En un estudio en ratas lesionadas con 6-OHDA donde se utilizó el radioligando [^{11}C]-PBR28, se observó que había un aumento en la captación del mismo en el estriado y el hipocampo 10 días después de la inyección unilateral de 6-OHDA; sin embargo, este aumento se revirtió 30 días posteriores a la inyección (Real et al., 2017). En el mismo estudio, el ejercicio suprimió la activación glial. Los autores sugirieron que la activación de la microglía probablemente sea un proceso agudo que acompaña a la neurodegeneración dopaminérgica de la SNpc.

En pacientes con EP, el [^{11}C]-PBR28 también se ha analizado, sin embargo, no se han observado diferencias de captación entre pacientes y controles a pesar de la reducción de DAT (Varnäs et al., 2018). De nuevo, no se observaron diferencias en un estudio donde se utilizó el radioligando [^{18}F]-FEPPA (Koshimori et al., 2015).

Por otro lado, la captación del radioligando [^{11}C]-DPA-713 aumentó en la corteza temporal, parietal y occipital de pacientes con EP. Un año después, la unión de [^{11}C]-DPA-713 en estos pacientes fue mayor en la corteza temporal y occipital (Terada et al., 2016). Este hallazgo sugiere que la activación de la microglía se

disemina fuera del estriado y que este proceso puede comenzar en las primeras etapas de la EP.

5.1.2.1.- $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714

Entre los radioligandos para TSPO de segunda generación, destaca el $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 ya que tiene una mayor eficacia detectando variaciones en la densidad de TSPO que otros radiotrazadores. Chauveau y colaboradores realizaron una comparación directa con estudios de autorradiografía *in vitro* y PET *in vivo* entre $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714, su análogo $[^{11}\text{C}]$ -DPA-713 y $[^{11}\text{C}]$ -PK11195 en ratas unilateralmente lesionadas con AMPA en el estriado, lo que provoca pérdida neuronal, una fuerte activación glial, así como reclutamiento de macrófagos (Chauveau et al., 2008). Obtuvieron que $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 tiene mejor afinidad y especificidad que $[^{11}\text{C}]$ -DPA-713 y $[^{11}\text{C}]$ -PK11195 (Chauveau et al., 2009).

El potencial de $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 como marcador *in vivo* de la actividad microglial se ha demostrado en varios estudios en diferentes modelos animales de inflamación (James et al., 2008; Martín et al., 2010; Boutin et al., 2013; Ory et al., 2015; Zinnhardt et al., 2015; Wang et al., 2017) y enfermedades neurodegenerativas como EA o ELA. Estudios con $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 en pacientes con EA (Golla et al., 2015; Hamelin et al., 2016) y ELA (Corcia et al., 2012), mostraron un aumento significativo en la absorción cortical de $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 en ambas enfermedades. Curiosamente, el estudio longitudinal más reciente con $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 demostró que los pacientes con EA prodrómico y dementes tienen una densidad de TSPO inicialmente más alta en comparación con los controles y que los que tenían un declive más lento muestran una captación inicial de $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 más alta que los de declive rápido, lo que sugiere que una mayor captación inicial de $[^{18}\text{F}]$ -DPA-714 se asocia con un mejor pronóstico clínico (Hamelin et al., 2018).

Además, estudios en modelos animales de otras enfermedades como el accidente cerebrovascular isquémico o en modelos de encefalomiелitis autoinmune

experimental, han mostrado una correlación entre el estudio *in vivo* y la activación microglial *post mortem* (Martín et al., 2010; Abourbeh et al., 2012).

No hay estudios de PET en pacientes de EP con este radioligando (Gargiulo et al., 2017). Sin embargo, estudios previos en modelos animales demostraron una mayor activación microglial en el sitio de la lesión directa con 6-OHDA en la SNpc, pero una activación microglial débil o inexistente en el estriado (Kitamura et al., 2010; Walsh et al., 2011; Fricke et al., 2016). Esta activación microglial diferencial en la SNpc y el estriado podría estar relacionada con una mayor susceptibilidad de la SNpc en la EP (Surmeier and Schumacker, 2013) o con la mayor densidad de microglía descrita en SNpc (Lawson et al., 1990). Recientemente, el estudio de Crabbé y colaboradores observó un aumento de la unión de [¹⁸F]-DPA-714 en la SNpc en un modelo de parkinsonismo inducido por sobreexpresión de α -sin a través de un estudio de autorradiografía *in vitro* (Crabbé et al., 2019a). Sin embargo, no se ha realizado ninguna evaluación o correlación de este hallazgo con la activación microglial ni con la degeneración dopaminérgica.

Por todo esto, el [¹⁸F]-DPA-714 es un emergente radiotrazador de PET con potencial para el diagnóstico y la investigación de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la activación microglial.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- HIPÓTESIS

Aunque los datos existentes indican una gran interacción entre neuroinflamación y muerte neuronal dopaminérgica, aún no se conoce su relación temporal. Esto es debido a las limitaciones metodológicas de los estudios realizados (pacientes con años de evolución de la enfermedad y modelos animales de lesión aguda y grave). Por otro lado, la evaluación de la neuroinflamación a través de imágenes PET puede proporcionar una vía para el conocimiento de la implicación de la misma en el inicio y progresión de la EP y, por ende, para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta a nuevas terapias en ensayos clínicos. Sin embargo, los hallazgos en los estudios de imagen en relación a la neuroinflamación en la EP indican que, en este momento, no existe ningún radiotrazador sensible y específico para evaluar *in vivo* la activación glial y la patología dopaminérgica en la EP.

Este trabajo de investigación se ha planteado con la finalidad de estudiar con más profundidad el papel de la microglía y los astrocitos en los estadios previos a la muerte dopaminérgica y en el inicio de la misma. Para ello, el modelo de sobreexpresión de α -sin con la mutación A53T a través de AAV provoca una pérdida de neuronas dopaminérgicas de manera gradual a lo largo de varias semanas, asociado a la aparición de inclusiones de α -sin, resultando un modelo idóneo para este propósito.

Nuestra hipótesis es que existe una relación temporal temprana entre la expresión de α -sin, la activación microglial y astrocítica, y la muerte dopaminérgica. Además, hipotetizamos que la activación glial es un componente significativo en el inicio de la degeneración dopaminérgica que puede ser monitorizada *in vivo* mediante PET con un radiotrazador más específico, como es el [18 F]-DPA-714, que los previamente empleados.

2.- OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis es estudiar la relación temporal existente entre la expresión de sinucleína, la activación glial (astrocitos y microglía) y la degeneración dopaminérgica en un modelo experimental de parkinsonismo progresivo por sobreexpresión de α -sin con la mutación A53T mediante la inyección en la SNpc de un vector viral (AAV) y evaluar la viabilidad y especificidad *in vivo* mediante PET con el radiotrazador [^{18}F]-DPA-714 para la detección de microglía reactiva desde las primeras fases de neurodegeneración.

Para ello, los objetivos específicos de este trabajo son:

1) Definir *post mortem* en la SNpc y el estriado la relación temporal entre la expresión de α -sin, la expresión glial (microglía y astrocitos) y la lesión dopaminérgica causada por la sobreexpresión de α -sin con la mutación A53T en la SNpc.

2) Estudiar mediante PET el potencial uso de [^{18}F]-DPA-714 para detectar la activación glial *in vivo* en la SNpc y en estriado desde la primera fase de neurodegeneración.

3) Evaluar la especificidad de [^{18}F]-DPA-714 para la detección de microglía activada.

4) Correlacionar la captación de [^{18}F]-DPA-714 con la muerte dopaminérgica para conocer si el PET con este radiotrazador es un marcador fiable de inicio y progresión de degeneración dopaminérgica.



MATERIAL Y MÉTODOS

1.- ANIMALES

Se utilizaron ratas macho *Sprague-Dawley* (N=70) de 300 g de peso al inicio del experimento (Charles River). Los animales fueron estabulados bajo condiciones estándar de temperatura y humedad (22°C, 70% humedad), en ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y con acceso libre al alimento y bebida. Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia (número de registro ANIMA4-002), el Comité Ético del CIC biomaGUNE (FOR-EP-03-0414) y siguiendo la normativa española (RD 53/2013) y europea (2010/63/UE). Durante todo el proceso experimental se tomaron las medidas necesarias para minimizar posibles molestias y/o sufrimiento en los animales.

2.- GRUPOS EXPERIMENTALES

El trabajo consta de dos grupos experimentales:

- Grupo Lesión: inoculados con el vector viral AAV2/9-CMV/ α -sinA53T, que sobreexpresa la proteína α -sin con la mutación A53T (Dosis: 8×10^{12} copias de genoma por mililitro (gc/ml)).
- Grupo Control: inoculados con el vector viral AAV2/9-CMV/GFP, que sobreexpresa la proteína verde fluorescente (GFP) (Dosis: 5.5×10^{12} gc/ml).

Cada uno de estos grupos se subdividió en 6 grupos según el punto temporal de estudio de imagen y sacrificio tras la inoculación del vector viral: 24 y 72 horas (h), 1, 2, 3 y 16 semanas (s); de n=5 por subgrupo/punto temporal (Figura 10).

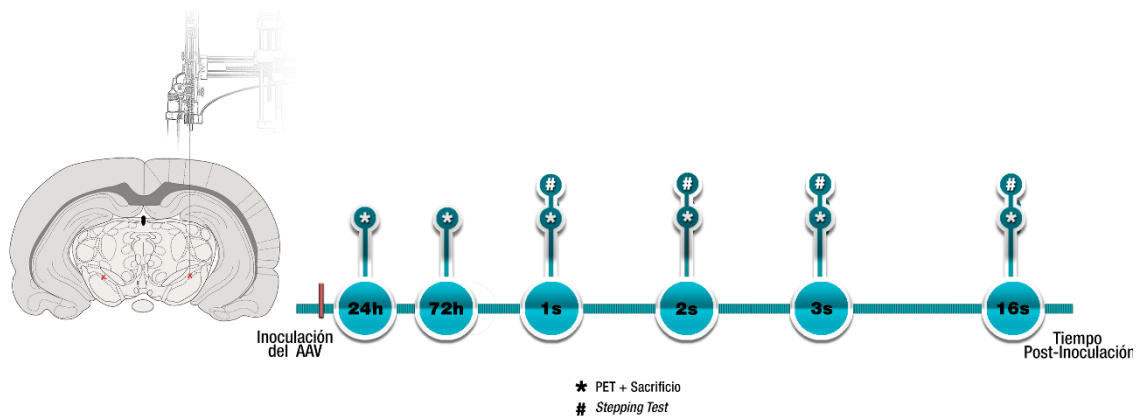


Fig. 10. Representación del sitio de inyección del vector viral y cronograma de trabajo con los puntos temporales del estudio de PET y sacrificio tras la inoculación del mismo.

3.- DESARROLLO DEL MODELO ANIMAL

Para desarrollar el modelo experimental, las ratas se inocularon bilateralmente en la SNpc con los correspondientes vectores virales.

Para ello, los animales se anestesiaron con una mezcla de oxígeno-isoflurano y se posicionaron en el marco estereotáxico (Stoelting Instruments) con la barra de incisivos a -3.3 mm en relación a la línea interaural. Se administró analgesia previamente a la cirugía para aliviar posibles dolores postoperatorios en los animales. Se les realizó una incisión sagital en la piel, se les separó el periostio y se localizaron las suturas craneales. Se calcularon las coordenadas para determinar la ubicación de los dos puntos de inyección en la SNpc por cada hemisferio según el atlas Paxinos y Watson (Paxinos et al., 1985). Las coordenadas desde Bregma para estos dos puntos fueron: 1) AP: -4.9, L: +/-2.2, V: -7.7 mm; 2) AP: -5.4, L: +/-2.0, V: -7.7 mm. Se taladró un pequeño orificio en el cráneo del animal y, mediante una jeringa Hamilton conectada a una bomba de infusión, se procedió a la inoculación de 1 µl de volumen a una velocidad de 0.5 µl/min en cada uno de los dos puntos de la SNpc por cada hemisferio (4 µl en total). Tras la inoculación, la aguja de inyección se dejó en su localización durante 2 minutos adicionales para facilitar la correcta inoculación del vector. Por último, la aguja de inyección se retiró lentamente, se procedió a la sutura de la piel y se controló la evolución del postoperatorio para evitar cualquier complicación.

4.- EVALUACIÓN MOTORA

Se evaluó el grado de bradicinesia progresiva en los animales mediante el *stepping test* (Olsson et al., 1995). Para la realización de este test, el investigador sujeta los animales por el torso y extremidades dejando solo una de las extremidades delanteras apoyadas en una superficie plana, por la que se desplazan a lo largo de una distancia de 90 cm durante 5 segundos hacia la izquierda y 5 hacia la derecha, cuantificando el número de pasos que el animal realiza con la extremidad apoyada. La disminución en el número de pasos realizados por el animal se considera una medida adecuada de la bradicinesia (Olsson et al., 1995). El test se realizó antes de la inoculación del vector viral (basal) y el día del estudio de PET previo al sacrificio únicamente para los puntos temporales de 1, 2, 3 y 16 semanas post-inoculación (p.i.). No se realizó a las 24h y 72h debido a que, al ser puntos temporales tan tempranos, los animales se encontraban recuperándose de la cirugía y el estudio no es valorable.

5.- EVALUACIÓN *IN VIVO* MEDIANTE TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET)

5.1.- Radioquímica

La síntesis del radiotrazador [¹⁸F]-DPA-714 se realizó utilizando un módulo de síntesis TRACERlab FXFN (GE, Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.) basado en un procedimiento de un solo paso, como ha sido descrito anteriormente (Damont et al., 2013; Kuhnast et al., 2012). Los rendimientos y los valores de actividad específicos fueron equivalentes a los que se han reportado en estudios previos de este trazador (Damont et al., 2008). La pureza radioquímica fue superior al 95% en el momento de la inyección.

5.2.- Escáner PET y adquisición de datos

Los estudios de PET se realizaron en el CIC biomaGUNE con una cámara CT General Electric eXplore Vista (GE Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.). Para asegurar la inmovilización durante la adquisición, los animales fueron

anestesiados vía inhalatoria con un 4% de isoflurano y se mantuvieron con 2-2.5% de isoflurano en gas oxígeno al 100%, colocadas en la camilla con el cerebro centrado en el campo de visión. La vena de la cola se cateterizó con una cánula (24G) para la administración intravenosa del radiotrazador [^{18}F]-DPA-714 (~70 MBq), que fue inyectado concomitantemente con el inicio de la adquisición de las imágenes de PET. Durante la toma de imágenes, los animales se mantuvieron en condiciones normotérmicas utilizando una manta térmica. Se adquirieron imágenes dinámicas del cerebro (28 cuadros: 4 x 5 s, 4 x 15 s, 4 x 30 s, 3 x 60 s, 3 x 120 s, 5 x 240 s, 5 x 300 s) en la ventana energética entre 400-700 keV, para un tiempo total de adquisición de 57.33 minutos. Después de cada exploración PET, se realizaron adquisiciones de tomografía computarizada (CT) (intensidad de 140 mA, voltaje de 40 kV), proporcionando información anatómica de cada animal, así como el mapa de atenuación para la posterior reconstrucción de la imagen PET. Las adquisiciones dinámicas se reconstruyeron (corrección de atenuación y atenuación basada en CT) con una proyección retrospectiva filtrada (FBP) utilizando un filtro Ramp con una frecuencia de corte de 0.5 mm^{-1} .

5.3.- Análisis de imagen

Los datos de PET se analizaron utilizando el *software* de análisis de imágenes PMOD (PMOD Technologies Ltd, Zürich, Suiza), Matlab (MathWorks Inc., Natick, MA, EE.UU.), SPM (College, London, UK) y STATA (Stata Corp., Texas, EE.UU.). Para verificar la ubicación anatómica de la señal, las imágenes dinámicas de actividad PET se co-registraron a los datos anatómicos de CT y se normalizaron en el espacio estereotáxico estándar (Paxinos et al., 1985) usando una plantilla de cerebro de rata como referencia con la herramienta de fusión PMOD (Schweinhardt et al., 2003). Las dimensiones finales del vóxel fueron $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mm después de la etapa de interpolación del proceso de normalización espacial.

Se realizó el análisis de volumen de interés (VOI). Se usó un atlas cerebral (Frumberg et al., 2007) como guía para extraer manualmente tanto los hemisferios completos, los VOI de captación específicos (SNpc y estriado) y un volumen de captación no específico (cerebelo) como referencia. Todos los VOI se tradujeron a

la imagen dinámica, lo que permitió obtener las curvas de actividad-tiempo para cada área.

Para la cuantificación de la señal de [^{18}F]-DPA-714, se utilizó el modelo de tejido de referencia multilínea 2-T (Ichise et al., 2003) de la herramienta PMod de PMOD. Se obtuvieron imágenes paramétricas de potencial de unión (BP) a partir de la imagen dinámica de PET y las curvas de tiempo-actividad. La linealización se realizó utilizando los últimos 45 minutos (cuadro 19 a 28) del estudio. Finalmente, se promedió el BP en cada VOI y la captación de la señal de PET se expresó como la media del BP.

6.- PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Para el estudio histológico, los animales (n=60) se sacrificaron por cada punto temporal tras el estudio de imagen PET. Los animales fueron perfundidos intracardiamente con PBS 0.1M (pH 7.4) seguido de paraformaldehído al 4% diluido en PB 0.1M (pH 7.4). Los cerebros se extrajeron rápidamente y fueron post-fijados en la misma solución de fijación durante toda la noche a 4°C, y luego crioprotectados en 30% de sacarosa en PBS 0.1M durante 72 horas. Posteriormente, mediante un micrótopo de congelación (Leica SM2010R), se obtuvieron secciones coronales seriadas de 40 μm de grosor a intervalos de 480 μm para los núcleos de interés (SNpc y estriado) así como otros núcleos que se utilizarán para futuros estudios histológicos (globo pálido, núcleo subtalámico e hipocampo). Las secciones se almacenaron a -20°C en placas de 12 pocillos con solución de crioprotección hasta su uso.

Para el estudio de PCR semicuantitativa a tiempo real (RT-PCR) se realizó un grupo adicional de animales para ambos grupos experimentales (n=5 animales por grupo) que fueron sacrificados a punto temporal 2 semanas p.i. Tras anestesiarse a los animales con una mezcla de oxígeno-isoflurano, se sacrificaron y se extrajo el cerebro. Posteriormente, se diseccionaron para obtener el mesencéfalo y, rápidamente, fueron congelados en hielo seco y almacenados a -80°C.

7.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

7.1.- Tinción histológica

7.1.1.- Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa (TH), molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1 (Iba-1) y α -sinucleína humana (α -sin)

Para el estudio histológico, se seleccionaron cortes coronales del estriado (TH, Iba-1 y α -sin: n=3 por cada animal) y de SNpc (TH: n=7, Iba-1 y α -sin: n=3 por cada animal) para la inmunotinción. Los cortes se lavaron en PBS tres veces durante 5 minutos. Con el fin de inactivar la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron con una solución de 3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; Panreac) en PBS durante 15 minutos. Posteriormente, las secciones se incubaron con una solución de bloqueo que contenía suero normal de caballo (NHS, del inglés *Normal Horse Serum*; Vector laboratories) al 4% y Tritón X-100 al 0.3% (Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 minutos (10% NHS durante 1 hora para α -sin). Seguidamente, se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios: anti-TH de ratón (1:1000, MAB 5280 Millipore) y anti-Iba-1 de conejo (1:500, 19741 Wako Pure Chemical Industries). Para α -sin, la incubación con el anticuerpo primario (1:500; anti-sinucleína humana LB509, Thermo Fischer) se hizo a una temperatura de 4°C durante toda la noche con el fin de evitar las uniones inespecíficas de este marcador. A continuación, las secciones se lavaron en PBS y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado (TH y α -sin: anti-IgG de ratón, 1:500, Vector BA2000; Iba-1: anti-IgG de conejo, 1:500, 31732 Pierce). Tras otros tres lavados con PBS, los cortes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y a oscuras con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; 1:100, Vector Laboratories). Después de los últimos lavados en PBS, las secciones se tiñeron con solución de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.05% (Sigma-Aldrich) que contenía 10 μ l de H_2O_2 al 33%. Finalmente, las secciones teñidas se montaron sobre portaobjetos gelatinizados, se secaron al aire durante la noche, se deshidrataron a través de una serie de alcohol de graduación ascendente seguido de xileno y se cubrieron con el medio de montaje (Eukitt®, Panreac) y un cubreobjetos.

7.1.2.- Inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y tinción de violeta de cresilo

La tinción inmunohistoquímica para GFAP en la SNpc y el estriado se realizó como se describe en la sección anterior. Después de incubarse con H₂O₂ y NHS, las secciones (n=3 por cada animal y núcleo) se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-GFAP de conejo (1:1000; ab5804 Millipore). Al día siguiente, después de varios lavados con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG conejo biotilado, 1:500, 31732 Pierce) y se reveló con el complejo ABC-DAB. Las secciones de estriado teñidas se montaron en portaobjetos gelatinizados y, tras deshidratar con etanol, se cubrieron con el medio de montaje (Eukitt®, Panreac) y un cubreobjetos. Los cortes de SNpc se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y, a continuación, se contratiñeron con solución de violeta de cresilo al 0.1%. Para ello, las secciones se dejaron durante la noche en etanol al 70% y, al día siguiente, se lavaron en agua destilada y se tiñeron con violeta de cresilo durante 4-5 minutos. Después de varios lavados en agua destilada y concentraciones crecientes de etanol, las secciones se lavaron con cloroformo al 100% (Merck) durante 10 minutos y después se eliminó el exceso de tinción con una solución diferenciadora compuesta por ácido acético y etanol al 96%. Finalmente, las secciones se deshidrataron en etanol al 100% y xileno y se cubrieron con el medio de montaje (Eukitt®, Panreac) y un cubreobjetos.

7.1.3.- Inmunofluorescencia para Iba-1 y GFAP

Para corroborar la presencia de microglía y astrocitos en cada uno de los núcleos (SNpc y estriado) observada por la inmunodetección por DAB, se realizó una inmunofluorescencia en un corte por cada animal. Los cortes se lavaron en PBS tres veces durante 5 minutos. Para disminuir el fondo de las tinciones, las secciones se bloquearon con metanol (Methanol BioChemica A3493 PanReac) y con una solución de bloqueo (5% de albúmina de suero bovino, BSA, Sigma-Aldrich). Posteriormente, las secciones se incubaron durante la noche en agitación a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-Iba-1 de cobaya (1:500; 234004 Synaptic systems) y anti-GFAP de cabra (1:1000; ab53554 Abcam). Las secciones fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con su

correspondiente anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor-594 (1:200, Thermo Fisher) y Alexa Fluor-488 (1:500, Invitrogen), respectivamente. Finalmente, todas las secciones se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:5000; D1306 Thermo Fisher) y se montaron en portaobjetos, se secaron al aire y se cubrieron con el medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) y un cubreobjetos.

8- ANÁLISIS HISTOLÓGICO

8.1.- Estimación del número de células inmunorreactivas para TH, Iba-1 y GFAP

El conteo del número de células positivas para TH, Iba-1 y GFAP en la SNpc y de Iba-1 y GFAP en el estriado de todos los animales se realizó mediante estereología usando un microscopio BX61 (Olympus, Hicksville, NY, EE.UU.) equipado con una cámara DP71 (Olympus) y una estación conectada a una estación con controlador XYZ (H101BX, PRIOR) y *software* newCAST Visiopharm 5.0® (Hoersholm). El número absoluto de células inmunopositivas se obtuvo mediante la aplicación del método del fraccionador óptico (West, 1999). Previamente a la realización del análisis definitivo, se realizó un estudio piloto con el fin de determinar las características óptimas de conteo. Tanto la SNpc como el estriado fueron delimitados con un objetivo de baja magnificación (4X) usando estructuras externas como referencia y cubriendo toda la extensión rostrocaudal de los núcleos (entre -4.30 mm y -6.72 mm respecto a Bregma para SNpc y entre +1.34 mm y -0.26 mm para estriado de acuerdo con el atlas Paxinos y Watson (Paxinos et al., 1985)).

Una vez trazados los límites de cada región, se identificaron y cuantificaron los perfiles celulares inmunoteñidos a una magnificación de 100X bajo aceite de inmersión en 1 de cada 6 cortes coronales de ambos núcleos tomados a intervalos uniformes de 240 μm para cada animal (n=7 secciones por animal para TH y n=3 para Iba-1 y GFAP en SNpc y n=3 para TH, Iba-1 y GFAP en estriado).

Se utilizaron disectores de 4538.03 μm^2 separados por 213 μm horizontal y verticalmente, que fueron distribuidos usando un meandro aleatorio en la zona de

interés con una distancia de separación entre planos (d) de 20 μm (Drøjdahl et al., 2010).

La estimación se fijó en un 10% del total de las dos estructuras para cada hemisferio y animal. Únicamente se cuantificaron los somas que estaban contenidos en la retícula de conteo o las que tocaban los bordes superior o derecho. Todos los somas que estaban externos a la retícula o en los bordes inferior e izquierdo fueron descartados. Los criterios de tamaño y forma de los somas se mantuvieron uniformes durante todo el estudio. Se consideró una célula positiva aquella con un núcleo cubierto y rodeado por tinción para TH, Iba-1 o GFAP, en cada caso.

La estimación del número (N) de células inmunopositivas para cada uno de los marcadores se calculó indirectamente usando la siguiente ecuación:

$$N = \Sigma Q \cdot \frac{t}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

Donde ΣQ es el número total de partículas contadas, t es el grosor medio de cada sección, h es la altura del disector óptico, asf es la fracción de muestreo del área y ssf es la fracción de muestreo de las secciones. El número medio de células contadas en cada hemisferio de cada núcleo fue 100-150 para obtener un coeficiente de error aceptable (<0.10) según el método Gundersen (Gundersen and Jensen, 1987; West, 1999).

8.2.- Caracterización morfológica de la microglía

Durante el análisis estereológico, la morfología de cada célula Iba-1⁺ se clasificó de acuerdo con su tamaño y procesos. Se distinguieron 4 fenotipos claramente definidos (figura 3). El primero (tipo A) se corresponde con la microglía vigilante, que son células sin citoplasma visible, núcleo redondo denso y con procesos largos y delgados con poca ramificación. El tipo B o microglía en estado de alerta, donde el cambio más evidente es la retracción de las ramificaciones acompañada por una hipertrofia del soma, dando lugar a una apariencia más robusta de la célula. El tercer tipo (tipo C) se caracteriza por una

reducción aún más marcada de las ramificaciones. Presentan una morfología con cuerpo alargado e irregular, núcleo ensanchado y menos definido, y con procesos más cortos, de grosor variable y con poca ramificación. Por último, el tipo D o microglía ameboide son células con un gran cuerpo celular que se fusiona con los procesos, el núcleo ocupa la mayor parte del cuerpo celular; los procesos son gruesos, cortos y poco numerosos. Su fenotipo es muy similar al de los macrófagos periféricos (Jyothi et al., 2015; Sanchez-Guajardo et al., 2010).

8.3.- Cuantificación por densidad óptica de la expresión de terminales dopaminérgicos en el estriado (TH) y detección de ha-sin en la SNpc y estriado.

La extensión de la expresión de ambos marcadores se determinó mediante la cuantificación por densidad óptica relativa (DOR).

Para cada uno de los marcadores se analizaron 3 cortes coronales por animal, núcleo y punto temporal. Para todas las secciones se obtuvieron imágenes mediante un microscopio óptico (Olympus BX50) a magnificación 1X el mismo día con la misma intensidad de luz. Para el análisis de las imágenes, se utilizó el *software* ImageJ (NIH, <http://imagej.nih.gov/ij/>). La medida semicuantitativa de la DOR se obtuvo para la SNpc y el estriado completo (CPu) y se realizó calculando el valor gris medio de las imágenes en escala de grises. Los resultados se promediaron para cada animal de cada grupo y punto temporal y se usaron, posteriormente, para el análisis estadístico.

8.4.- Extracción de ARN de tejido y PCR semicuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

A partir del mesencéfalo, se extrajo el ARN total usando reactivo TRI (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del tratamiento con 1 unidad (U) de DNasa I (ThermoFisher Scientific, Vilnius, Lituania), se realizó la transcripción inversa de 2 µg de ARN total utilizando 200 U de SuperScript IV (Invitrogen) y 100 ng de hexámeros de

oligodesoxirribonucleótidos aleatorios (Invitrogen) en volumen final de 20 μ l. La expresión de ARNm se estudió mediante RT-PCR utilizando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) en un sistema de detección en tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad). Se utilizaron los siguientes cebadores: TNF- α *forward*- TGCCTCAGCCTCTTCTCATT, TNF- α *reverse*- GGGCTTGTCACCTCGAGTTTT, IL-1 β *forward*- ATGGCAACTGTCCCTGAACT, IL-1 β *reverse*- TGCCTTCCTGAAGCTCTTGT, IL-6 *forward*- GCCAGAGTCATTTCAGAGCAA, IL-6 *reverse*- GTTGGATGGTCTTGGTCCTT, IL-10 *forward*- AAGGACCAGCTGGACAACAT, IL-10 *reverse*- TCTCCCAGGGAATTCAAATG, TGF- β *forward*- TGAGTGGCTGTCTTTTGACG, TGF- β *reverse*- TGGGACTGATCCCATTTGATT, iNOS *forward*- CACCTTGGAGTTCACCCAGT, iNOS *reverse*- AGCTCCTGGAACCACTCGTA, IFN- γ *forward*- CGAATCGCACCTGATCACTA, IFN- γ *reverse*- GACTCCTTTTCCGCTTCCTT, GAPDH *forward*- AAACCCATCACCATCTTCCA, GAPDH *reverse*- GTGGTTCACACCCATCACAA. Los resultados se normalizaron a GAPDH y la cantidad de cada transcripción se expresó como $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct [GAPDH] - Ct [gen]$).

9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de los datos de PET se llevaron a cabo utilizando el software STATA (StataCorp, Texas, EE.UU.). La diferencia en los valores de BP entre los grupos AAV-h α -sin y AAV-GFP en los diferentes puntos temporales se estableció después de probar la distribución de la normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). Como no se podía suponer la normalidad, las diferencias entre puntos temporales dentro de cada grupo experimental se determinaron con el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba *post-hoc* Dunn y el test U Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos experimentales para cada punto temporal se determinaron con el test ANOVA de dos vías.

El análisis estadístico y la generación de las gráficas para los estudios histológicos y de RT-PCR se realizaron con el *software* GraphPad Prism 5 (GraphPadSoftware). Se analizó la distribución de la normalidad con el test

Kolmogorov-Smirnov. En función de la normalidad de los datos, las diferencias entre puntos temporales dentro de cada grupo experimental se determinaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* Bonferroni y el test t Student o mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de la prueba *post-hoc* Dunn y el test U Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos experimentales se determinaron con el test ANOVA de dos vías en todos los marcadores. Los análisis de correlación se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de Spearman.

El nivel de significación se fijó en $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$ para todos los análisis. Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM), excepto los valores de DOR de TH en el estriado, que se expresan como porcentaje normalizado respecto al nivel del grupo AAV-GFP \pm SEM, los datos morfológicos, que se expresan como porcentaje del total de células microgliales Iba-1⁺ \pm SEM y los niveles relativos de ARNm, que se calcularon y se muestran en relación con la expresión de GAPDH con la fórmula $2\Delta Ct \pm SEM$.



RESULTADOS

1.- EVALUACIÓN DEL DETERIORO MOTOR

Para evaluar el desarrollo de bradicinesia en las extremidades anteriores se realizó el *stepping test* antes de la cirugía (basal) y 1, 2, 3 y 16 semanas p.i.

En el grupo AAV- α -sin no observamos diferencias significativas entre el test basal y los puntos temporales de 1 y 2 semanas p.i. (Figura 11). Sin embargo, el número de pasos realizados disminuyó a partir de las 3 semanas p.i. (3s p.i.: $p < 0.05$ respecto al basal; 16s p.i.: $p < 0.001$ respecto al basal y a las 1, 2 y 3s p.i.).

En el grupo AAV-GFP se observó una disminución de pasos únicamente a las 16 semanas p.i. ($p < 0.001$ respecto al basal y a las 1, 2 y 3s p.i.; Figura 11).

No se observaron diferencias significativas al comparar entre grupos experimentales ni entre las extremidades derecha e izquierda en ninguno de los puntos temporales evaluados en ninguno de los grupos (Figura 11).

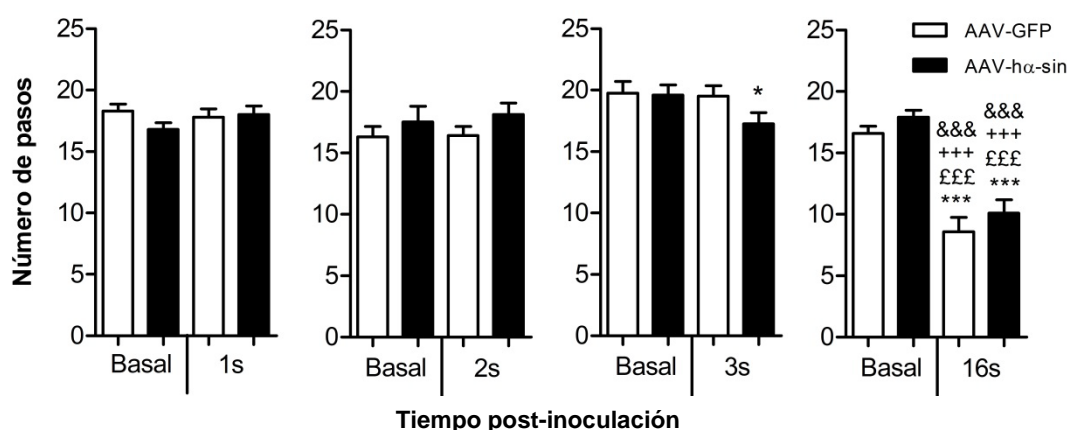


Fig. 11. Evaluación de la función motora. El *stepping test* se realizó de forma basal y 1, 2, 3 y 16 semanas tras la inoculación del vector viral. Los valores se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto al nivel basal; £££ $p < 0.001$ respecto a 1s p.i.; +++ $p < 0.001$ respecto a 2s p.i.; &&& $p < 0.001$ respecto a 3s p.i.

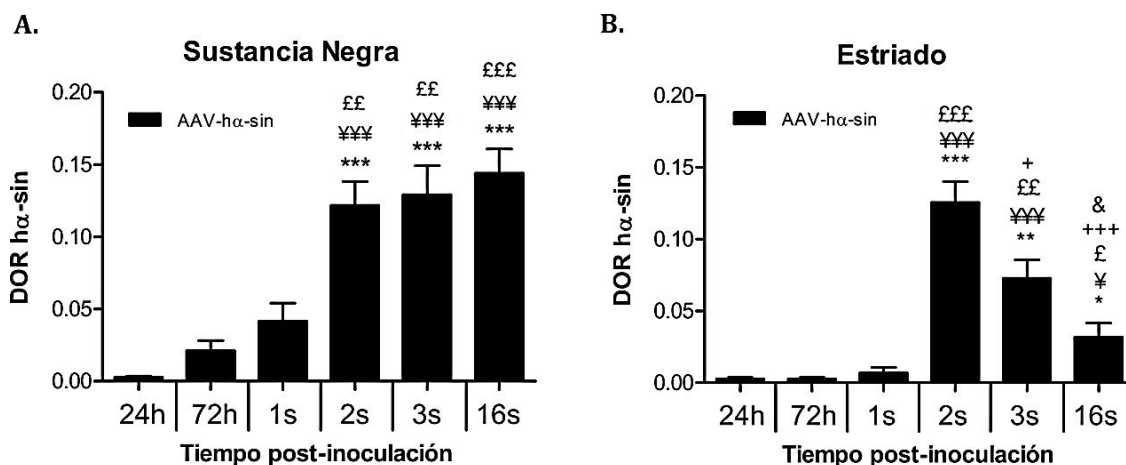
2.- EVALUACIÓN DE LA DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA

2.1.- Sobreexpresión de hα-sin en la SNpc y el estriado

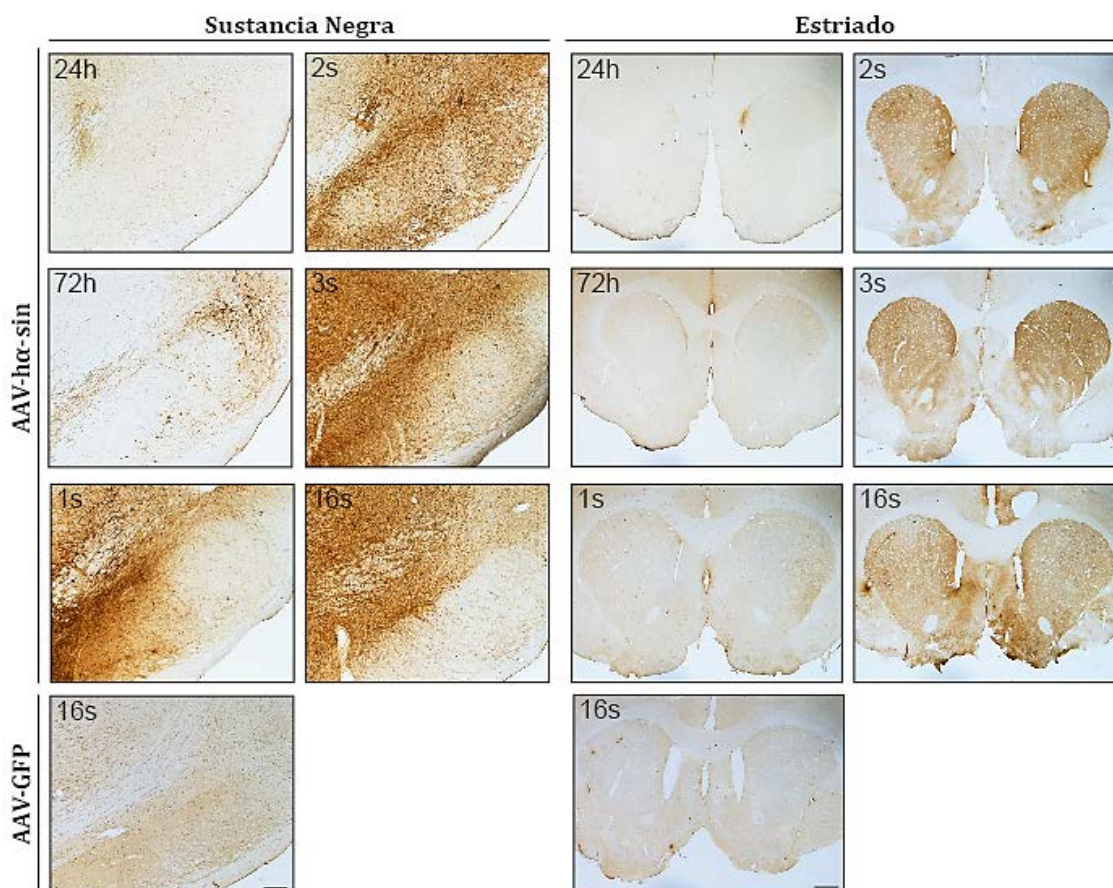
En la SNpc de los animales AAV-hα-sin la expresión de hα-sin (Figura 12A y C) se observó desde las 72h p.i. y aumentó significativamente a partir de las 2 semanas p.i. ($p < 0.001$ respecto a 24h y 72h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 1s p.i.; 3s p.i.: $p < 0.001$ respecto a 24h y 72h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 1s p.i.; 16s p.i.: $p < 0.001$ respecto a 24h, 72h y 1s p.i.).

En el estriado de estos animales la inmunodetección de hα-sin (Figura 12B y C) se observó a partir de las 2 semanas p.i., alcanzando su nivel más alto de expresión en ese punto ($p < 0.001$ respecto a 24h, 72h y 1s p.i.). Posteriormente, la sobreexpresión disminuyó a lo largo del tiempo, pero manteniéndose en niveles significativos hasta las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h, 72h, 1s y 3s p.i., $p < 0.001$ respecto a 2s p.i.).

No se observó marcaje de hα-sin ni en la SNpc ni en el estriado del grupo AAV-GFP en ninguno de los puntos temporales analizados (Figura 12C).



C.



D.

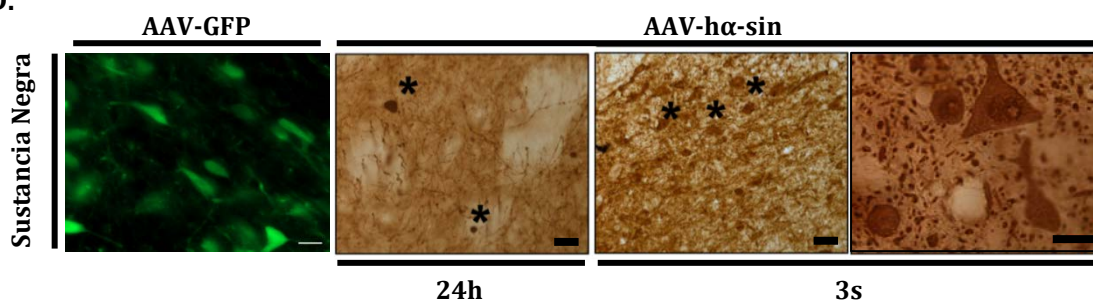


Fig. 12. Sobreexpresión de α -sin en la vía nigroestriatal. **A.** Análisis de la densidad óptica relativa (DOR) del marcaje de α -sin en la SNpc del grupo AAV- α -sin en todos los puntos temporales. Los valores se muestran como la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ respecto a 24h p.i.; ¥¥¥ $p < 0.001$ respecto a 72h p.i.; ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ respecto a 1s p.i. **B.** Análisis de DOR del marcaje de α -sin en el estriado del grupo AAV- α -sin en todos los puntos temporales. Los valores se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto a 24h p.i.; ¥ $p < 0.05$, ¥¥¥ $p < 0.001$ respecto a 72h p.i.; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$ respecto a 1s p.i.; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ respecto a 2s p.i.; & $p < 0.05$ respecto a 3s p.i. **C.** Microfotografías representativas de la tinción de α -sin en secciones coronales de la SNpc y estriado del grupo AAV- α -sin en todos los puntos temporales y un AAV-GFP a 16s p.i. como referencia control. Barra de escala, 200 μ m (SNpc) y 1000 μ m (estriado). **D.** Microfotografías representativas de la correcta inoculación del vector viral. A la izquierda, detalle de la expresión de la proteína GFP en la SNpc a las 2s p.i. en el grupo AAV-GFP. Barra de escala, 20 μ m. A la derecha, detalle de la expresión de α -sin en las neuronas dopaminérgicas a las 24h y 3s p.i. Marcados con asteriscos, agregados de α -sin. Barras de escala, 50, 100, 100 y 40 μ m, respectivamente.

2.2.- Cuantificación de la pérdida dopaminérgica en la SNpc

El grupo AAV- α -sin mostró una reducción significativa del número de neuronas dopaminérgicas TH⁺ desde la 3^a semana p.i. ($p < 0.01$ respecto a 24h p.i.; Figura 13A y B) que se mantuvo hasta las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.).

No hubo diferencias significativas dentro del grupo AAV-GFP ni entre ambos grupos experimentales (Figura 13A y B).

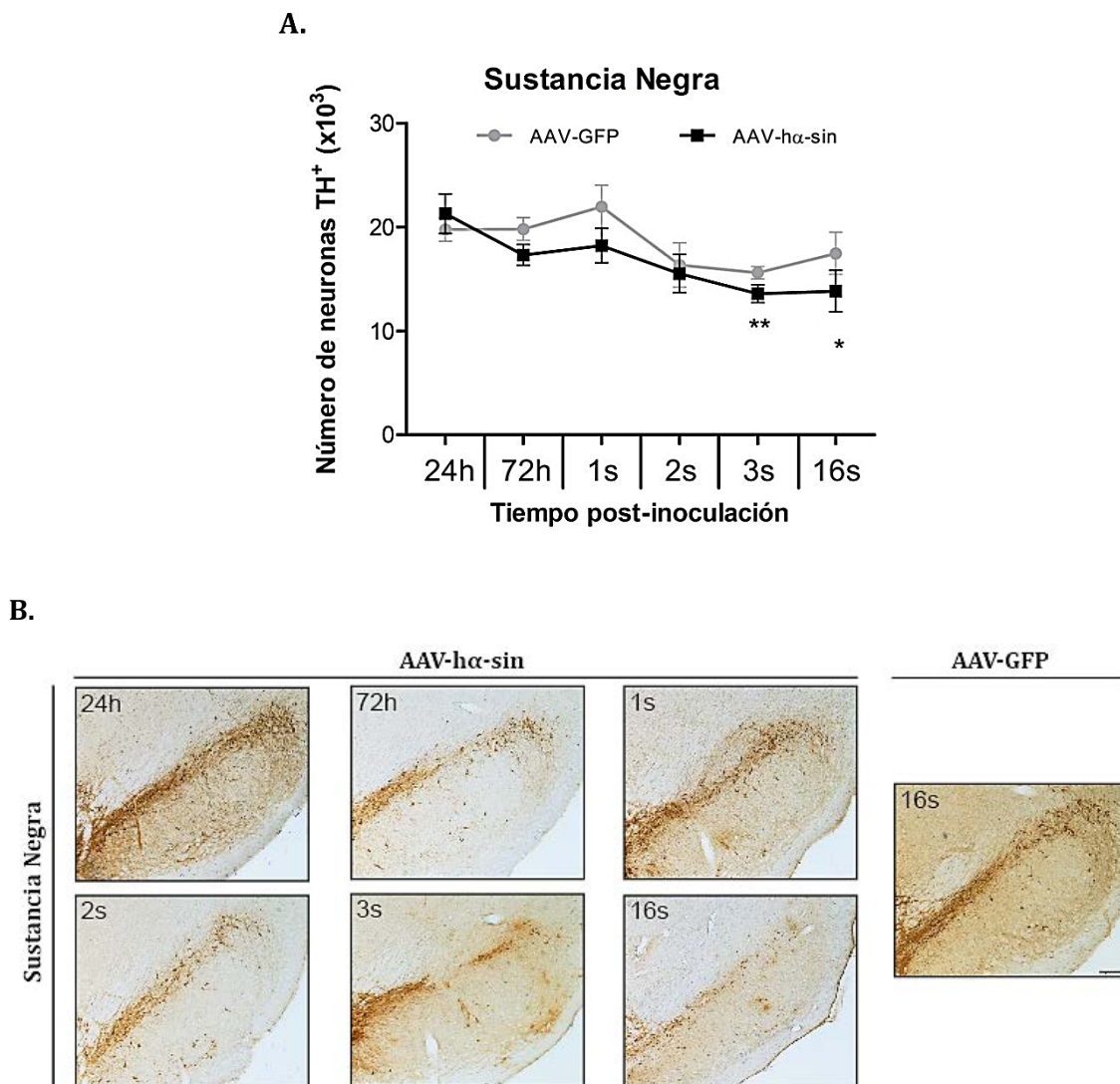


Fig. 13. Expresión de TH en la SNpc. **A.** Cuantificación estereológica del número de neuronas TH⁺ en la SNpc de los grupos AAV-GFP y AAV- α -sin. Los valores se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto a 24h p.i. **B.** Microfotografías representativas de la tinción para TH en secciones coronales de SNpc del grupo AAV- α -sin y de un AAV-GFP a las 16s p.i. como referencia de control. Barra de escala, 200 μ m.

2.3.- Cuantificación de la expresión de terminales TH⁺ en el estriado

El grupo AAV-hα-sin (Figura 14A y B) mostró una reducción en la expresión de TH a las 72h p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.), llegando a una reducción máxima a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h y 72h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 1s y 3s p.i.).

En el grupo AAV-GFP no se observó disminución significativa de TH estriatal en ninguno de los puntos temporales del estudio (Figura 14A y B).

No se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales (Figura 14A y B).

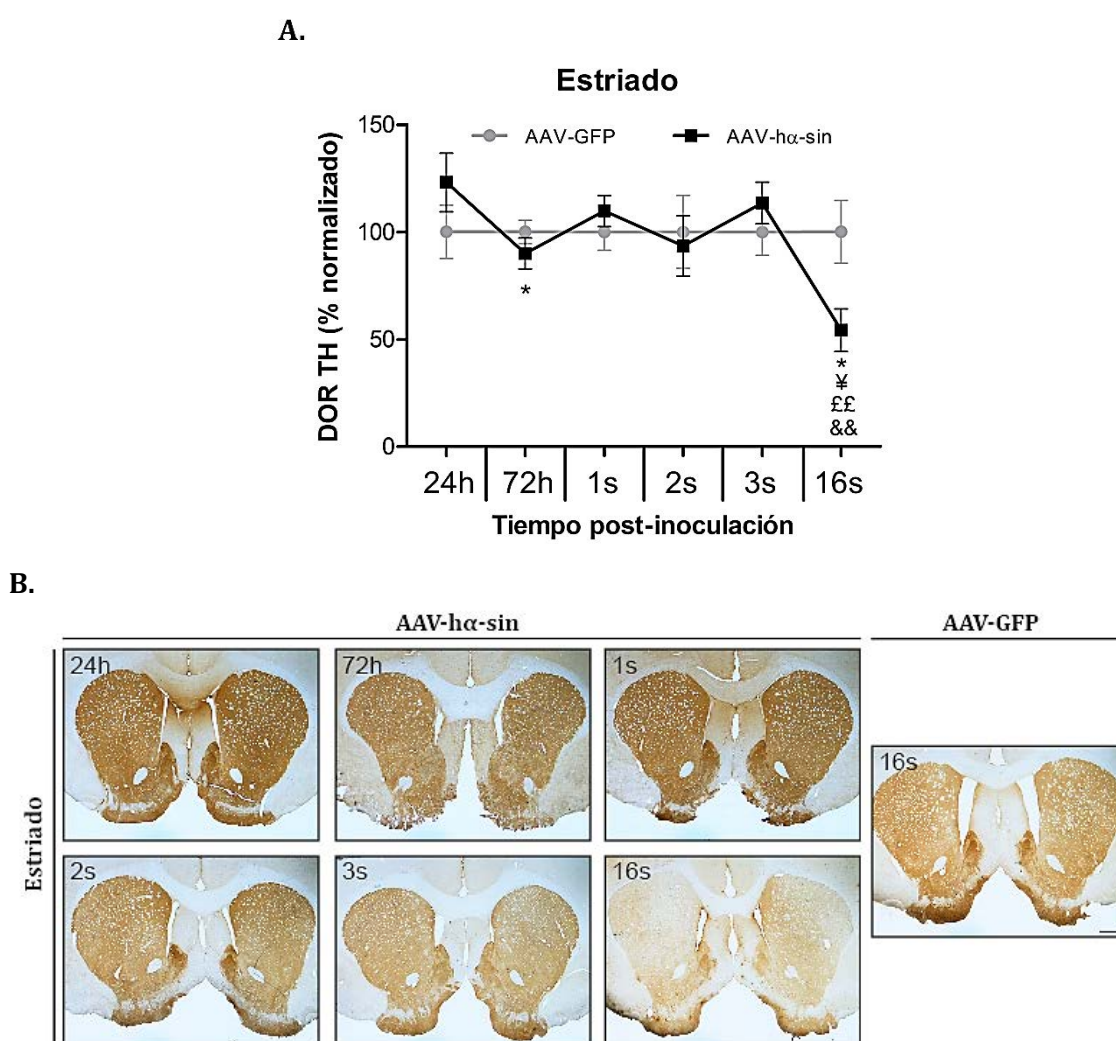


Fig. 14. Expresión de TH en el estriado. **A.** Valores de DOR de TH respecto al porcentaje de GFP en el estriado de los grupos AAV-GFP y AAV-hα-sin. Los valores se muestran como la media del porcentaje de GFP \pm SEM. * $p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; ¥ $p < 0.05$ respecto a 72h p.i.; ££ $p < 0.01$ respecto a 1s p.i.; && $p < 0.01$ respecto a 3s p.i. **B.** Microfotografías representativas de la tinción para TH de secciones coronales de estriado del grupo AAV-hα-sin y de un AAV-GFP a las 16s p.i. como referencia control. Barra de escala, 1000 μ m.

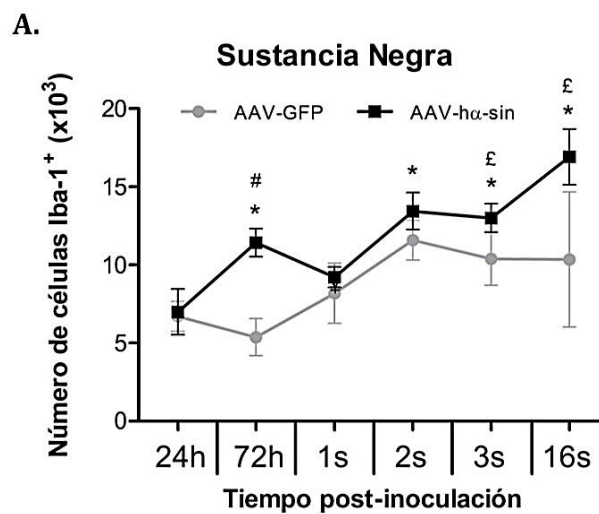
3.- MODIFICACIONES EN EL PATRÓN MICROGLIAL

3.1.- Cuantificación de células microgliales Iba-1⁺ en la SNpc

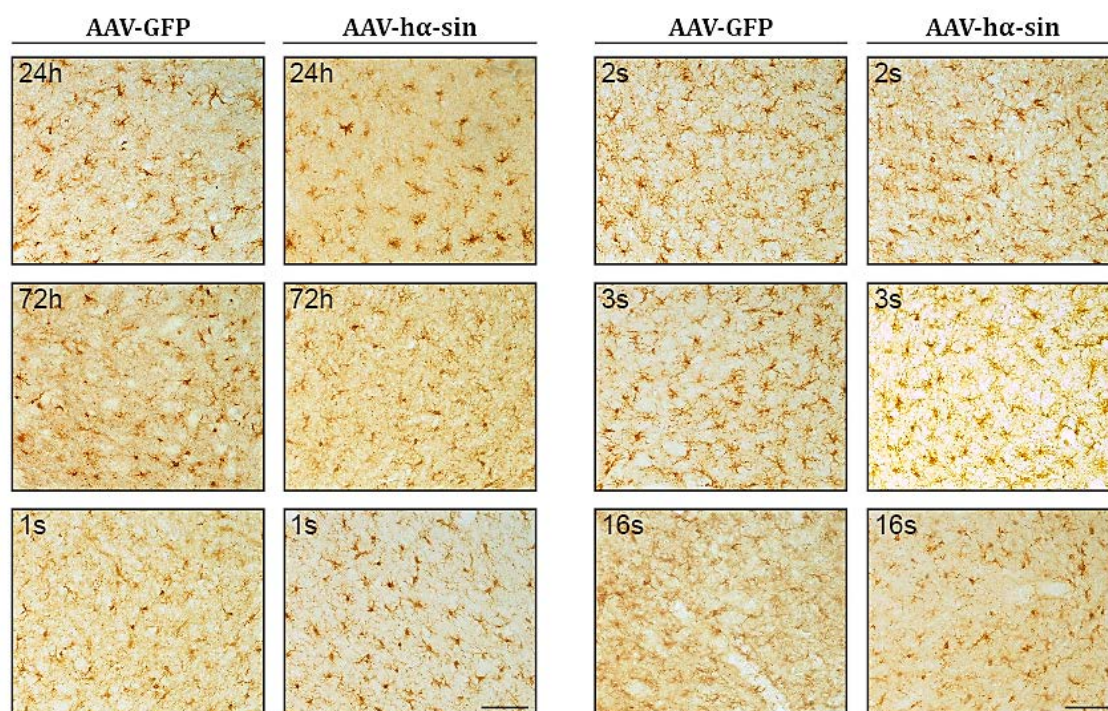
En el grupo AAV-h α -sin se observó un aumento significativo de células Iba-1⁺ desde las 72h p.i. en adelante (72h p.i.: p<0.05 respecto a 24h p.i.; 2s p.i.: p<0.05 respecto a 24h p.i.; 3s p.i.: p<0.05 respecto a 24h y 1s p.i.; 16s p.i.: p<0.05 respecto a 24h y 1s p.i.; Figura 15A, B y C).

En el grupo AAV-GFP no hubo diferencias significativas en ninguno de los puntos temporales estudiados (Figura 15A y B).

Al comparar ambos grupos experimentales, en el grupo AAV-h α -sin hubo un incremento significativo en el número de células Iba-1⁺ a las 72h p.i. (p<0.05; Figura 15A y B).



B.



C.

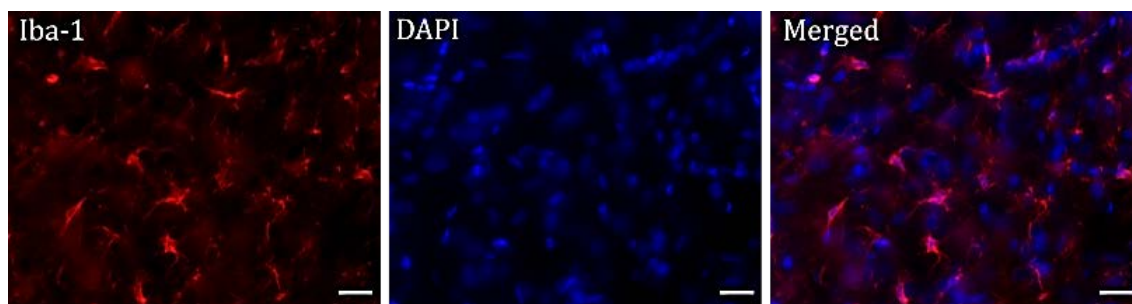


Fig. 15. Expresión de Iba-1 en la SNpc. A. Cuantificación del número de células Iba-1⁺ en ambos grupos experimentales. Los valores se muestran como la media \pm SEM. # $p < 0.05$ respecto al grupo AAV-GFP; * $p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; £ $p < 0.05$ respecto a 1s p.i. B. Microfotografías representativas de la tinción con Iba-1 de las secciones coronales de SNpc en ambos grupos experimentales. Barra de escala: 200 μ m. C. Imágenes de inmunofluorescencia representativas del grupo AAV-h α -sin a las 16s p.i. en las que observamos células microgliales Iba1⁺ (rojo), su núcleo (DAPI, azul) y la superposición de las anteriores (*Merged*). Barra de escala, 20 μ m.

3.2.- Morfología de las células microgliales Iba-1⁺ en la SNpc

- Tipo A:

Dentro del grupo AAV-h α -sin no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células microgliales de tipo A entre los distintos puntos temporales (Figura 16A).

El grupo AAV-GFP presentó una menor proporción de células tipo A a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 2s y 3s p.i.; Figura 16B).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los puntos temporales (Figura 16A y B).

- Tipo B:

Dentro del grupo AAV-h α -sin hubo un aumento progresivo en las células de tipo B que fue significativo a las 3 semanas p.i. ($p < 0.01$ con respecto a 24h p.i.) y que descendió a las 16 semanas p.i. ($p < 0.01$ respecto a 3s p.i.; Figura 16A).

Dentro del grupo AAV-GFP no hubo diferencias significativas entre puntos temporales (Figura 16B).

Entre los grupos experimentales no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células tipo B (Figura 16A y B).

- Tipo C:

En el grupo AAV-h α -sin se observó una disminución significativa del porcentaje de células tipo C a 3 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 72h p.i.; Figura 16A).

Dentro del grupo AAV-GFP no hubo diferencias significativas (Figura 16B).

No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los puntos temporales (Figura 16A y B).

- Tipo D:

Dentro del grupo AAV-h α -sin hubo una disminución significativa del porcentaje de células microgliales tipo D a las 3 semanas p.i. ($p < 0.01$ respecto a

24h p.i.; Figura 16A) y un incremento significativo a las 16 semanas p.i. ($p < 0.01$ respecto a 3s p.i.).

No se observaron diferencias significativas en el grupo AAV-GFP (Figura 16B).

Entre los grupos experimentales no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células tipo D (Figura 16A y B).

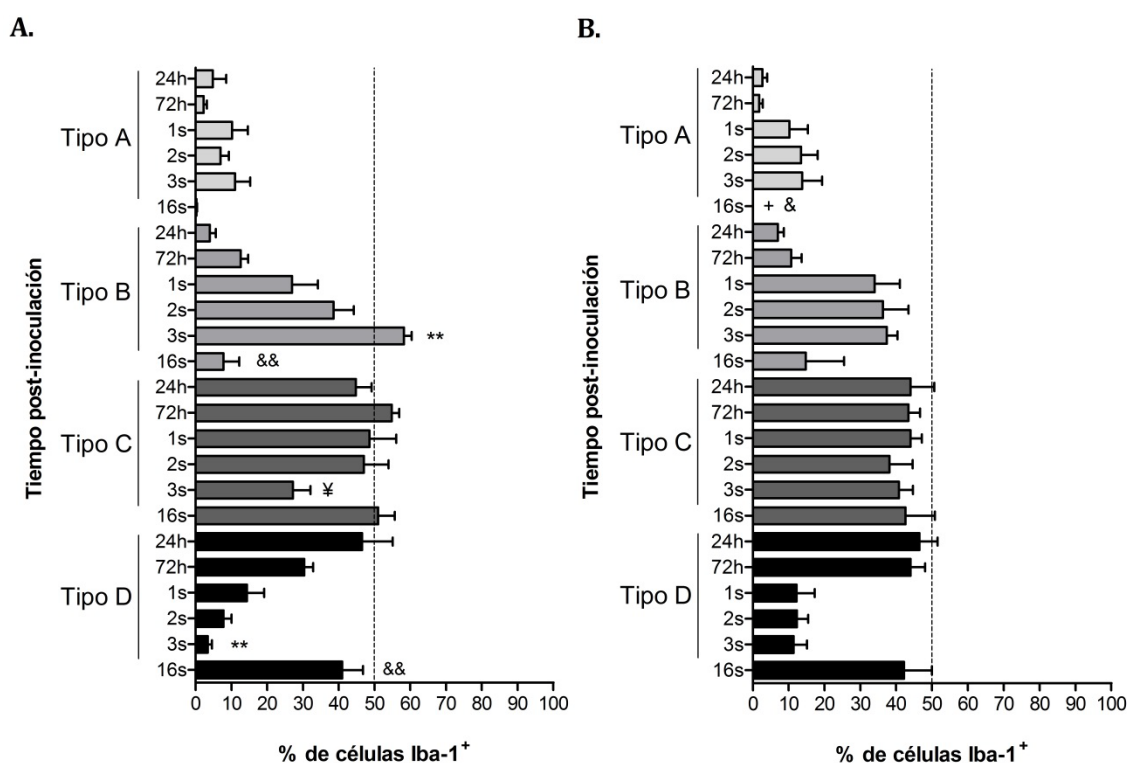


Fig. 16. Morfología de las células Iba-1⁺ en la SNpc. **A.** Clasificación de la microglía del grupo AAV-hα-sin en sus cuatro fenotipos según su grado de activación. Los valores se muestran como la media del porcentaje del número total de células Iba-1⁺ ± SEM. ** $p < 0.01$ respecto a 24h p.i.; ¥ $p < 0.05$ respecto a 72h; && $p < 0.01$ respecto a 3s p.i. **B.** Clasificación de la microglía del grupo AAV-GFP en sus cuatro fenotipos según su grado de activación. Los valores se muestran como el porcentaje del número total de células Iba-1⁺ ± SEM. + $p < 0.05$ respecto a 2s p.i.; & $p < 0.05$ respecto a 3s p.i.

3.3.- Cuantificación de células microgliales Iba-1⁺ en el estriado

Contrariamente a lo observado en la SNpc, en el estriado no se observaron cambios en el número total de células Iba-1⁺ en ningún punto temporal de los dos grupos experimentales ni en la comparación intergrupala (Figura 17A, B y C).

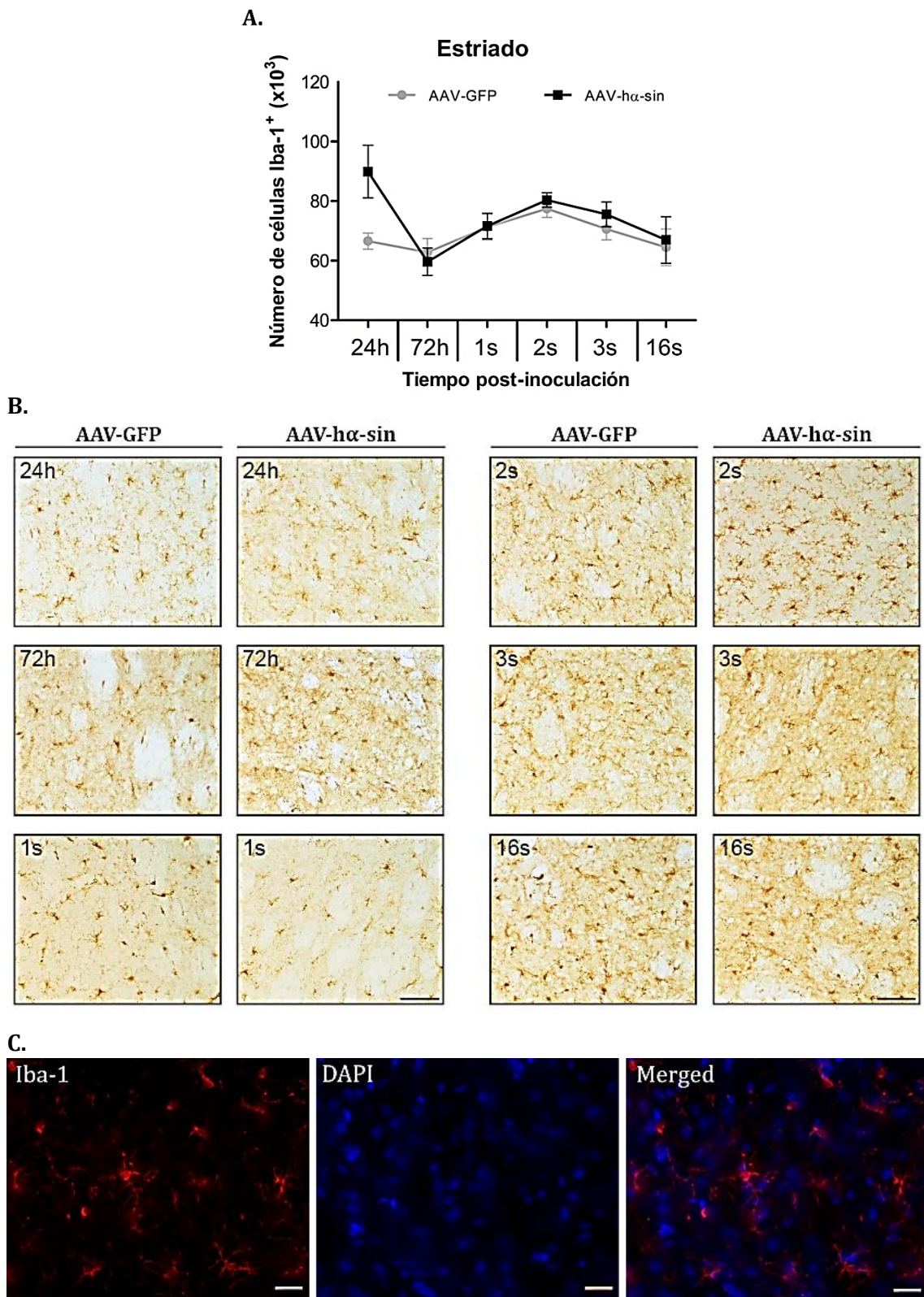


Fig. 17. Expresión de Iba-1 en el estriado. **A.** Cuantificación del número de células Iba-1⁺ en ambos grupos experimentales. Los valores se muestran como la media \pm SEM. **B.** Microfotografías representativas de la tinción con Iba-1 de las secciones coronales estriatales en ambos grupos experimentales. Barra de escala: 200 μ m. **C.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas del grupo AAV-h α -sin a las 16s p.i. en las que observamos células microgliales Iba1⁺ (rojo), su núcleo (DAPI, azul) y la superposición de las anteriores (*Merged*). Barra de escala, 20 μ m.

3.4.- Morfología de las células microgliales Iba-1⁺ en el estriado

- Tipo A:

El grupo AAV- α -sin mostró un aumento significativo en la proporción de células microgliales de tipo A a las 3 semanas p.i. ($p < 0.01$ respecto a 72h p.i.; Figura 18A).

El grupo AAV-GFP mostró una reducción significativa a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 3s p.i.; Figura 18B).

En la comparación intergrupar, el grupo AAV- α -sin mostró un menor porcentaje de células tipo A a 24h ($p < 0.001$) y 72h p.i. ($p < 0.01$; Figura 18A y B).

- Tipo B:

Dentro del grupo AAV- α -sin hubo una disminución en el porcentaje de células tipo B a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 2s p.i.; Figura 18A).

El grupo AAV-GFP mostró una reducción en la proporción de células tipo B a las 16 semanas ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 2s p.i.; Figura 18B).

Comparando ambos grupos experimentales, el grupo AAV- α -sin mostró un mayor porcentaje de células tipo B a 72h p.i. ($p < 0.01$; Figura 18A y B).

- Tipo C:

En el grupo AAV- α -sin hubo un aumento en el porcentaje de células microgliales tipo C a la semana 1 p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; Figura 18A) y a las 16 semanas p.i. ($p < 0.01$ respecto a 24h y a las 2s p.i.).

El grupo AAV-GFP también mostró una mayor proporción de células tipo C a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 2s p.i.; Figura 18B).

Comparando ambos grupos experimentales, el grupo AAV- α -sin mostró un mayor porcentaje de células tipo C a 72h p.i. ($p < 0.01$; Figura 18A y B).

- Tipo D:

En el grupo AAV- α -sin hubo un aumento en el porcentaje de microglía tipo D a las 16 semanas p.i. ($p < 0.01$ respecto a 2s p.i.; Figura 18A).

El grupo AAV-GFP mostró una mayor proporción de células tipo D a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 1s p.i.; $p < 0.01$ respecto a 2s p.i.; Figura 18B).

No se observaron diferencias entre los grupos experimentales a lo largo de los puntos temporales evaluados (Figura 18A y B).

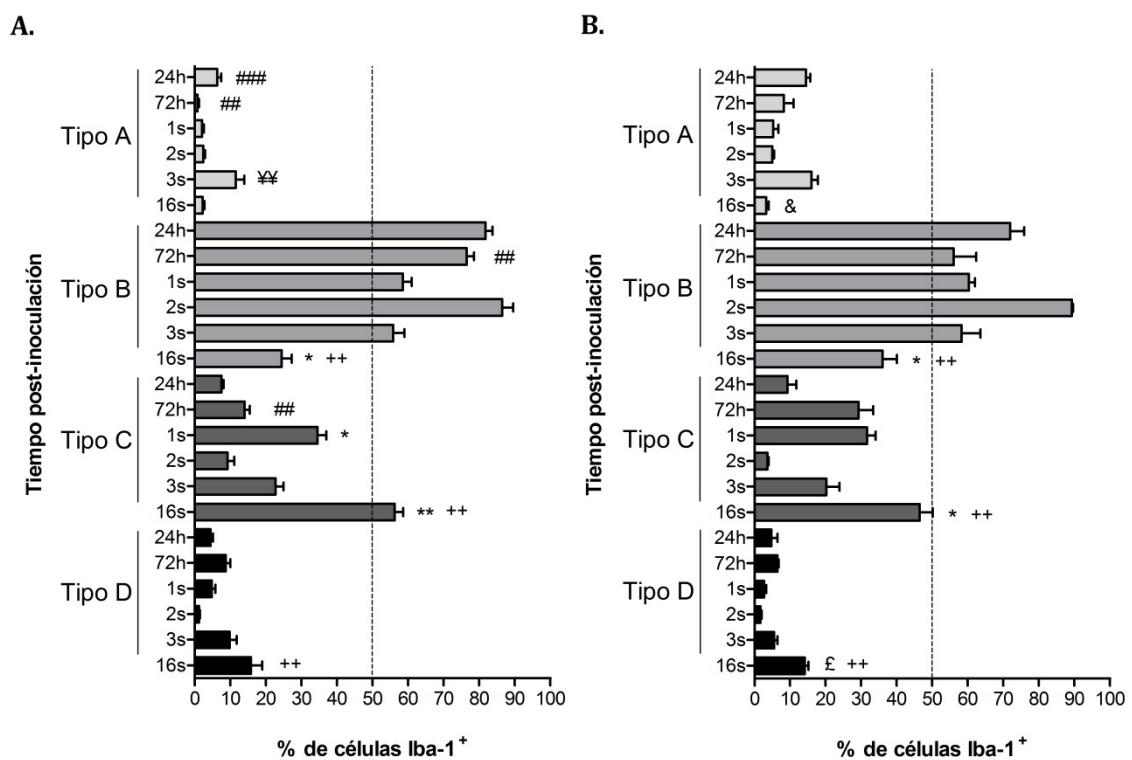


Fig. 18. Morfología de las células Iba-1⁺ en el estriado. **A.** Clasificación de la microglía del grupo AAV- α -sin en sus cuatro fenotipos según su grado de activación. Los valores se muestran como la media del porcentaje del número total de células Iba-1⁺ \pm SEM. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ respecto al grupo AAV-GFP; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto a 24h p.i.; ¥¥ $p < 0.01$ respecto a 72h p.i.; ++ $p < 0.01$ respecto a 2s p.i. **B.** Clasificación de la microglía del grupo AAV-GFP en sus cuatro fenotipos según su grado de activación. Los valores se muestran como el porcentaje del número total de células Iba-1⁺ \pm SEM. * $p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; £ $p < 0.05$ respecto a 1s p.i.; ++ $p < 0.01$ respecto a 2s p.i. & $p < 0.05$ respecto a 3s p.i.

4.- MODIFICACIONES EN EL NÚMERO DE ASTROCITOS

4.1.- Cuantificación de células astrocitarias GFAP⁺ en la SNpc

El grupo AAV-h α -sin mostró un aumento significativo en el número de células GFAP⁺ (Figura 19A, B y C) a las 72h p.i. ($p < 0.05$ respecto a 2s p.i.) y a las 16 semanas p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 2s p.i.), siendo este punto donde se alcanzó la cantidad máxima de astrocitos.

El grupo AAV-GFP no mostró cambios a lo largo del estudio (Figura 19A).

Entre los dos grupos experimentales no observamos diferencias significativas (Figura 19A).

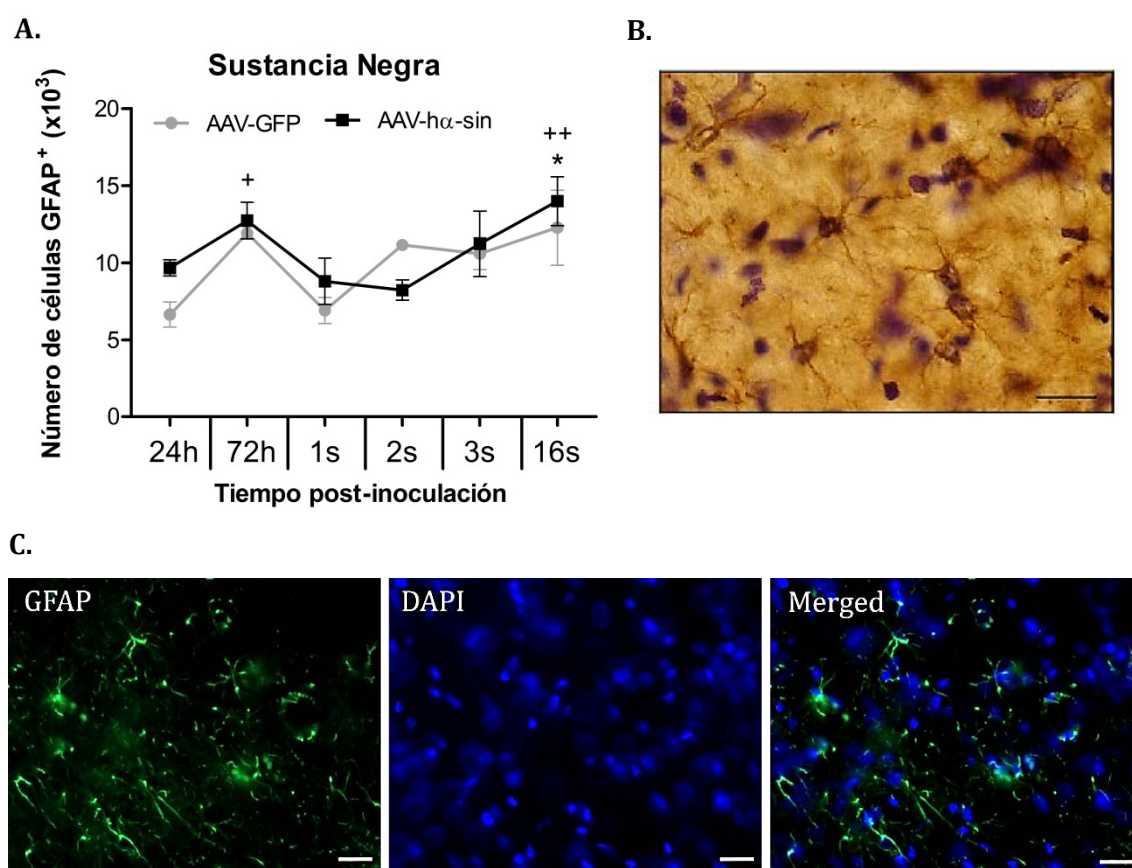


Fig. 19. Expresión de GFAP en la SNpc. **A.** Número de células GFAP⁺ en los grupos AAV-GFP y AAV-h α -sin. Los valores se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ respecto a 2s p.i. **B.** Microfotografía representativa de la tinción con GFAP de una sección coronal de la SNpc del grupo AAV-h α -sin a las 16s p.i. Barra de escala: 100 μ m. **C.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas del grupo AAV-h α -sin a las 16s p.i. en las que observamos astrocitos GFAP⁺ (verde), su núcleo (DAPI, azul) y la superposición de las anteriores (*Merged*). Barra de escala, 20 μ m.

4.2.- Cuantificación de células astrocitarias GFAP⁺ en el estriado

El grupo AAV-h α -sin mostró un aumento significativo de astrocitos estriatales a 1 semana p.i. ($p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; $p < 0.01$ respecto a 72h, 2s, 3s y 16s p.i.; Figura 20A, B y C), que disminuyó de nuevo a niveles basales a partir de las 2 semanas p.i.

El grupo AAV-GFP no mostró diferencias en el número de astrocitos a lo largo de todo el estudio (Figura 20A).

En la comparación intergrupala hubo un aumento significativo del número de astrocitos en el grupo AAV-h α -sin a 1 semana p.i. ($p < 0.05$; Figura 20A).

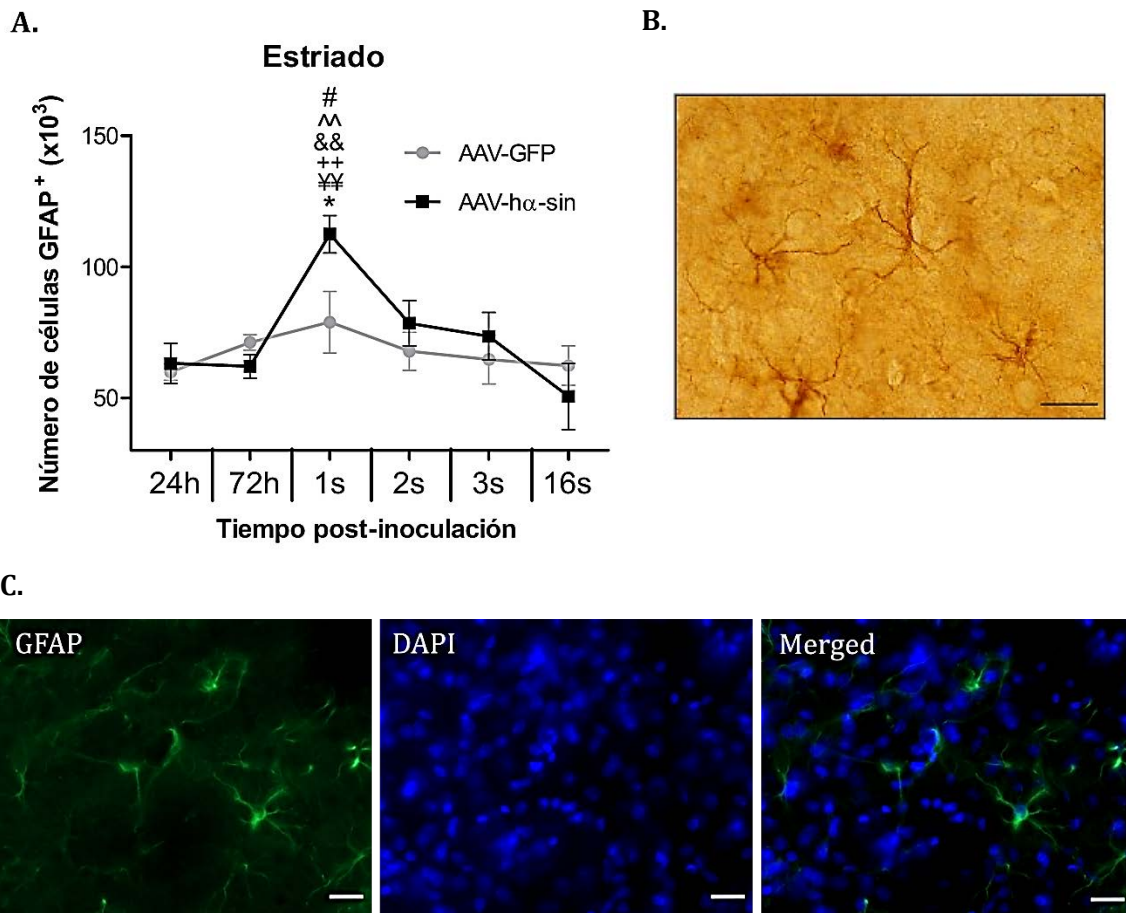


Fig. 20. Expresión de GFAP en el estriado. **A.** Número de células GFAP⁺ en ambos grupos experimentales. Los valores se muestran como la media \pm SEM. # $p < 0.05$ respecto al grupo AAV-GFP; * $p < 0.05$ respecto a 24h p.i.; ¥¥ $p < 0.01$ respecto a 72h p.i.; ++ $p < 0.01$ respecto a 2s p.i.; && $p < 0.01$ respecto a 3s p.i.; ^^ $p < 0.01$ respecto a 16s p.i. **B.** Microfotografía representativa de la tinción con GFAP de una sección coronal del estriado del grupo AAV-h α -sin a las 16s p.i. Barra de escala: 100 μ m. **C.** Imágenes de inmunofluorescencia representativas del grupo AAV-h α -sin a las 16s p.i. en las que observamos astrocitos GFAP⁺ (verde), su núcleo (DAPI, azul) y la superposición de las anteriores (*Merged*). Barra de escala, 20 μ m.

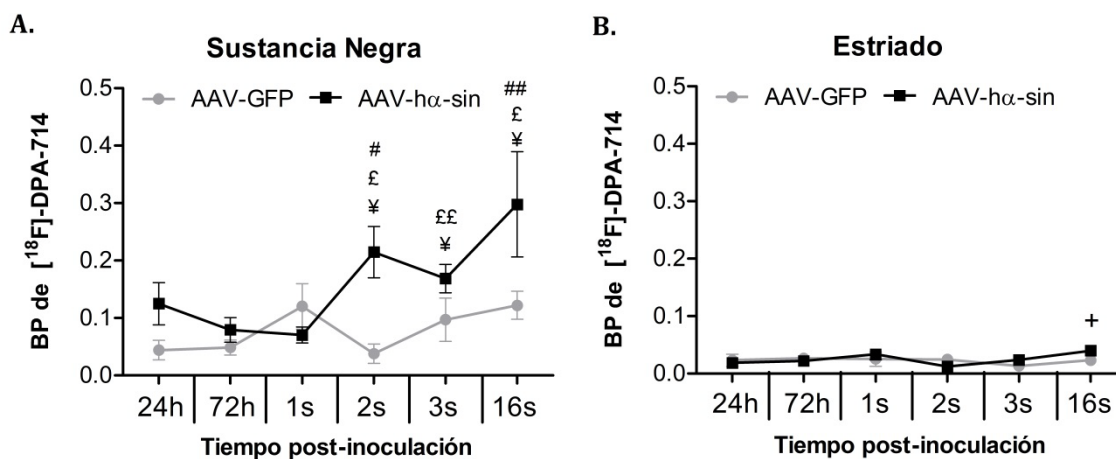
5.- EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL

5.1.- PET *in vivo* con [¹⁸F]-DPA-714 en la SNpc y el estriado

En la SNpc del grupo AAV-hα-sin se observó un aumento de BP de [¹⁸F]-DPA-714 a partir de las 2 semanas p.i. que se mantuvo hasta las 16 semanas p.i. (2s p.i.: p<0.05 respecto a 72h y 1s p.i.; 3s p.i.: p<0.05 respecto a 72h y p<0.01 respecto a 1s; 16s p.i.: p<0.05 respecto a 72h y 1s p.i., Figura 21A). En el estriado hubo un aumento significativo de [¹⁸F]-DPA-714 únicamente a las 16 semanas p.i. en comparación con las 2 semanas p.i. (p<0.05; Figura 21B).

En el grupo AAV-GFP no se observaron diferencias en la unión de radiotrazador en la SNpc ni en el estriado en ningún punto temporal (Figura 21A y B).

Al comparar ambos grupos experimentales hubo una mayor unión de [¹⁸F]-DPA-714 en la SNpc del grupo AAV-hα-sin a la 2ª semana p.i. (p<0.05) y a la 16ª semana p.i. (p<0.01; Figura 21A). En el estriado no hubo diferencias entre grupos experimentales en ningún punto temporal analizado (Figura 21B).



C.

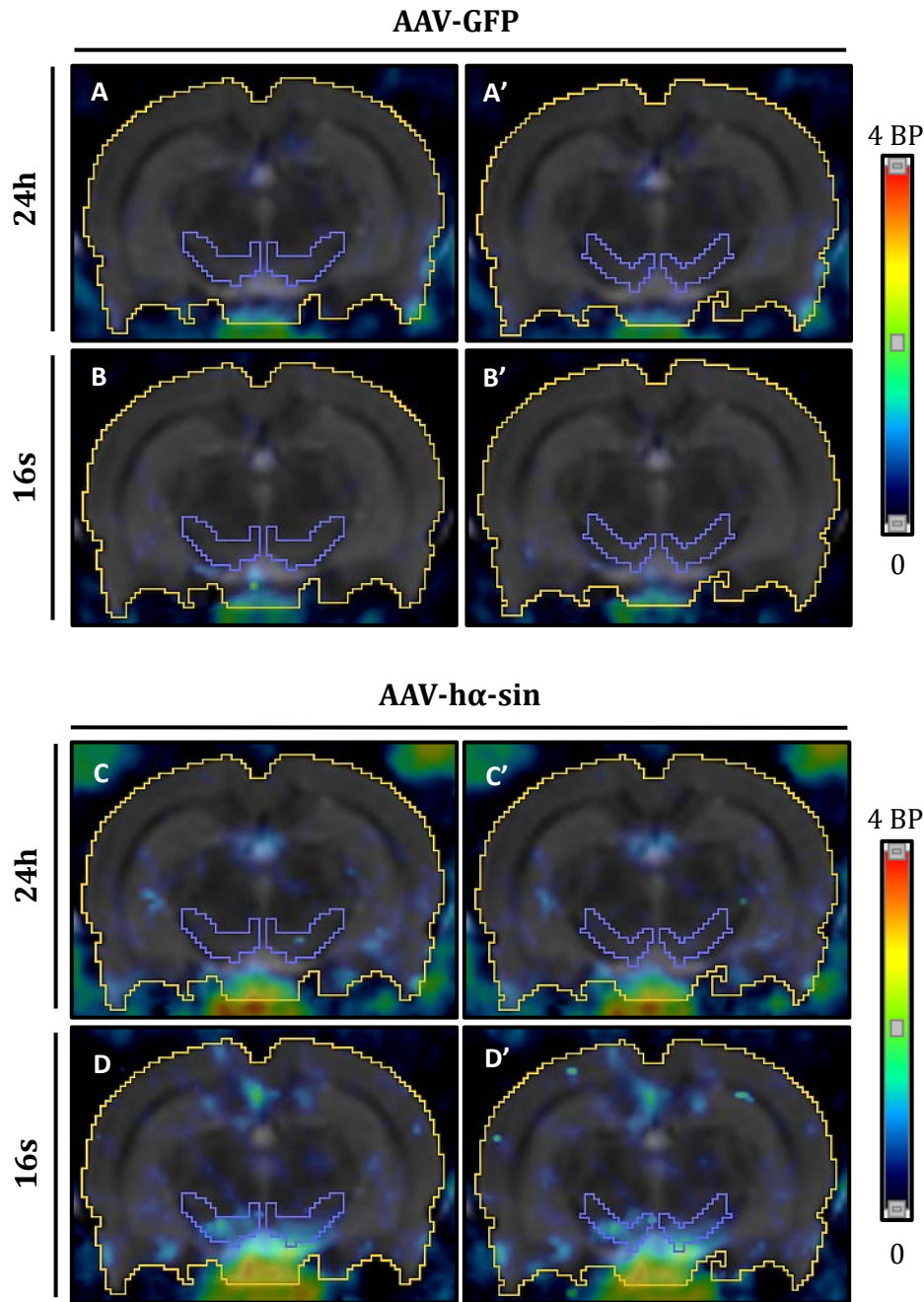


Fig. 21. Evaluación de la activación microglial *in vivo* con [^{18}F]-DPA-714. Representación gráfica del análisis del potencial de unión (BP) del radiotrazador en la SNpc (**A.**) y en el estriado (**B.**). Los valores se muestran como la media \pm SEM. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ respecto al grupo AAV-GFP; ¥ $p < 0.05$ respecto a 72h p.i.; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$ respecto a 1s p.i.; + $p < 0.05$ respecto a 2s p.i. **C.** Imágenes representativas de dos secciones coronales consecutivas de la SNpc de la captación del radiotrazador [^{18}F]-DPA-714 co-registradas con imágenes de tomografía computarizada de ambos grupos experimentales a las 24h (AAV-GFP: A-A'; AAV-h α -sin: C-C') y las 16s p.i. (AAV-GFP: B-B'; AAV-h α -sin: D-D'). La SNpc está delineada en una plantilla de CT para una mejor ubicación anatómica.

6.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS

Dentro del grupo AAV-h α -sin, a 2 semanas p.i., el mesencéfalo mostró una expresión aumentada de iNOS en comparación con el grupo AAV-GFP ($p < 0.05$; Figura 22). No se observaron diferencias entre grupos experimentales en la expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 y TGF- β .

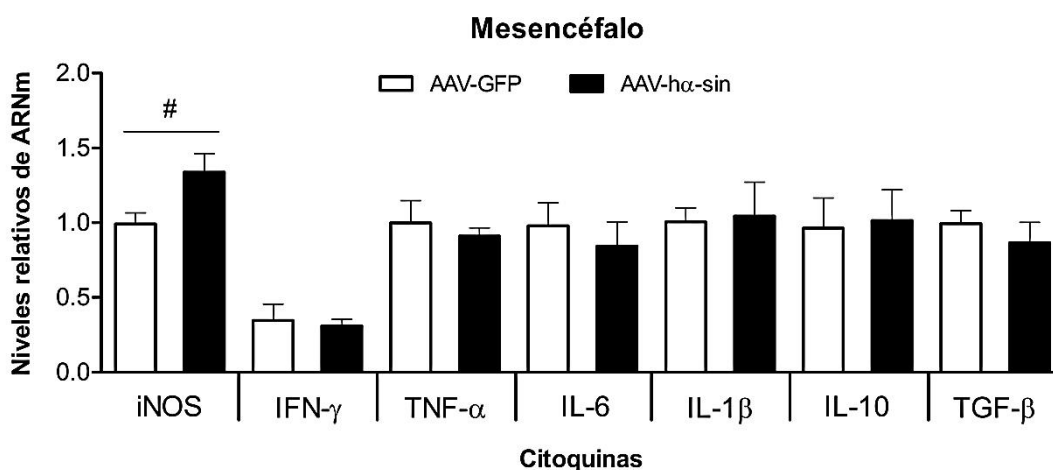


Fig. 22. Expresión de moléculas inflamatorias en el mesencéfalo. Expresión de los mediadores inflamatorios iNOS, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 y TGF- β en el mesencéfalo de los grupos AAV-GFP y AAV-h α -sin a 2s p.i. Los valores se calcularon y se muestran en relación con la expresión de GAPDH con la fórmula $2\Delta Ct \pm SEM$. # $p < 0.05$ respecto al grupo AAV-GFP.

7.- ANÁLISIS DE CORRELACIONES

Los resultados en la SNpc del grupo AAV-h α -sin (Figura 23) mostraron una correlación negativa entre la DOR de h α -sin y el número de neuronas TH⁺ ($r_s = -0.5321$, $p < 0.01$) y una correlación positiva con el número total de células Iba-1⁺ ($r_s = 0.3608$, $p < 0.05$) y con los valores de [¹⁸F]-DPA-714 ($r_s = 0.5376$, $p < 0.01$).

Los datos también mostraron una correlación negativa entre la captación de [¹⁸F]-DPA-714 y el número de neuronas TH⁺ ($r_s = -0.4501$, $p < 0.05$) y una correlación positiva entre los valores de [¹⁸F]-DPA-714 y el número total de células Iba-1⁺ ($r_s = 0.4054$, $p < 0.05$). No se encontró correlación con las células GFAP⁺.

Por el contrario, en el estriado no se observó correlación entre ningún marcador.

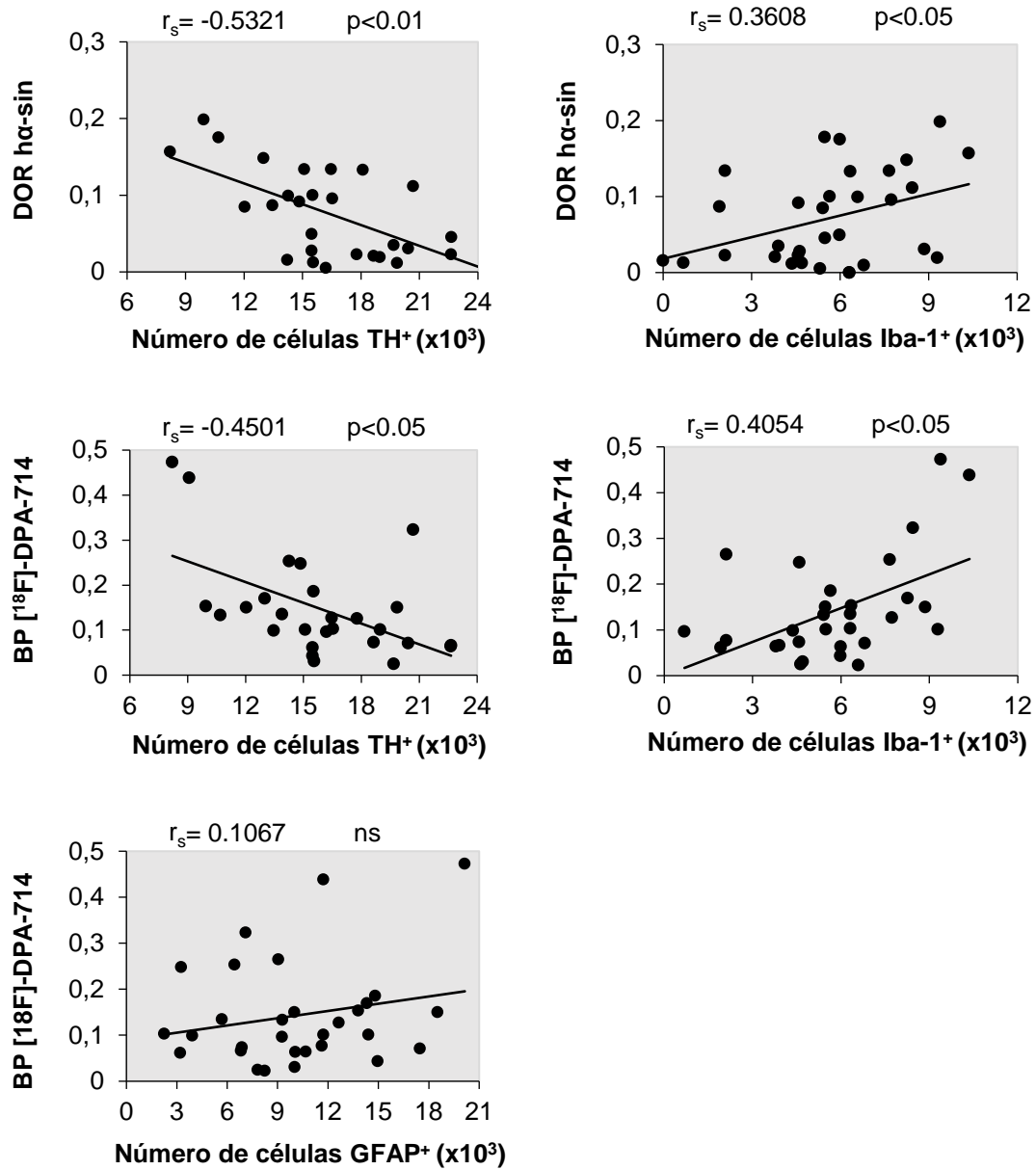


Fig. 23. Correlaciones Rho de Spearman. Representación de las correlaciones en la SNpc del grupo AAV-hα-sin.

A.

SNpc	24h	72h	1s	2s	3s	16s
h α -sin	-	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Iba-1	-	↑	-	↑↑	↑↑	↑↑↑
[¹⁸ F]-DPA-714	-	-	-	↑↑	↑↑	↑↑
TH	-	-	-	-	↓	↓
Bradicinesia	-	-	-	-	↓	↓↓↓
GFAP	-	↑	-	-	-	↑

B.

ESTRIADO	24h	72h	1s	2s	3s	16s
h α -sin	-	-	-	↑↑↑	↑↑	↑
Iba-1	-	-	-	-	-	-
[¹⁸ F]-DPA-714	-	-	-	-	-	↑
TH	-	-	-	-	-	↓↓↓
GFAP	-	-	↑↑↑	-	-	-

Fig. 24. Resumen del aumento (verde) y disminución (rojo) en los marcadores del grupo AAV-h α -sin medidos en los distintos puntos temporales en la SNpc (A.) y en el estriado (B.).



DISCUSIÓN

La presente tesis se ha centrado en intentar dilucidar, tanto en la SNc como en el estriado, la relación temporal entre la sobreexpresión de α -sin, la expresión glial (microglía y astrocitos) y la lesión dopaminérgica causada por la sobreexpresión de α -sin con la mutación A53T en la SNpc. Además, se ha evaluado la viabilidad y especificidad del PET usando el radiotrazador [18 F]-DPA-714 para la detección *in vivo* de microglia reactiva desde las primeras fases de neurodegeneración, así como si el PET con este radiotrazador, pudiera ser un marcador fiable de degeneración dopaminérgica.

1.- MODELO AAV- α -SIN Y DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA

Distintos trabajos se han llevado a cabo para el estudio de la expresión glial en el modelo con inoculación de AAV- α -sin nativa o con la mutación A53T o en modelos genéticos de sobreexpresión ubicua de α -sin nativa, mutada o dobles mutantes (A53T y A30P), (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Castro-Sánchez et al., 2018; Henrich et al., 2018; Crabbé et al., 2019a, 2019b). Sin embargo, a diferencia de la EP en la que la lesión dopaminérgica es bilateral desde el inicio, en los trabajos con inoculación de vectores virales, las lesiones dopaminérgicas han sido unilaterales, lo que puede producir una respuesta compensatoria en el hemisferio intacto, no remediando lo que ocurre en la EP (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012; Castro-Sánchez et al., 2018; Crabbé et al., 2019a, 2019b). Además, en la mayoría de los trabajos no se evalúa el comportamiento motor de los animales, ni la depleción dopaminérgica en el estriado, limitándose a establecer la pérdida dopaminérgica exclusivamente en la SNpc o la extensión de la α -sin de manera general cuando la pérdida dopaminérgica ya es significativa, no evaluando los estadios previos ni precoces de dicha muerte (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012). Por otro lado, en los estudios con modelos genéticos donde la sobreexpresión de α -sin es ubicua, solo se evalúa el estado inflamatorio, pero no la degeneración dopaminérgica ni la relación de esta con la activación glial ni en SNpc ni en estriado (Su et al., 2009; Couch et al., 2011; Béraud et al., 2013).

Por ello, en primer lugar y de manera diferencial a los estudios previos, en nuestro estudio observamos que la inoculación bilateral del vector viral con α -sin con la mutación A53T (AAV- α -sin) provoca una expresión de sinucleína progresiva en la SNpc y el estriado que es significativa desde la semana 2 p.i. Paralelamente, se observa una leve y progresiva pérdida bilateral de neuronas dopaminérgicas en la SNpc (33%) desde la 3^a semana p.i. manteniéndose estable hasta las 16 semanas, así como una pérdida de fibras TH⁺ en el estriado a 16 semanas p.i (46%, Figura 24). Esta pérdida dopaminérgica causa bradicinesia, medida por el *stepping test*, a partir de la 3^a semana (Figura 24), asemejándose así al momento del diagnóstico de la EP (40-60% de neuronas dopaminérgicas en la SNpc) (Burke and O'Malley, 2013; Poewe et al., 2017) y permitiendo el estudio de la activación glial previamente a la degeneración dopaminérgica y en las fases precoces de la misma, validando así el modelo elegido para los objetivos principales de este proyecto de tesis. En conjunto, nuestro modelo aporta información temprana de activación glial y sobreexpresión de α -sin, antes del inicio de la pérdida dopaminérgica bilateral, tanto en el estriado como en la SNpc y su correlación con la presencia de alteraciones motoras.

2.- RELACIÓN TEMPORAL ENTRE LA SOBREENPRESIÓN DE α -SIN, MICROGLÍA Y LESIÓN DOPAMINÉRGICA

2.1.- Sustancia negra

Se ha descrito que la sobreexpresión de α -sin nativa o con la mutación A35T mediada por AAV en la SNpc induce una reacción inflamatoria (Daher et al., 2014, 2015; Allen Reish and Standaert, 2015; Daniel et al., 2015) que se caracteriza por la activación de la microglía y la expresión de marcadores inflamatorios (Chung et al., 2009; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012; Castro-Sánchez et al., 2018; Crabbé et al., 2019a, 2019b). Sin embargo, los estudios previos tan solo han evaluado esta respuesta cuando la expresión de α -sin es avanzada y siempre posteriormente a la muerte dopaminérgica, puesto que han estudiado puntos temporales tardíos tras la inoculación del vector viral (Chung et

al., 2009; Barkholt et al., 2012; Castro-Sánchez et al., 2018), por lo que se desconoce si existe activación glial antes de la degeneración dopaminérgica.

Nuestro estudio se centra en el patrón temporal entre la activación de la microglía y la degeneración dopaminérgica desde el inicio de la sobreexpresión de α -sin. El hallazgo principal que observamos es una proliferación microglial significativa en la SNpc a las 2 semanas p.i., coincidiendo con la sobreexpresión significativa de α -sin en este núcleo y precediendo a la muerte dopaminérgica (semana 3 p.i., Figura 24). Asimismo, existe una correlación positiva entre esta proliferación microglial y los niveles de α -sin, pero no entre la microglía y la pérdida dopaminérgica. Este hallazgo nos indica que la respuesta de la microglia no parece estar relacionada con la muerte celular, siendo probablemente consecuencia de la sobreexpresión de α -sin, apoyando la proliferación microglial como un índice sensible de cambios neuropatológicos precoces, previos al inicio de la degeneración dopaminérgica.

En este sentido, se ha descrito un aumento temprano de la proliferación microglial en el hipocampo de casos de EP incidental (sujetos sanos sin enfermedad neurológica conocida con presencia de cuerpos de Lewy en el estudio *post mortem*, y que se considera como un estado prodrómico de la EP). Curiosamente, estos cambios no se observaron en los pacientes con EP de larga duración, sugiriendo una respuesta temprana al desarrollo de la patología de α -sin en la EP (Doorn et al., 2014). Además, un estudio en modelos de ratón de EA, mostró que los cambios en la proliferación microglial coinciden en el tiempo con aumentos de placas de $A\beta$ (Kamphuis et al., 2012), sugiriendo que una acumulación de proteínas aberrantes puede desencadenar proliferación microglial. De la misma forma, en modelos animales con patología por α -sin también se ha demostrado una microgliosis dinámica en función de la expresión de α -sin e influenciada, pero no dependiente, de la muerte celular (Gomez-Isla et al., 2003; Tofaris et al., 2006; Theodore et al., 2008; Sanchez-Guajardo et al., 2010; Emmer et al., 2012).

Por otro lado, es importante destacar que, en nuestro modelo, la proliferación de células microgliales no conllevó diferencias significativas en los subtipos morfológicos respecto al grupo control (AAV-GFP) y además presentó

escasas variaciones a lo largo del tiempo. Esto podría sugerir que los fenotipos microgliales observados en estudios *post mortem* en pacientes con EP podrían estar dependiendo de otros cambios en el microambiente más complejos que los presentes en este modelo animal, como podrían ser la liberación de factores solubles (citoquinas y quimiocinas), que no ocurrieron en nuestro modelo, el nivel de expresión de α -sin o el de muerte dopaminérgica (Mogi et al., 1994, 1995, 1996; Brodacki et al., 2008; Rentzos et al., 2009; Tansey and Goldberg, 2010). En este sentido, en nuestro estudio, no observamos liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias en el punto máximo de expresión de α -sin y previo a la degeneración dopaminérgica nigral significativa. Por otra parte, en modelos neurotóxicos de lesión dopaminérgica, la sobreproducción de citoquinas inflamatorias impulsa la polarización de la microglía hacia un fenotipo más fagocítico presente en etapas con una neurodegeneración muy marcada como presentan estos modelos (Depino et al., 2003; Luchtman et al., 2009; Barcia et al., 2011; Harms et al., 2013; Pisanu et al., 2014). Además, los estudios en ratas y primates que sobreexpresan la AAV- α -sin han proporcionado evidencia convincente de que la microglía adquiere diferentes fenotipos (Sanchez-Guajardo et al., 2010; Barkholt et al., 2012) cuando el grado de degeneración dopaminérgica inducida es, al menos, del 50% (Sanchez-Guajardo et al., 2010). Así, los trabajos experimentales sugieren que los cambios morfológicos de la microglía pueden ser un fenómeno tardío en el proceso de muerte dopaminérgica. El hecho de que en este trabajo no se haya encontrado esta diferenciación fenotípica posiblemente se deba a que no hay liberación de citoquinas y a que se han estudiado estadios precoces con un máximo de muerte dopaminérgica del 30%, sugiriendo que el cambio fenotípico no parece jugar un papel en el inicio de la pérdida dopaminérgica, en línea con el objetivo del estudio.

Sin embargo, un dato de gran interés es que a las 2 semanas p.i., coincidiendo con el pico de expresión de α -sin y antes de la muerte dopaminérgica, observamos un aumento significativo de iNOS en el mesencéfalo. La evidencia experimental y clínica ha sugerido que iNOS juega un papel clave en la degeneración del sistema dopaminérgico nigrostriatal (Liberatore et al., 1999; Pattarini et al., 2007; Yasuda et al., 2008; Aquilano et al., 2008; Bian et al., 2009; Tapias et al., 2009; Lofrumento et al., 2011). Un estudio reciente mediante adición

exógena de fibrillas de α -sin en cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas muestra que, si se suprime la inflamación a través de la regulación negativa de la expresión de iNOS y del estrés oxidativo concomitante, se preservan las neuronas dopaminérgicas, sugiriendo que el NO derivado de iNOS está directamente implicado en la patogenicidad de fibrillas de α -sin (Tapias et al., 2017). Se ha descrito que, durante la inflamación, la activación concomitante de iNOS, NADPH oxidasa y COX-2 producen altos niveles de ROS y RNS, favoreciendo el estrés oxidativo (García-Revilla et al., 2019). Además, iNOS muestra un recambio relativamente lento y produce NO a niveles muy altos durante largos períodos, que, a su vez, está implicado en la liberación de hierro de la transferrina, potenciando así la reacción de Fenton que conduce a la producción de radicales hidroxilos altamente reactivos y al posterior estrés oxidativo (Reif and Simmons, 1990) . Nuestros hallazgos sugieren que en ese punto temporal (2 semanas p.i.) donde la microglía es particularmente abundante en la SNpc y dado que las neuronas dopaminérgicas son altamente susceptibles al estrés oxidativo/nitrosativo, la activación de iNOS podría provocar una sobreproducción de ROS/RNS, resultando en un daño en las neuronas dopaminérgicas que conduciría a la muerte dopaminérgica observada a las 3 semanas p.i.

2.2.- Estriado

Otro hallazgo interesante en el trabajo presentado es la dualidad en la respuesta inflamatoria entre la SNpc y estriado ante la expresión de α -sin y el desarrollo de la patología dopaminérgica. Al contrario de la SNpc, donde el incremento de células Iba-1⁺ se observa desde la semana 2 p.i. y es previo a la degeneración dopaminérgica, en el estriado no observamos ningún cambio ni en proliferación de microglía ni en su morfología respecto al grupo control a lo largo del tiempo (Figura 24). Un estudio mediante citometría de flujo y análisis genético ha demostrado que la microglía en humano difiere de un área cerebral a otra (de Haas et al., 2008; Matcovitch-Natan et al., 2016); probablemente como respuesta al entorno, (aferencias, actividad neuronal en el área, agregación α -sin, etc.) (Ferreira and Romero-Ramos, 2018). Nuestros resultados sugieren que las inclusiones estriatales de α -sin no desencadenan precozmente microgliosis

reactiva y que, probablemente, otros factores, como la funcionalidad del terminal dopaminérgico, que se discutirá en el siguiente apartado, el microambiente local o la propia densidad de microglía y astrocitos pueden estar involucrados en la respuesta glial (Duffy et al., 2018), proponiendo que la escasa activación microglial en el estriado que se observa en la semana 16 p.i., podría ser secundaria a la muerte dopaminérgica.

3.- RELACIÓN TEMPORAL ENTRE LA SOBREENPRESIÓN DE α -SIN, ASTROCITOS Y LESIÓN DOPAMINÉRGICA

3.1.- Sustancia negra

Este trabajo de tesis doctoral describe por vez primera el perfil temporal de la activación de astrocitos en relación a la expresión de α -sin y la muerte dopaminérgica en este modelo animal. Solo existe un estudio previo en ratones con inoculación unilateral de AAV- α -sin nativa y con la mutación A53T que muestra un aumento de astrocitos GFAP⁺ a las 4 semanas p.i., cuando la pérdida dopaminérgica en la SNpc es del 55% y 85%, respectivamente (Castro-Sánchez et al., 2018).

Datos previos en el modelo de ratón MPTP describen que la reacción astrocítica ocurre después de la muerte neuronal (Przedborski et al., 2000), lo que está respaldado por el hallazgo de que el bloqueo de la absorción de MPP⁺ en las neuronas dopaminérgicas no solo previene la muerte de las neuronas de la SNpc, sino también el aumento de GFAP (O'Callaghan et al., 1990). Sin embargo, es interesante observar el efecto que tienen los diferentes métodos de administración de rotenona en la respuesta de astrocitos en ratones. Una única infusión unilateral de rotenona en el mesencéfalo resulta en la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, terminales en el estriado y reacción glial significativa que involucra tanto astrocitos como microglía (Norazit et al., 2010). Por el contrario, ratones sometidos a infusión crónica de rotenona muestran también degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas, agregados de α -sin y activación microglial severa, pero una regulación mínima de astrocitos (Sherer et al., 2003). De esta manera, es importante considerar si la rápida activación de microglía y astrocitos

en los modelos neurotóxicos (MPTP, 6-OHDA, rotenona) ocurre en respuesta a un insulto agudo con lesión severa, pero no en condiciones de cronicidad en el proceso patológico.

De acuerdo a esta interpretación, en nuestro estudio y en contraposición a los hallazgos de la microglía, existe una activación astrocitaria transitoria en la SNpc a las 72h p.i. respecto a la situación basal, pero no respecto al grupo control (Figura 24). Esta activación coincide con el inicio de sobreexpresión de α -sin. Sin embargo, la falta de diferencia respecto al grupo control sugiere que dicha activación estaría más relacionada con el insulto agudo de la inoculación. De modo que, pasado el insulto agudo, los niveles de astrocitos permanecen en valores basales en los dos grupos hasta las 16 semanas p.i., cuando tan solo en el grupo α -sin existe un incremento significativo que coincide con la muerte dopaminérgica significativa.

Por otro lado, se ha descrito que los astrocitos en la EP pueden tanto facilitar el daño neuronal mediante la estimulación de la activación microglial que conduce a la liberación de citoquinas (Ben Haim et al., 2015) o prevenirla mediante la producción de diversos factores neurotróficos y moléculas antioxidantes dirigidos a la supervivencia neuronal (Ramaswamy and Kordower, 2009; Rappold and Tieu, 2010; Yasuda and Mochizuki, 2010; Halliday and Stevens, 2011; Pekny and Pekna, 2014). Por ello, debido a la multitud de funciones protectoras que poseen los astrocitos en su situación basal, no puede descartarse que realicen esta función mediante la liberación factores neurotróficos, antioxidantes, etc., como se ha propuesto en estudios previos (Rappold and Tieu, 2010; Joe et al., 2018). En concreto, se ha sugerido que los astrocitos pueden ser inicialmente neuroprotectores en un modelo transgénico de α -sin con la mutación A53T, pero con el tiempo, al aumentar la exposición a los agregados tóxicos de α -sin, pueden perder dicho efecto o activarse de manera aberrante, liberando factores tóxicos (Mena and García de Yébenes, 2008; Sekiyama et al., 2012).

De manera especulativa, en nuestro modelo, los astrocitos a las 72h p.i. podrían estar percibiendo el insulto generado por la inoculación del vector viral y por el inicio de la expresión de α -sin, activándose puntualmente para proteger las neuronas manteniéndolas “intactas” hasta la 3^a semana p.i. en el caso exclusivo del

grupo parkinsoniano. Los astrocitos de este grupo seguirían expuestos a una toxicidad creciente de α -sin, hasta perder su función neuroprotectora de manera más tardía (16 semanas p.i.), ya que la expresión de α -sin es progresivamente mayor. No obstante, esta interpretación tiene que ser verificada mediante un estudio de citoquinas y factores tróficos a las 72h p.i., que es objeto de futuros estudios (Figura 24).

Por otra parte, sólo un pequeño número de estudios ha evaluado la respuesta de astrocitos en el tejido cerebral de pacientes con EP. Si bien se ha observado un aumento variable en GFAP en estriado y corteza frontal (Mythri et al., 2011), la activación es muy escasa en la SNpc (Mirza et al., 2000; Song et al., 2009; Charron et al., 2014), en concordancia con nuestros datos.

3.2.- Estriado

Nuevamente observamos una respuesta diferente entre lo que sucede en la SNpc frente a lo que sucede en el estriado, donde la activación de los astrocitos es evidente únicamente en la semana 1 p.i. en el grupo parkinsoniano, y coincidiendo con el inicio de la sobreexpresión de α -sin en este núcleo (Figura 24).

Tal como se ha indicado en la sección previa, los astrocitos tienen un papel dual y, además de neuroprotección, pueden desempeñar un papel crítico en la patogénesis de la EP a través del estrés oxidativo y nitrosativo. Los análisis *post mortem* de los cerebros de pacientes con EP, así como los modelos animales experimentales, muestran activación de astrocitos en el estriado y niveles elevados de ROS/RNS. En este sentido, estudios de nuestro grupo de investigación demuestran en el mismo modelo animal empleado en esta tesis una disfunción de la respiración mitocondrial (respiración máxima y capacidad de reserva) en el estriado a la semana 1 p.i. en el grupo α -sin, sugiriendo que la sobreexpresión de α -sin en las terminales dopaminérgicas está induciendo disfunción bioenergética y estrés oxidativo. Este estrés oxidativo que tiene lugar en la terminal dopaminérgica posiblemente condicione un cambio en el microambiente que podría desencadenar una activación compensatoria aguda astrocitaria o bien contribuir a su daño por oxidación. En este sentido, existen trabajos que

demuestran que el estrés oxidativo puede ser una consecuencia de la producción aberrante de ROS inducida por disfunción mitocondrial y/o catálisis de dopamina (Alam et al., 1997; Giasson et al., 2002; Jacobson and Duchon, 2002; Kushnareva et al., 2002). Por otro lado, otra posible explicación podría ser la actividad fagocítica de los astrocitos como mecanismo neuroprotector para aclarar los terminales dopaminérgicos disfuncionales en relación al fallo funcional descrito en el apartado previo. En este sentido, y en concordancia con lo observado en nuestro estudio, un estudio demuestra que la actividad fagocítica de los astrocitos por un mecanismo complejo, que involucra la cooperación de los terminales dopaminérgicos en degeneración y los astrocitos circundantes, es suficiente para mantener el estriado libre de desechos dopaminérgicos, evitando así el reclutamiento de microglía y los efectos citotóxicos de los astrocitos en las neuronas dopaminérgicas (Morales et al., 2017).

La activación astrocítica podría ser también una respuesta neuroprotectora en promover la protección sináptica. Un estudio reciente ha observado que oligómeros de α -sin inducen la reactividad de los astrocitos que, mediante liberación de TGF- β 1, mejoran la capacidad sinaptogénica en cultivos de astrocitos humanos y murinos. Además, la inyección intracerebroventricular de α -sin en ratones, aumentó el número de astrocitos reactivos, promoviendo un aumento de la densidad de las sinapsis excitatorias y los niveles de TGF- β 1 en el estriado de los animales inyectados, sugiriendo la existencia de un nuevo mecanismo de protección sináptica contra la excitotoxicidad por α -sin dependiente de los astrocitos en las primeras etapas de la EP (Diniz et al., 2019).

Ambas explicaciones concuerdan con lo observado en nuestro estudio, donde observamos el aumento astrocitario a 1 semana p.i., pero no observamos ninguna respuesta a nivel microglial y se mantienen los terminales dopaminérgicos intactos hasta la semana 16 p.i.

El estudio de la capacidad fagocítica y el efecto neuroprotector de los astrocitos junto con los niveles de citoquinas en el estriado de este modelo animal, queda pendiente de investigación en futuras líneas de este trabajo.

4.- UTILIDAD DEL PET CON [¹⁸F]-DPA-714 PARA DETECTAR LA ACTIVACIÓN GLIAL *IN VIVO* EN RELACIÓN A LA MUERTE DOPAMINÉRGICA

En este estudio mostramos que [¹⁸F]-DPA-714 es un marcador *in vivo* fiable y específico de la activación microglial en la SNpc en un modelo de degeneración dopaminérgica progresiva inducida por la sobreexpresión de hα-sin, incluso en la fase más temprana de pérdida dopaminérgica. Existe una correlación positiva entre la captación de [¹⁸F]-DPA-714 *in vivo* y el número de células microgliales Iba-1⁺ en la SNpc, pero en cambio, no con el número de astrocitos medido por el marcador GFAP, dando especificidad a los resultados *in vivo*. Es importante destacar que la activación microglial y la correlación entre el estudio *in vivo* y *post mortem* se produce desde la 2^a semana p.i., cuando la degeneración dopaminérgica aún no es significativa (Figura 24). Además, la captación de [¹⁸F]-DPA-714 se correlaciona inversamente con la degeneración dopaminérgica en la SNpc, lo que sugiere que la microglía activada está involucrada en las fases más tempranas de la degeneración dopaminérgica y en su progresión.

Este hallazgo es muy relevante, ya que, hasta la fecha, la mayoría de estudios PET realizados en pacientes con EP han sido con el radiotrazador [¹¹C]-(R)-PK11195 y durante diferentes etapas de la enfermedad, lo que deriva en resultados heterogéneos y no concluyentes.

Por un lado, en pacientes de EP temprana, recién diagnosticados y no tratados previamente con fármacos, la captación de [¹¹C]-(R)-PK11195 fue mayor en el mesencéfalo (Ouchi et al., 2005; Iannaccone et al., 2013) y en el putamen (Iannaccone et al., 2013) y la captación en mesencéfalo se correlacionó inversamente con la disponibilidad de DAT en el putamen, así como con la gravedad de los síntomas motores (Ouchi et al., 2005).

Por otro lado, en pacientes de estadios más avanzados, se ha demostrado un incremento significativo de la unión de [¹¹C]-(R)-PK11195 en los ganglios basales y las regiones corticales frontal y temporal, pero, curiosamente, no se han observado cambios en el mesencéfalo ni correlación con la gravedad de los signos motores o con la captación de [¹⁸F]-DOPA en el putamen en este estudio (Gerhard et al., 2006). En esta línea, otro estudio no encontró valores significativamente más altos

de [^{11}C]-(R)-PK11195 en el mesencéfalo y el putamen contralateral al lado más parkinsoniano, pero no se evaluó la disfunción nigroestriatal (Bartels et al., 2010). Asimismo, aunque los estudios en sujetos en etapas prodrómicas de la EP son escasos, un estudio en pacientes con iRBD mostró una captación de [^{11}C]-(R)-PK11195 más alta en la SNpc y en el estriado, pero no se observó correlación entre este hallazgo y la reducción de [^{18}F]-DOPA en el estriado (Stokholm et al., 2017).

Por lo tanto, existe un alto grado de variabilidad en los hallazgos de los estudios clínicos en pacientes con EP que puede deberse a diferencias en las cohortes estudiadas y en los métodos de análisis utilizados (Bartels et al., 2010), pero también debido al uso de [^{11}C]-(R)-PK11195, ya que este radiotrazador tiene baja especificidad y afinidad de unión debido a su naturaleza altamente lipofílica y baja biodisponibilidad, lo que limita su capacidad para detectar pequeños cambios en la expresión de TSPO (Boutin et al., 2007; Chauveau et al., 2008; Chen and Guilarte, 2008; Venneti et al., 2009). Estos hallazgos confirman una necesidad de realizar estudios de PET con trazadores de nueva generación con mayor afinidad por TSPO. En este contexto, nuestro estudio es muy relevante, ya que demuestra por primera vez que el PET con [^{18}F]-DPA-714 *in vivo* es un biomarcador fiable de activación microglial desde su fase más temprana, incluso anterior a la pérdida dopaminérgica significativa.

En contraste con los hallazgos en la SNpc, en el estriado, la captación de [^{18}F]-DPA-714 solo aumentó levemente a las 16 semanas p.i., mientras que no hubo incremento de las células Iba-1⁺, ni GFAP⁺ ni correlación con la pérdida de terminales dopaminérgicos medidos por TH (Figura 24). Estos datos están en consonancia con estudios previos en modelos animales de parkinsonismo donde se observó un aumento de la activación microglial en el punto de la lesión directa con 6-OHDA en la SNpc, pero solo una activación microglial débil o ausente en el estriado (Kitamura et al., 2010; Walsh et al., 2011; Fricke et al., 2016). Esta activación microglial diferencial en ambas áreas podría estar relacionada con una mayor susceptibilidad de la SNpc en la EP (Galvin, 2006; Chan et al., 2010; Saxena and Caroni, 2011) o con la mayor densidad de microglía descrita en la SNpc (Lawson et al., 1990; Savchenko et al., 1997; Bachiller et al., 2018).

Hasta la fecha, ningún trazador de PET ha podido distinguir entre diferentes subtipos microgliales o capturar la transición entre diferentes estados de activación (Vivash and O'Brien, 2016). En nuestro estudio, aunque no encontramos una correlación significativa entre los resultados de PET y los subtipos morfológicos en la SNpc, a 16 semanas p.i., cuando la captación [^{18}F]-DPA-714 fue más alta, los subtipos microgliales predominantes en el grupo AAV- α -sin fueron los más reactivos (C y D). De manera similar, en el estriado a las 16 semanas p.i. predominantemente observamos tipo C. Estos resultados sugieren que un perfil de tipo microglía/macrófagos activados contribuyen a la señal de TSPO y, por lo tanto, a la captación de [^{18}F]-DPA-714. Es importante destacar que, mientras que se ha sugerido una falta de especificidad de [^{18}F]-DPA-714 para la activación microglial debido a la expresión concomitante de TSPO en astrocitos reactivos (Rojas et al., 2007; Ji et al., 2008; Lavissee et al., 2012), en nuestro estudio no observamos correlación entre las células GFAP⁺ y [^{18}F]-DPA-714, lo que nos indicaría especificidad para la microglía activada.

Sin embargo, este estudio tiene varias limitaciones. Debido a que para realizar una correcta correlación *in vivo* y *post mortem* la perfusión del tejido para histología debía hacerse el mismo día del estudio de PET, por motivos de seguridad, la perfusión se realizaba una vez decaída la actividad radioactiva del radiotrazador. Este factor limitó el número de animales a manipular en un único día para obtener diferencias significativas *in vivo* en el estudio de PET (N=5 animales por grupo, 10 animales en total cada día de estudio), siendo el número reducido de animales un factor limitante para los posteriores estudios histológicos.

El uso de la sobreexpresión de GFP como control del vector viral, ha producido una cierta variabilidad de respuesta que, potencialmente, ha confundido la interpretación de los datos experimentales *post mortem*, siendo otro factor limitante del estudio.

Por último, la necesidad de perfusión del tejido para los estudios histológicos ha dificultado el uso del mismo para otras técnicas complementarias en tejido fresco para el análisis de citoquinas o mediadores inflamatorios, así como el análisis en profundidad del papel de los astrocitos y su relación con la

sobreexpresión de α -sin en los estadios iniciales que se realizarán en la continuación de este proyecto.

En resumen, este trabajo muestra que, tras la sobreexpresión de α -sin en la SNpc y en el estriado, la glía de la SNpc presenta una alta activación en comparación con el estriado y una respuesta diferencial entre microglía y astrocitos. Los datos histológicos corroboran que la activación microglial en la SNpc depende de la presencia de α -sin, pero no de la muerte celular dopaminérgica, antecediendo a la misma. La inducción temprana de la microglía se asocia con una liberación de iNOS que posiblemente contribuye a la cascada de inicio de la muerte dopaminérgica. En contraste a lo observado en la SNpc, no se observan cambios en la proliferación de la microglía estriatal en el estudio histológico, si bien existe una activación tardía identificada por el PET con [^{18}F]-DPA-714, coincidiendo con la pérdida de TH estriatal y sugiriendo que la microglía estriatal podría ser un fenómeno secundario a la degeneración de las terminales dopaminérgicas.

Por el contrario, los astrocitos en la SNpc parecen reaccionar a la inoculación del vector viral y de α -sin, indicando posiblemente un papel neuroprotector ante el insulto agudo y reactivándose únicamente en los animales parkinsonianos a más largo plazo por la exposición crónica a α -sin y la muerte dopaminérgica. En el estriado, el estrés oxidativo que se produce en la terminal dopaminérgica podría condicionar cambios en el microambiente, desencadenando una activación astrocítica como mecanismo de compensación del fallo dopaminérgico del terminal o contribuyendo a un daño de los mismos por oxidación.

Además, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que investiga la fiabilidad del radiotrazador [^{18}F]-DPA-714 *in vivo* para detectar la activación microglial y correlacionar este hallazgo con la pérdida de células dopaminérgicas incluso en la etapa temprana de la degeneración dopaminérgica, y analizar su especificidad para microglía. En general, nuestros resultados sugieren que el estudio PET *in vivo* con [^{18}F]-DPA-714 es un biomarcador selectivo y confiable de activación microglial y podría usarse para estudiar etapas preclínicas de EP y para monitorizar la progresión de la enfermedad.



CONCLUSIÓN

1.- La inoculación bilateral de AAV- α -sin-A53T en la SNpc provoca una sobreexpresión progresiva de α -sin-A53T temprana en la SNpc y más tardía en el estriado.

2.- La sobreexpresión progresiva de α -sin en la SNpc induce activación y proliferación microglial precediendo a la muerte dopaminérgica, que ocurre una semana después.

3.- La proliferación de células microgliales en la SNpc no conllevó diferencias significativas en los subtipos morfológicos. Esta diferencia respecto a datos en tejido *post mortem* de EP y modelos animales con lesión dopaminérgica extensa sugiere que la diferenciación morfológica de la microglía es un fenómeno tardío en el proceso de muerte dopaminérgica.

4.- La activación de iNOS en el mesencéfalo, que coincide con el inicio de la activación microglial, podría contribuir a la muerte dopaminérgica mediante mecanismos de estrés oxidativo.

5.- La activación microglial en el estriado es un fenómeno tardío y asociado a la pérdida dopaminérgica a este nivel, sugiriendo que no tiene un papel causal relevante.

6.- La reactividad de los astrocitos en la SNpc tiene dos fases. Una primera muy temprana que precede a la expresión significativa de la α -sin y se observa en ambos grupos experimentales, que estaría posiblemente relacionada con la inoculación del vector viral. Esto sugiere un posible papel neuroprotector ante el insulto agudo. La segunda es tardía y coincide con la muerte neuronal establecida, sugiriendo una reactivación por la exposición crónica a α -sin o por la muerte dopaminérgica mantenida.

7.- La activación astrocitaria en el estriado no se asocia con expresión de α -sin, microglía ni muerte neuronal, siendo difícil la interpretación. Temporalmente coincide con cambios funcionales mitocondriales en la terminal dopaminérgica (ya conocidos en el modelo), pudiendo ambos explicarse por estrés oxidativo, entre otras opciones.

8.- El radiotrazador [^{18}F]-DPA-714 es un buen marcador de actividad microglial *in vivo*, que correlaciona con la proliferación de microglía *post mortem*.

9.- No existe correlación entre la captación de [^{18}F]-DPA-714 y el número de astrocitos, sugiriendo especificidad por la microglía.

10.- El [^{18}F]-DPA-714 correlaciona negativamente con la gravedad de la lesión dopaminérgica, a la que precede, demostrando fiabilidad en la detección de los cambios inflamatorios que ocurren en relación con la muerte dopaminérgica desde sus fases más tempranas.



BIBLIOGRAFÍA

- Abourbeh, G., Thézé, B., Maroy, R., Dubois, A., Brulon, V., Fontyn, Y., Dollé, F., Tavitian, B., Boisgard, R., 2012. Imaging microglial/macrophage activation in spinal cords of experimental autoimmune encephalomyelitis rats by positron emission tomography using the mitochondrial 18 kDa translocator protein radioligand [¹⁸F]DPA-714. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5728–5736. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2900-11.2012>
- Akiyama, H., McGeer, P.L., 1989. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res.* 489, 247–253.
- Alam, M.M., Lee, J., Lee, S.-Y., 2017. Recent Progress in the Development of TSPO PET Ligands for Neuroinflammation Imaging in Neurological Diseases. *Nucl. Med. Mol. Imaging* 51, 283–296. <https://doi.org/10.1007/s13139-017-0475-8>
- Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P., Halliwell, B., 1997. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J. Neurochem.* 69, 1196–1203. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69031196.x>
- Albrecht, D.S., Normandin, M.D., Shcherbinin, S., Wooten, D.W., Schwarz, A.J., Zürcher, N.R., Barth, V.N., Guehl, N.J., Akeju, O., Atassi, N., Veronese, M., Turkheimer, F., Hooker, J.M., Loggia, M.L., 2018. Pseudoreference Regions for Glial Imaging with 11C-PBR28: Investigation in 2 Clinical Cohorts. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 59, 107–114. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178335>
- Aliseychik, M.P., Andreeva, T.V., Rogaev, E.I., 2018. Immunogenetic Factors of Neurodegenerative Diseases: The Role of HLA Class II. *Biochem. Biokhimiia* 83, 1104–1116. <https://doi.org/10.1134/S0006297918090122>
- Allen, N.J., 2014. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 439–463. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>
- Allen, N.J., Eroglu, C., 2017. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96, 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
- Allen Reish, H.E., Standaert, D.G., 2015. Role of α -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *J. Park. Dis.* 5, 1–19. <https://doi.org/10.3233/JPD-140491>
- Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., van Horssen, J., de Vries, H.E., Charron, F., Prat, A., 2011. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 334, 1727–1731. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>
- Alvarez, J.I., Katayama, T., Prat, A., 2013. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61, 1939–1958. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>
- Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, A.M., Toyomizu, M., Gautier, C.A., Shen, J., Ohta, S., Hattori, N., 2011. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol. Dis.* 41, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.027>
- Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., 2008. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem. Res.* 33, 2416–2426. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9697-6>
- Argaw, A.T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J.N., Mahase, S., Dutta, D.J., Seto, J., Kramer, E.G., Ferrara, N., Sofroniew, M.V., John, G.R., 2012. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* 122, 2454–2468. <https://doi.org/10.1172/JCI60842>

- Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A., John, G.R., 2009. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1977–1982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808698106>
- Athauda, D., Foltynie, T., 2015. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 25–40. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.226>
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., Boza-Serrano, A., 2018. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 488. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Bachtell, R.K., Jones, J.D., Heinzerling, K.G., Beardsley, P.M., Comer, S.D., 2017. Glial and neuroinflammatory targets for treating substance use disorders. *Drug Alcohol Depend.* 180, 156–170. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.08.003>
- Bae, J.R., Lee, B.D., 2015. Function and dysfunction of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2): Parkinson's disease and beyond. *BMB Rep.* 48, 243–248.
- Barcia, C., Hunot, S., Guillemin, G.J., Pitossi, F., 2011. Inflammation and Parkinson's Disease. *Park. Dis.* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/729054>
- Barcia, C., Sánchez Bahillo, A., Fernández-Villalba, E., Bautista, V., Poza Y Poza, M., Fernández-Barreiro, A., Hirsch, E.C., Herrero, M.-T., 2004. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia* 46, 402–409. <https://doi.org/10.1002/glia.20015>
- Bardehle, S., Krüger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., Dimou, L., Götz, M., 2013. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat. Neurosci.* 16, 580–586. <https://doi.org/10.1038/nn.3371>
- Barkholt, P., Sanchez-Guajardo, V., Kirik, D., Romero-Ramos, M., 2012. Long-term polarization of microglia upon α -synuclein overexpression in nonhuman primates. *Neuroscience* 208, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.004>
- Barone, P., Antonini, A., Colosimo, C., Marconi, R., Morgante, L., Avarello, T.P., Bottacchi, E., Cannas, A., Ceravolo, G., Ceravolo, R., Cicarelli, G., Gaglio, R.M., Giglia, R.M., Iemolo, F., Manfredi, M., Meco, G., Nicoletti, A., Pederzoli, M., Petrone, A., Pisani, A., Pontieri, F.E., Quatrone, R., Ramat, S., Scala, R., Volpe, G., Zappulla, S., Bentivoglio, A.R., Stocchi, F., Trianni, G., Dotto, P.D., PRIAMO study group, 2009. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 24, 1641–1649. <https://doi.org/10.1002/mds.22643>
- Bartels, A.L., Willemsen, A.T.M., Doorduyn, J., de Vries, E.F.J., Dierckx, R.A., Leenders, K.L., 2010. [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat. Disord.* 16, 57–59. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.05.005>
- Bartus, R.T., Baumann, T.L., Brown, L., Kruegel, B.R., Ostrove, J.M., Herzog, C.D., 2013. Advancing neurotrophic factors as treatments for age-related neurodegenerative diseases: developing and demonstrating “clinical proof-of-concept” for AAV-neurturin (CERE-120) in Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 34, 35–61. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.018>
- Baufeld, C., O'Loughlin, E., Calcagno, N., Madore, C., Butovsky, O., 2017. Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1795-7>

- Bayraktar, O.A., Fuentealba, L.C., Alvarez-Buylla, A., Rowitch, D.H., 2015. Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020362. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020362>
- Beal, M.F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 325–334. <https://doi.org/10.1038/35072550>
- Beardsley, P.M., Hauser, K.F., 2014. Glial modulators as potential treatments of psychostimulant abuse. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 69, 1–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420118-7.00001-9>
- Belaidi, A.A., Bush, A.I., 2016. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *J. Neurochem.* 139 Suppl 1, 179–197. <https://doi.org/10.1111/jnc.13425>
- Bellaver, B., Souza, D.G., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2017. Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. *Mol. Neurobiol.* 54, 2969–2985. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9880-8>
- Belloli, S., Pannese, M., Buonsanti, C., Maiorino, C., Di Grigoli, G., Carpinelli, A., Monterisi, C., Moresco, R.M., Panina-Bordignon, P., 2017. Early upregulation of 18-kDa translocator protein in response to acute neurodegenerative damage in TREM2-deficient mice. *Neurobiol. Aging* 53, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.01.010>
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., Escartin, C., 2015a. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Ben Haim, L., Ceyzériat, K., Carrillo-de Sauvage, M.A., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., Vandesquille, M., Aron-Badin, R., Dhenain, M., Déglon, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Bonvento, G., Escartin, C., 2015b. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Béraud, D., Hathaway, H.A., Trecki, J., Chasovskikh, S., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Federoff, H.J., Shimoji, M., Mhyre, T.R., Maguire-Zeiss, K.A., 2013. Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein α -synuclein. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 8, 94–117. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9401-0>
- Bernhardi, R. von, Heredia, F., Salgado, N., Muñoz, P., 2016. Microglia Function in the Normal Brain, in: *Glial Cells in Health and Disease of the CNS, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham, pp. 67–92. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40764-7_4
- Bezard, E., Yue, Z., Kirik, D., Spillantini, M.G., 2013. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 61–70. <https://doi.org/10.1002/mds.25108>
- Bhatia, H.S., Baron, J., Hagl, S., Eckert, G.P., Fiebich, B.L., 2016. Rice bran derivatives alleviate microglia activation: possible involvement of MAPK pathway. *J. Neuroinflammation* 13, 148. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0615-6>
- Bian, M.-J., Li, L.-M., Yu, M., Fei, J., Huang, F., 2009. Elevated interleukin-1beta induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine aggravating dopaminergic neurodegeneration in old male mice. *Brain Res.* 1302, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.030>
- Biber, K., Bhattacharya, A., Campbell, B.M., Piro, J.R., Rohe, M., Staal, R.G.W., Talanian, R.V., Möller, T., 2019. Microglial Drug Targets in AD: Opportunities and Challenges in Drug Discovery and Development. *Front. Pharmacol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00840>

- Bick, R.J., Poindexter, B.J., Kott, M.M., Liang, Y.A., Dinh, K., Kaur, B., Bick, D.L.M., Doursout, M.-F., Schiess, M.C., 2008. Cytokines disrupt intracellular patterns of Parkinson's disease-associated proteins alpha-synuclein, tau and ubiquitin in cultured glial cells. *Brain Res.* 1217, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.081>
- Biosa, A., Sandrelli, F., Beltramini, M., Greggio, E., Bubacco, L., Bisaglia, M., 2017. Recent findings on the physiological function of DJ-1: Beyond Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 108, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.08.005>
- Blesa, J., Przedborski, S., 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00155>
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., Verna, J.M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65, 135–172.
- Boix, J., Padel, T., Paul, G., 2015. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice--characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behav. Brain Res.* 284, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.01.053>
- Booth, H.D.E., Hirst, W.D., Wade-Martins, R., 2017. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 40, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>
- Bosco, D.A., Fowler, D.M., Zhang, Q., Nieva, J., Powers, E.T., Wentworth, P., Lerner, R.A., Kelly, J.W., 2006. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat. Chem. Biol.* 2, 249–253. <https://doi.org/10.1038/nchembio782>
- Bouhouche, A., Tibar, H., Ben El Haj, R., El Bayad, K., Razine, R., Tazrout, S., Skalli, A., Bouslam, N., Elouardi, L., Benomar, A., Yahyaoui, M., Regragui, W., 2017. LRRK2 G2019S Mutation: Prevalence and Clinical Features in Moroccans with Parkinson's Disease. *Park. Dis.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2412486>
- Bourdenx, M., Dovero, S., Engeln, M., Bido, S., Bastide, M.F., Dutheil, N., Vollenweider, I., Baud, L., Piron, C., Grouthier, V., Boraud, T., Porras, G., Li, Q., Baekelandt, V., Scheller, D., Michel, A., Fernagut, P.-O., Georges, F., Courtine, G., Bezard, E., Dehay, B., 2015. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 46. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0222-2>
- Bourdenx, M., Dutheil, N., Bezard, E., Dehay, B., 2014. Systemic gene delivery to the central nervous system using Adeno-associated virus. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 50. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00050>
- Boutin, H., Chauveau, F., Thominiaux, C., Grégoire, M.-C., James, M.L., Trebossen, R., Hantraye, P., Dollé, F., Tavitian, B., Kassiou, M., 2007. 11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 48, 573–581.
- Boutin, H., Prenant, C., Maroy, R., Galea, J., Greenhalgh, A.D., Smigova, A., Cawthorne, C., Julyan, P., Wilkinson, S.M., Banister, S.D., Brown, G., Herholz, K., Kassiou, M., Rothwell, N.J., 2013. [18F]DPA-714: direct comparison with [11C]PK11195 in a model of cerebral ischemia in rats. *PLoS One* 8, e56441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056441>
- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., Del Tredici, K., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>

- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., Sastre, M., Del Tredici, K., 2007. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 231–241. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0244-3>
- Braidy, N., Gai, W.-P., Xu, Y.H., Sachdev, P., Guillemin, G.J., Jiang, X.-M., Ballard, J.W.O., Horan, M.P., Fang, Z.M., Chong, B.H., Chan, D.Y., 2013. Uptake and mitochondrial dysfunction of alpha-synuclein in human astrocytes, cortical neurons and fibroblasts. *Transl. Neurodegener.* 2, 20. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-2-20>
- Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V.I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S.R., Bethea, J.R., 2009. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 2628–2640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802954>
- Brodacki, B., Staszewski, J., Toczyłowska, B., Kozłowska, E., Drela, N., Chalimoniuk, M., Stępien, A., 2008. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 441, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.040>
- Broussolle, E., Krack, P., Thobois, S., Xie-Brustolin, J., Pollak, P., Goetz, C.G., 2007. Contribution of Jules Froment to the study of parkinsonian rigidity. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 22, 909–914. <https://doi.org/10.1002/mds.21484>
- Brück, D., Wenning, G.K., Stefanova, N., Fellner, L., 2016. Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction. *Neurobiol. Dis.* 85, 262–274. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.003>
- Buhlman, L.M., 2017. Parkin loss-of-function pathology: Premature neuronal senescence induced by high levels of reactive oxygen species? *Mech. Ageing Dev.* 161, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.06.008>
- Burda, J.E., Sofroniew, M.V., 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81, 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Burke, R.E., O'Malley, K., 2013. Axon Degeneration in Parkinson's Disease. *Exp. Neurol.* 246, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.011>
- Cabezas, R., Ávila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R.S., Báez, E., García-Segura, L.M., Jurado Coronel, J.C., Capani, F., Cardona-Gomez, G.P., Barreto, G.E., 2014. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00211>
- Cai, J., Chen, Y., Cai, W.-H., Hurlock, E.C., Wu, H., Kernie, S.G., Parada, L.F., Lu, Q.R., 2007. A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Dev. Camb. Engl.* 134, 1887–1899. <https://doi.org/10.1242/dev.02847>
- Cajal, R., 1897. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. Oxford University Press., Oxford
- Carson, M.J., Bilousova, T.V., Puntambekar, S.S., Melchior, B., Doose, J.M., Ethell, I.M., 2007. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 4, 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.07.002>

- Carta, A.R., Mulas, G., Bortolanza, M., Duarte, T., Pillai, E., Fisone, G., Vozari, R.R., Del-Bel, E., 2017. l-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? *Eur. J. Neurosci.* 45, 73–91. <https://doi.org/10.1111/ejn.13482>
- Castro-Sánchez, S., García-Yagüe, Á.J., López-Royo, T., Casarejos, M., Lanciego, J.L., Lastres-Becker, I., 2018. Cx3cr1-deficiency exacerbates alpha-synuclein-A53T induced neuroinflammation and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Glia* 66, 1752–1762. <https://doi.org/10.1002/glia.23338>
- Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R., van Loo, G., 2014. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 35, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.005>
- Cekanaviciute, E., Dietrich, H.K., Axtell, R.C., Williams, A.M., Egusquiza, R., Wai, K.M., Koshy, A.A., Buckwalter, M.S., 2014. Astrocytic TGF- β signaling limits inflammation and reduces neuronal damage during central nervous system Toxoplasma infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 139–149. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303284>
- Chahine, L.M., Xie, S.X., Simuni, T., Tran, B., Postuma, R., Amara, A., Oertel, W.H., Iranzo, A., Scordia, C., Fullard, M., Linder, C., Purri, R., Darin, A., Rennert, L., Videnovic, A., Del Riva, P., Weintraub, D., 2016. Longitudinal changes in cognition in early Parkinson's disease patients with REM sleep behavior disorder. *Parkinsonism Relat. Disord.* 27, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.03.006>
- Chan, C.S., Gertler, T.S., Surmeier, D.J., 2010. A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 25 Suppl 1, S63-70. <https://doi.org/10.1002/mds.22801>
- Charron, G., Doudnikoff, E., Canron, M.-H., Li, Q., Véga, C., Marais, S., Baufreton, J., Vital, A., Oliet, S.H.R., Bezard, E., 2014. Astrocytosis in parkinsonism: considering tripartite striatal synapses in physiopathology? *Front. Aging Neurosci.* 6, 258. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00258>
- Chaudhuri, A., 2013. Multiple sclerosis is primarily a neurodegenerative disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 120, 1463–1466. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1080-3>
- Chauveau, F., Boutin, H., Van Camp, N., Dollé, F., Tavitian, B., 2008. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [¹¹C]PK11195 challengers. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 2304–2319. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0908-9>
- Chauveau, F., Van Camp, N., Dollé, F., Kuhnast, B., Hinnen, F., Damont, A., Boutin, H., James, M., Kassiou, M., Tavitian, B., 2009. Comparative evaluation of the translocator protein radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 50, 468–476. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.058669>
- Chen, L.-W., Chan, K.-L.Y. and Y.-S., 2005. Reactive Astrocytes as Potential Manipulation Targets in Novel Cell Replacement Therapy of Parkinsons Disease [WWW Document]. *Curr. Drug Targets.* URL <http://www.eurekaselect.com/60872/article> (accessed 10.9.19).
- Chen, M.-K., Guilarte, T.R., 2008. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol. Ther.* 118, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.12.004>
- Chen, W.-W., Zhang, X., Huang, W.-J., 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol. Med. Rep.* 13, 3391–3396. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948>
- Chen, X., Hu, Y., Cao, Z., Liu, Q., Cheng, Y., 2018. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02122>

- Choi, D.-J., Eun, J.-H., Kim, B.G., Jou, I., Park, S.M., Joe, E.-H., 2018. A Parkinson's disease gene, DJ-1, repairs brain injury through Sox9 stabilization and astrogliosis. *Glia* 66, 445–458. <https://doi.org/10.1002/glia.23258>
- Choi, I., Kim, J., Jeong, H.-K., Kim, B., Jou, I., Park, S.M., Chen, L., Kang, U.-J., Zhuang, X., Joe, E.-H., 2013. PINK1 deficiency attenuates astrocyte proliferation through mitochondrial dysfunction, reduced AKT and increased p38 MAPK activation, and downregulation of EGFR. *Glia* 61, 800–812. <https://doi.org/10.1002/glia.22475>
- Choi, Y.R., Kang, S.-J., Kim, J.-M., Lee, S.-J., Jou, I., Joe, E.-H., Park, S.M., 2015. FcyRIIB mediates the inhibitory effect of aggregated α -synuclein on microglial phagocytosis. *Neurobiol. Dis.* 83, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.025>
- Chung, C.Y., Koprach, J.B., Siddiqi, H., Isacson, O., 2009. Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3365–3373. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5427-08.2009>
- Chung, W.-S., Allen, N.J., Eroglu, C., 2015. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020370. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370>
- Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S.J., Barres, B.A., 2013. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Chung, Young C., Kim, S.R., Jin, B.K., 2010. Paroxetine prevents loss of nigrostriatal dopaminergic neurons by inhibiting brain inflammation and oxidative stress in an experimental model of Parkinson's disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 1230–1237. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000208>
- Chung, Young Cheul, Ko, H.W., Bok, E., Park, E.S., Huh, S.H., Nam, J.H., Jin, B.K., 2010. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep.* 43, 225–232.
- Cicchetti, F., Brownell, A.L., Williams, K., Chen, Y.I., Livni, E., Isacson, O., 2002. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur. J. Neurosci.* 15, 991–998.
- Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J.-L., Cottier, J.-P., Roussel, C., Kassiou, M., Guilloteau, D., Ribeiro, M.-J., 2012. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One* 7, e52941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052941>
- Costello, D.A., Lyons, A., Denieffe, S., Browne, T.C., Cox, F.F., Lynch, M.A., 2011. Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice: a role for Toll-like receptor activation. *J. Biol. Chem.* 286, 34722–34732. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280826>
- Couch, Y., Alvarez-Erviti, L., Sibson, N.R., Wood, M.J.A., Anthony, D.C., 2011. The acute inflammatory response to intranigral α -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J. Neuroinflammation* 8, 166.
- Crabbé, M., Van der Perren, A., Bollaerts, I., Kounelis, S., Baekelandt, V., Bormans, G., Casteels, C., Moons, L., Van Laere, K., 2019a. Increased P2X7 Receptor Binding Is Associated With Neuroinflammation in Acute but Not Chronic Rodent Models for Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.* 13, 799. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00799>

- Crabbé, M., Van der Perren, A., Kounelis, S., Lavreys, T., Bormans, G., Baekelandt, V., Casteels, C., Van Laere, K., 2019b. Temporal changes in neuroinflammation and brain glucose metabolism in a rat model of viral vector-induced α -synucleinopathy. *Exp. Neurol.* 320, 112964. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112964>
- Crespo-Burillo, J.A., Alarcia-Alejos, R., 2015. [Management of autonomic dysfunction in Parkinson's disease]. *Rev. Neurol.* 60, 355–364.
- Croisier, E., Moran, L.B., Dexter, D.T., Pearce, R.K.B., Graeber, M.B., 2005. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J. Neuroinflammation* 2, 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-14>
- Członkowska, A., Kohutnicka, M., Kurkowska-Jastrzebska, I., Członkowski, A., 1996. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 5, 137–143.
- Daher, J.P.L., Abdelmotilib, H.A., Hu, X., Volpicelli-Daley, L.A., Moehle, M.S., Fraser, K.B., Needle, E., Chen, Y., Steyn, S.J., Galatsis, P., Hirst, W.D., West, A.B., 2015. Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates α -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 290, 19433–19444. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660001>
- Daher, J.P.L., Volpicelli-Daley, L.A., Blackburn, J.P., Moehle, M.S., West, A.B., 2014. Abrogation of α -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9289–9294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403215111>
- Dallasta, L.M., Pisarov, L.A., Esplen, J.E., Werley, J.V., Moses, A.V., Nelson, J.A., Achim, C.L., 1999. Blood-Brain Barrier Tight Junction Disruption in Human Immunodeficiency Virus-1 Encephalitis. *Am. J. Pathol.* 155, 1915–1927. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65511-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65511-3)
- Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., Javoy-Agid, F., 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52, 1–6.
- Damont, A., Hinnen, F., Kuhnast, B., Schöllhorn-Peyronneau, M.-A., James, M., Luus, C., Tavitian, B., Kassiou, M., Dollé, F., 2008. Radiosynthesis of [^{18}F]DPA-714, a selective radioligand for imaging the translocator protein (18 kDa) with PET. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 51, 286–292. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1523>
- Damont, A., Roeda, D., Dollé, F., 2013. The potential of carbon-11 and fluorine-18 chemistry: illustration through the development of positron emission tomography radioligands targeting the translocator protein 18 kDa. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 56, 96–104. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2992>
- Daneman, R., Prat, A., 2015. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Daniel, G., Musso, A., Tsika, E., Fiser, A., Glauser, L., Pletnikova, O., Schneider, B.L., Moore, D.J., 2015. α -Synuclein-induced dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease occurs independent of ATP13A2 (PARK9). *Neurobiol. Dis.* 73, 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.007>
- de Haas, A.H., Boddeke, H.W.G.M., Biber, K., 2008. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56, 888–894. <https://doi.org/10.1002/glia.20663>
- Del Abril Alonso, Á., Higuera Matas, A., Caminero Gómez, Á.A., García Lecumberri, C., Ambrosio Flores, E., De Pablo González, J.M., De Blas Calleja, M.R., 2016. *Fundamentos De Psicobiología*, 1ª. ed.

- Del Rio-Hortega, P., 1937. Microglia, in: Penfield, W., editor. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. New York, P.B. Hoeber, p. 481-534.
- Delgado-Alvarado, M., Gago, B., Gorostidi, A., Jiménez-Urbieta, H., Dacosta-Aguayo, R., Navalpotro-Gómez, I., Ruiz-Martínez, J., Bergareche, A., Martí-Massó, J.F., Martínez-Lage, P., Izagirre, A., Rodríguez-Oroz, M.C., 2017. Tau/ α -synuclein ratio and inflammatory proteins in Parkinson's disease: An exploratory study. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 1066–1073. <https://doi.org/10.1002/mds.27001>
- Delgado-Alvarado, M., Gago, B., Navalpotro-Gomez, I., Jiménez-Urbieta, H., Rodriguez-Oroz, M.C., 2016. Biomarkers for dementia and mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 31, 861–881. <https://doi.org/10.1002/mds.26662>
- DeMaagd, G., Philip, A., 2015. Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 40, 504–532.
- Dentesano, G., Serratos, J., Tusell, J.M., Ramón, P., Valente, T., Saura, J., Solà, C., 2014. CD200R1 and CD200 expression are regulated by PPAR- γ in activated glial cells. *Glia* 62, 982–998. <https://doi.org/10.1002/glia.22656>
- Depino, A.M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., del Rey, A., Pitossi, F.J., Oertel, W.H., 2003. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2731–2742. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2003.03014.x>
- Derkinderen, P., Shannon, K.M., Brundin, P., 2014. Gut feelings about smoking and coffee in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 29, 976–979. <https://doi.org/10.1002/mds.25882>
- Desai, V.G., Feuers, R.J., Hart, R.W., Ali, S.F., 1996. MPP(+)-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport. *Brain Res.* 715, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01255-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01255-9)
- Dieters, O., 1865. *Untersuchungen euber Gehirn und Reuckenmark (Investigations on brain and spinal cord)*. Vieweg
- Diniz, L.P., Matias, I., Araujo, A.P.B., Garcia, M.N., Barros-Aragão, F.G.Q., Alves-Leon, S.V., de Souza, J.M., Foguel, D., Figueiredo, C.P., Braga, C., Romão, L., Gomes, F.C.A., 2019. α -synuclein oligomers enhance astrocyte-induced synapse formation through TGF- β 1 signaling in a Parkinson's disease model. *J. Neurochem.* 150, 138–157. <https://doi.org/10.1111/jnc.14710>
- Doorn, K.J., Moors, T., Drukarch, B., van de Berg, W.D., Lucassen, P.J., van Dam, A.-M., 2014. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 90. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0090-1>
- Dresselhaus, E.C., Meffert, M.K., 2019. Cellular Specificity of NF- κ B Function in the Nervous System. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>
- Drøjdahl, N., Nielsen, H.H., Gardi, J.E., Wree, A., Peterson, A.C., Nyengaard, J.R., Eyer, J., Finsen, B., 2010. Axonal plasticity elicits long-term changes in oligodendroglia and myelinated fibers. *Glia* 58, 29–42. <https://doi.org/10.1002/glia.20897>
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., Zhang, H.-L., 2016. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0245-0>

- Dufek, M., Rektorova, I., Thon, V., Lokaj, J., Rektor, I., 2015. Interleukin-6 May Contribute to Mortality in Parkinson's Disease Patients: A 4-Year Prospective Study. *Park. Dis.* 2015, 898192. <https://doi.org/10.1155/2015/898192>
- Duffy, M.F., Collier, T.J., Patterson, J.R., Kemp, C.J., Luk, K.C., Tansey, M.G., Paumier, K.L., Kanaan, N.M., Fischer, D.L., Polinski, N.K., Barth, O.L., Howe, J.W., Vaikath, N.N., Majbour, N.K., El-Agnaf, O.M.A., Sortwell, C.E., 2018. Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. *J. Neuroinflammation* 15, 129. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1171-z>
- E. Hirbec, H., Noristani, H.N., Perrin, F.E., 2017. Microglia Responses in Acute and Chronic Neurological Diseases: What Microglia-Specific Transcriptomic Studies Taught (and did Not Teach) Us. *Front. Aging Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00227>
- Edison, P., Ahmed, I., Fan, Z., Hinz, R., Gelosa, G., Ray Chaudhuri, K., Walker, Z., Turkheimer, F.E., Brooks, D.J., 2013. Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 938–949. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.255>
- Emmer, K.L., Covy, J.P., Giasson, B.I., 2012. Studies of protein aggregation in A53T α -synuclein transgenic, Tg2576 transgenic, and P246L presenilin-1 knock-in cross bred mice. *Neurosci. Lett.* 507, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.12.005>
- Erustes, A.G., Stefani, F.Y., Terashima, J.Y., Stilhano, R.S., Monteforte, P.T., da Silva Pereira, G.J., Han, S.W., Calgarotto, A.K., Hsu, Y.-T., Ureshino, R.P., Bincoletto, C., Smaili, S.S., 2018. Overexpression of α -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 96, 160–171. <https://doi.org/10.1002/jnr.24092>
- Esposito, E., Impellizzeri, D., Mazzon, E., Paterniti, I., Cuzzocrea, S., 2012. Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One* 7, e41880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041880>
- Esteves, A.R., Swerdlow, R.H., Cardoso, S.M., 2014. LRRK2, a puzzling protein: insights into Parkinson's disease pathogenesis. *Exp. Neurol.* 261, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.025>
- Fan, Z., Brooks, D.J., Okello, A., Edison, P., 2017. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. *Brain J. Neurol.* 140, 792–803. <https://doi.org/10.1093/brain/aww349>
- Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G.K., Stefanova, N., 2013. Toll-like receptor 4 is required for α -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* 61, 349–360. <https://doi.org/10.1002/glia.22437>
- Feng, Y., Zheng, C., Zhang, Y., Xing, C., Cai, W., Li, R., Chen, J., Duan, Y., 2019. Triptolide Inhibits Prefomed Fibril-Induced Microglial Activation by Targeting the MicroRNA155-5p/SHIP1 Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 6527638. <https://doi.org/10.1155/2019/6527638>
- Ferreira, S.A., Romero-Ramos, M., 2018. Microglia Response During Parkinson's Disease: Alpha-Synuclein Intervention. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 247. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00247>
- Ferrer, I., 2017. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 27, 645–674. <https://doi.org/10.1111/bpa.12538>
- Fields, R.D., Araque, A., Johansen-Berg, H., Lim, S.-S., Lynch, G., Nave, K.-A., Nedergaard, M., Perez, R., Sejnowski, T., Wake, H., 2014. Glial Biology in Learning and Cognition. *The Neuroscientist* 20, 426–431. <https://doi.org/10.1177/1073858413504465>

- Finehout, E.J., Franck, Z., Lee, K.H., 2005. Complement protein isoforms in CSF as possible biomarkers for neurodegenerative disease. *Dis. Markers* 21, 93–101.
- Flores-Martinez, Y.M., Fernandez-Parrilla, M.A., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., Blanco-Alvarez, V.M., Soto-Rojas, L.O., Luna-Herrera, C., Gonzalez-Barrios, J.A., Leon-Chavez, B.A., Gutierrez-Castillo, M.E., Martínez-Dávila, I.A., Martínez-Fong, D., 2018. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. *J. Immunol. Res.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1838921>
- Foote, P.K., Statsyuk, A.V., 2018. Monitoring PARKIN RBR Ubiquitin Ligase Activation States with UbFluor. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* e45. <https://doi.org/10.1002/cpch.45>
- Frei, K., Truong, D.D., 2017. Hallucinations and the spectrum of psychosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 374, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.01.014>
- Fricke, I.B., Viel, T., Worlitzer, M.M., Collmann, F.M., Vrachimis, A., Faust, A., Wachsmuth, L., Faber, C., Dollé, F., Kuhlmann, M.T., Schäfers, K., Hermann, S., Schwamborn, J.C., Jacobs, A.H., 2016. 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease-like degeneration generates acute microgliosis and astrogliosis in the nigrostriatal system but no bioluminescence imaging-detectable alteration in adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 43, 1352–1365. <https://doi.org/10.1111/ejn.13232>
- Fricke, M., Tolkovsky, A.M., Borutaite, V., Coleman, M., Brown, G.C., 2018. Neuronal Cell Death. *Physiol. Rev.* 98, 813–880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
- Frumberg, D.B., Fernando, M.S., Lee, D.E., Biegon, A., Schiffer, W.K., 2007. Metabolic and behavioral deficits following a routine surgical procedure in rats. *Brain Res.* 1144, 209–218.
- Fujita, A., Yamaguchi, H., Yamasaki, R., Cui, Y., Matsuoka, Y., Yamada, K.-I., Kira, J.-I., 2018. Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model. *J. Neuroinflammation* 15, 227. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1251-0>
- Galea, I., Bechmann, I., Perry, V.H., 2007. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.004>
- Galvin, J.E., 2006. Interaction of alpha-synuclein and dopamine metabolites in the pathogenesis of Parkinson's disease: a case for the selective vulnerability of the substantia nigra. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 115–126. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0096-2>
- Gao, Q., Li, Y., Chopp, M., 2005. Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience* 136, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.091>
- Gao, Y., Xu, X., Chang, S., Wang, Y., Xu, Y., Ran, S., Huang, Z., Li, P., Li, J., Zhang, L., Saavedra, J.M., Liao, H., Pang, T., 2015. Totarol prevents neuronal injury in vitro and ameliorates brain ischemic stroke: Potential roles of Akt activation and HO-1 induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.10.001>
- García-Marín, V., García-López, P., Freire, M., 2007. Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci.* 30, 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.008>
- García-Revilla, J., Alonso-Bellido, I.M., Burguillos, M.A., Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., Ruiz, R., Cruz-Hernández, L., García-Domínguez, I., Roca-Ceballos, M.A., Santiago, M., Rodríguez-Gómez, J.A., Soto, M.S., Venero, J.L., de Pablos, R.M., 2019. Reformulating Pro-Oxidant Microglia in Neurodegeneration. *J. Clin. Med.* 8. <https://doi.org/10.3390/jcm8101719>

- Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B.E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J.R., Rioux, J.D., Daly, M.J., Xavier, R.J., Podolsky, D.K., 2010. LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 5577–5585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000548>
- Gargiulo, S., Coda, A.R., Panico, M., Gramanzini, M., Moresco, R.M., Chalon, S., Pappatà, S., 2017. Molecular imaging of neuroinflammation in preclinical rodent models using positron emission tomography. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Of* 61, 60–75. <https://doi.org/10.23736/S1824-4785.16.02948-4>
- Gerhard, A., 2016. TSPO imaging in parkinsonian disorders. *Clin. Transl. Imaging* 4, 183–190. <https://doi.org/10.1007/s40336-016-0171-1>
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B., Brooks, D.J., 2006. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 21, 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.08.002>
- Ghosh, A., Kanthasamy, A., Joseph, J., Anantharam, V., Srivastava, P., Dranka, B.P., Kalyanaraman, B., Kanthasamy, A.G., 2012. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of an orally active apocynin derivative in pre-clinical models of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 9, 241. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-241>
- Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2002. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1264–1275. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00804-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00804-3)
- Gillardot, F., Schmid, R., Draheim, H., 2012. Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity. *Neuroscience* 208, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.02.001>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., Prinz, M., 2015. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>
- Glinka, Y., Gassen, M., Youdim, M.B., 1997. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J. Neural Transm. Suppl.* 50, 55–66.
- Goes, A.T.R., Souza, L.C., Filho, C.B., Del Fabbro, L., De Gomes, M.G., Boeira, S.P., Jesse, C.R., 2014. Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 256, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.042>
- Goldknopf, I.L., Sheta, E.A., Bryson, J., Folsom, B., Wilson, C., Duty, J., Yen, A.A., Appel, S.H., 2006. Complement C3c and related protein biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1034–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.051>
- Goldman, J.G., Postuma, R., 2014. Premotor and non-motor features of Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 27, 434–441. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000112>

- Goldmann, T., Prinz, M., 2013. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 208093. <https://doi.org/10.1155/2013/208093>
- Golgi, C., 1871. Contribuzione alla fi na Anatomia degli organi centrali del sistema nervosos. *Rivista clinica di Bologna*, Bologna
- Golla, S.S.V., Boellaard, R., Oikonen, V., Hoffmann, A., van Berckel, B.N.M., Windhorst, A.D., Virta, J., Haaparanta-Solin, M., Luoto, P., Savisto, N., Solin, O., Valencia, R., Thiele, A., Eriksson, J., Schuit, R.C., Lammertsma, A.A., Rinne, J.O., 2015. Quantification of [18F]DPA-714 binding in the human brain: initial studies in healthy controls and Alzheimer's disease patients. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 766–772. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.261>
- Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C., Mariash, A., Cheung, B., Soto, O., Schrupp, S., Sondel, J., Kotilinek, L., Day, J., Schwarzschild, M.A., Cha, J.-H.J., Newell, K., Miller, D.W., Uéda, K., Young, A.B., Hyman, B.T., Ashe, K.H., 2003. Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 24, 245–258. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00091-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00091-x)
- Gomide, V., Bibancos, T., Chadi, G., 2005. Dopamine cell morphology and glial cell hypertrophy and process branching in the nigrostriatal system after striatal 6-OHDA analyzed by specific sterological tools. *Int. J. Neurosci.* 115, 557–582. <https://doi.org/10.1080/00207450590521118>
- Gorshkov, K., Aguisanda, F., Thorne, N., Zheng, W., 2018. Astrocytes as targets for drug discovery. *Drug Discov. Today* 23, 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.011>
- Green, H.F., Khosousi, S., Svenningsson, P., 2019. Plasma IL-6 and IL-17A Correlate with Severity of Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *J. Park. Dis.* <https://doi.org/10.3233/JPD-191699>
- Greenamyre, J.T., Cannon, J.R., Drolet, R., Mastroberardino, P.-G., 2010. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 141–142; author reply 142–143. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.006>
- Gressens, P., Richelme, C., Kadhim, H.J., Gadisseux, J.F., Evrard, P., 1992. The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain. *Biol. Neonate* 61, 4–24. <https://doi.org/10.1159/000243526>
- Greter, M., Merad, M., 2013. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* 61, 121–127. <https://doi.org/10.1002/glia.22408>
- Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S.H., Hyman, B.T., Tanzi, R.E., 2013. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78, 631–643. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.014>
- Gu, X.-L., Long, C.-X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., Cai, H., 2010. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α -synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol. Brain* 3, 12. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-12>
- Gui, Y., Liu, H., Zhang, L., Lv, W., Hu, X., 2015. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget* 6, 37043–37053.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., Matías-Guiu, J., 2015. Astrocytes en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología* 30, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Gundersen, H.J., Jensen, E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* 147, 229–263.

- Gupta, A., Kumar, A., Kulkarni, S.K., 2011. Targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammatory signaling by selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors mitigates MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.017>
- Gupta, S.P., Yadav, S., Singhal, N.K., Tiwari, M.N., Mishra, S.K., Singh, M.P., 2014. Does restraining nitric oxide biosynthesis rescue from toxins-induced parkinsonism and sporadic Parkinson's disease? *Mol. Neurobiol.* 49, 262–275. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8517-4>
- Haddadi, R., Nayebi, A.M., Farajniya, S., Brooshghalan, S.E., Sharifi, H., 2014. Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemi-parkinsonian rats: behavioral and molecular study. *Daru J. Fac. Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.* 22, 38. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-38>
- Halliday, G.M., Stevens, C.H., 2011. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 6–17. <https://doi.org/10.1002/mds.23455>
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R.A., de Souza, L.C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M.C., Bottlaender, M., Sarazin, M., Clinical IMABio3 team, 2016. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain J. Neurol.* 139, 1252–1264. <https://doi.org/10.1093/brain/aww017>
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Potier, M.C., Corlier, F., Kuhnast, B., Caillé, F., Dubois, B., Fillon, L., Chupin, M., Bottlaender, M., Sarazin, M., 2018. Distinct dynamic profiles of microglial activation are associated with progression of Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 141, 1855–1870. <https://doi.org/10.1093/brain/awy079>
- Hanisch, U.-K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155. <https://doi.org/10.1002/glia.10161>
- Harms, A.S., Cao, S., Rowse, A.L., Thome, A.D., Li, X., Mangieri, L.R., Cron, R.Q., Shacka, J.J., Raman, C., Standaert, D.G., 2013. MHCII is required for α -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 9592–9600. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5610-12.2013>
- Hayakawa, K., Pham, L.-D.D., Arai, K., Lo, E.H., 2014. Reactive astrocytes promote adhesive interactions between brain endothelium and endothelial progenitor cells via HMGB1 and beta-2 integrin signaling. *Stem Cell Res.* 12, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.12.008>
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Latz, E., 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Henrich, M.T., Geibl, F.F., Lee, B., Chiu, W.-H., Koprach, J.B., Brotchie, J.M., Timmermann, L., Decher, N., Matschke, L.A., Oertel, W.H., 2018. A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 39. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0541-1>
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B., 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372. <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
- Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6)
- Hishikawa, N., Hashizume, Y., Yoshida, M., Sobue, G., 2001. Widespread occurrence of argyrophilic glial inclusions in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 362–372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2001.00345.x>

- Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., Barclay, A.N., Sedgwick, J.D., 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290, 1768–1771.
- Holzer, G., Hornykiewicz, O., 1959. [On dopamine (hydroxytyramine) metabolism in the rat brain]. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 237, 27–33.
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Stevens, B., 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>
- Hoshi, A., Tsunoda, A., Tada, M., Nishizawa, M., Ugawa, Y., Kakita, A., 2017. Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 4 in the Temporal Neocortex of Patients with Parkinson's Disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 27, 160–168. <https://doi.org/10.1111/bpa.12369>
- Hsieh, J., Aimone, J.B., Kaspar, B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H., 2004. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 164, 111–122. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308101>
- Hu, X., Ivashkiv, L.B., 2009. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* 31, 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.002>
- Huang, C.-L., Chao, C.-C., Lee, Y.-C., Lu, M.-K., Cheng, J.-J., Yang, Y.-C., Wang, V.-C., Chang, W.-C., Huang, N.-K., 2016. Paraquat Induces Cell Death Through Impairing Mitochondrial Membrane Permeability. *Mol. Neurobiol.* 53, 2169–2188. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9198-y>
- Hurley, S.D., O'Banion, M.K., Song, D.D., Arana, F.S., Olschowka, J.A., Haber, S.N., 2003. Microglial response is poorly correlated with neurodegeneration following chronic, low-dose MPTP administration in monkeys. *Exp. Neurol.* 184, 659–668. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00273-5)
- Hutchison, W.D., Lozano, A.M., Davis, K.D., Saint-Cyr, J.A., Lang, A.E., Dostrovsky, J.O., 1994. Differential neuronal activity in segments of globus pallidus in Parkinson's disease patients. *Neuroreport* 5, 1533–1537. <https://doi.org/10.1097/00001756-199407000-00031>
- Iannaccone, S., Cerami, C., Alessio, M., Garibotto, V., Panzacchi, A., Olivieri, S., Gelsomino, G., Moresco, R.M., Perani, D., 2013. In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.07.002>
- Ichise, M., Liow, J.-S., Lu, J.-Q., Takano, A., Model, K., Toyama, H., Suhara, T., Suzuki, K., Innis, R.B., Carson, R.E., 2003. Linearized reference tissue parametric imaging methods: application to [¹¹C]DASB positron emission tomography studies of the serotonin transporter in human brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 1096–1112. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000085441.37552.CA>
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., Hashizume, Y., 2003. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 106, 518–526. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0766-2>
- Irizarry, M.C., Growdon, W., Gomez-Isla, T., Newell, K., George, J.M., Clayton, D.F., Hyman, B.T., 1998. Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical

- Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 334–337.
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., Przedborski, S., 1995. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 4, 257–269.
- Jacobson, J., Duchen, M.R., 2002. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J. Cell Sci.* 115, 1175–1188.
- James, M.L., Fulton, R.R., Vercoullie, J., Henderson, D.J., Garreau, L., Chalon, S., Dolle, F., Costa, B., Selleri, S., Guilloteau, D., Kassiou, M., 2008. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 49, 814–822. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.046151>
- Jansen, A.H.P., Reits, E.A.J., Hol, E.M., 2014. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 73. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00073>
- Jha, M.K., Kim, J.-H., Song, G.J., Lee, W.-H., Lee, I.-K., Lee, H.-W., An, S.S.A., Kim, S., Suk, K., 2018. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. *Prog. Neurobiol.* 162, 37–69. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.12.003>
- Ji, B., Maeda, J., Sawada, M., Ono, M., Okauchi, T., Inaji, M., Zhang, M.-R., Suzuki, K., Ando, K., Staufenbiel, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., Higuchi, M., Suhara, T., 2008. Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's and other CNS pathologies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 12255–12267. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2312-08.2008>
- Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L.P., Tsirka, S.E., 2013. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One* 8, e56293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056293>
- Jiang, Q.-W., Wang, C., Zhou, Y., Hou, M.-M., Wang, X., Tang, H.-D., Wu, Y.-W., Ma, J.-F., Chen, S.-D., 2015. Plasma epidermal growth factor decreased in the early stage of Parkinson's disease. *Aging Dis.* 6, 168–173. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0925>
- Jiang, X., Ganesan, P., Rengarajan, T., Choi, D.-K., Arulselvan, P., 2018. Cellular phenotypes as inflammatory mediators in Parkinson's disease: Interventional targets and role of natural products. *Biomed. Pharmacother. Biomedicine Pharmacother.* 106, 1052–1062. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.162>
- Jin, X., Yamashita, T., 2016. Microglia in central nervous system repair after injury. *J. Biochem. (Tokyo)* 159, 491–496. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw009>
- Joe, E.-H., Choi, D.-J., An, J., Eun, J.-H., Jou, I., Park, S., 2018. Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Exp. Neurobiol.* 27, 77–87. <https://doi.org/10.5607/en.2018.27.2.77>
- Joers, V., Tansey, M.G., Mulas, G., Carta, A.R., 2017. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog. Neurobiol.* 155, 57–75. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.006>
- Johnson, M.E., Bobrovskaya, L., 2015. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology* 46, 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002>

- Jucker, M., Walker, L.C., 2018. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 21, 1341–1349. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0238-6>
- Jyothi, H.J., Vidyadhara, D.J., Mahadevan, A., Philip, M., Parmar, S.K., Manohari, S.G., Shankar, S.K., Raju, T.R., Alladi, P.A., 2015. Aging causes morphological alterations in astrocytes and microglia in human substantia nigra pars compacta. *Neurobiol. Aging* 36, 3321–3333. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.024>
- Kabba, J.A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J.M., Pang, T., 2018. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 53–71. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0504-2>
- Kalia, L.V., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 386, 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Fidani, L., 2016. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol. Scand.* 134, 314–326. <https://doi.org/10.1111/ane.12563>
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., Hol, E.M., 2012. Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 60, 615–629. <https://doi.org/10.1002/glia.22295>
- Kaplitt, M.G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H.L., Mattis, P., Lawlor, P.A., Bland, R.J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., During, M.J., 2007. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet Lond. Engl.* 369, 2097–2105. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60982-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60982-9)
- Kasten, M., Hartmann, C., Hampf, J., Schaake, S., Westenberger, A., Vollstedt, E.-J., Balck, A., Domingo, A., Vulinovic, F., Dulovic, M., Zorn, I., Madoev, H., Zehnle, H., Lembeck, C.M., Schawe, L., Reginold, J., Huang, J., König, I.R., Bertram, L., Marras, C., Lohmann, K., Lill, C.M., Klein, C., 2018. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 33, 730–741. <https://doi.org/10.1002/mds.27352>
- Kawachi, I., Lassmann, H., 2017. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 137–145. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-313300>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Verkhratsky, A., 2008. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* 31, 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003>
- Kim, B., Yang, M.-S., Choi, D., Kim, J.-H., Kim, H.-S., Seol, W., Choi, S., Jou, I., Kim, E.-Y., Joe, E.-H., 2012. Impaired inflammatory responses in murine Lrrk2-knockdown brain microglia. *PloS One* 7, e34693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034693>
- Kim, C.Y., Alcalay, R.N., 2017. Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin. Neurol.* 37, 135–146. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601567>
- Kim, R.Y., Hoffman, A.S., Itoh, N., Ao, Y., Spence, R., Sofroniew, M.V., Voskuhl, R.R., 2014. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 274, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.06.009>
- Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T.E., Muzyczka, N., Mandel, R.J., Björklund, A., 2002. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein

- in the nigrostriatal system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 2780–2791. <https://doi.org/20026246>
- Kitamura, Y., Inden, M., Minamino, H., Abe, M., Takata, K., Taniguchi, T., 2010. The 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration produces microglia-like NG2 glial cells in the rat substantia nigra. *Glia* 58, 1686–1700. <https://doi.org/10.1002/glia.21040>
- Klegeris, A., Giasson, B.I., Zhang, H., Maguire, J., Pelech, S., McGeer, P.L., 2006. Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 2000–2008. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6183com>
- Klein, R.L., King, M.A., Hamby, M.E., Meyer, E.M., 2002. Dopaminergic cell loss induced by human A30P alpha-synuclein gene transfer to the rat substantia nigra. *Hum. Gene Ther.* 13, 605–612. <https://doi.org/10.1089/10430340252837206>
- Knott, C., Stern, G., Kingsbury, A., Welcher, A.A., Wilkin, G.P., 2002. Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. *Parkinsonism Relat. Disord.* 8, 329–341.
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., Kadomatsu, K., 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 4, e525. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.54>
- Kobylecki, C., Counsell, S.J., Cabanel, N., Wächter, T., Turkheimer, F.E., Eggert, K., Oertel, W., Brooks, D.J., Gerhard, A., 2013. Diffusion-weighted imaging and its relationship to microglial activation in parkinsonian syndromes. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19, 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.017>
- Koprach, J.B., Johnston, T.H., Reyes, M.G., Sun, X., Brotchie, J.M., 2010. Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 5, 43. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-43>
- Koprach, J.B., Kalia, L.V., Brotchie, J.M., 2017. Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 515–529. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.75>
- Kordower, J.H., Olanow, C.W., Dodiya, H.B., Chu, Y., Beach, T.G., Adler, C.H., Halliday, G.M., Bartus, R.T., 2013. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 136, 2419–2431. <https://doi.org/10.1093/brain/awt192>
- Koshimori, Y., Ko, J.-H., Mizrahi, R., Rusjan, P., Mabrouk, R., Jacobs, M.F., Christopher, L., Hamani, C., Lang, A.E., Wilson, A.A., Houle, S., Strafella, A.P., 2015. Imaging Striatal Microglial Activation in Patients with Parkinson's Disease. *PloS One* 10, e0138721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138721>
- Kostuk, E.W., Cai, J., Iacovitti, L., 2019. Subregional differences in astrocytes underlie selective neurodegeneration or protection in Parkinson's disease models in culture. *Glia* 67, 1542–1557. <https://doi.org/10.1002/glia.23627>
- Kuhnast, B., Damont, A., Hinnen, F., Catarina, T., Demphel, S., Le Helleix, S., Coulon, C., Goutal, S., Gervais, P., Dollé, F., 2012. [18F]DPA-714, [18F]PBR111 and [18F]FEDAA1106-selective radioligands for imaging TSPO 18 kDa with PET: automated radiosynthesis on a TRACERLAB FX-FN synthesizer and quality controls. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* 70, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.10.015>

- Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2005. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *J. Neuroimmunol.* 162, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.01.015>
- Kurkowska-Jastrzebska, I., Wrońska, A., Kohutnicka, M., Członkowski, A., Członkowska, A., 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp. Neurol.* 156, 50–61. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6993>
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.* 368, 545–553. <https://doi.org/10.1042/BJ20021121>
- Kwan, W., Träger, U., Davalos, D., Chou, A., Bouchard, J., Andre, R., Miller, A., Weiss, A., Giorgini, F., Cheah, C., Möller, T., Stella, N., Akassoglou, K., Tabrizi, S.J., Muchowski, P.J., 2012. Mutant huntingtin impairs immune cell migration in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* 122, 4737–4747. <https://doi.org/10.1172/JCI64484>
- Lacapère, J.J., Papadopoulos, V., 2003. Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68, 569–585.
- Lalo, U., Rasooli-Nejad, S., Pankratov, Y., 2014. Exocytosis of gliotransmitters from cortical astrocytes: implications for synaptic plasticity and aging. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1275–1281. <https://doi.org/10.1042/BST20140163>
- Laloux, C., Gouel, F., Lachaud, C., Timmerman, K., Do Van, B., Jonneaux, A., Petrault, M., Garçon, G., Rouaix, N., Moreau, C., Bordet, R., Duce, J.A., Devedjian, J.C., Devos, D., 2017. Continuous cerebroventricular administration of dopamine: A new treatment for severe dyskinesia in Parkinson's disease? *Neurobiol. Dis.* 103, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.013>
- Langston, J.W., Ballard, P., 1984. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 11, 160–165.
- Lassmann, H., van Horssen, J., Mahad, D., 2012. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168>
- Lavisse, S., Guillermier, M., Hérard, A.-S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N., Ben Haim, L., Lebon, V., Remy, P., Dollé, F., Delzescaux, T., Bonvento, G., Hantraye, P., Escartin, C., 2012. Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 10809–10818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1487-12.2012>
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., Gordon, S., 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151–170.
- Lázaro, D.F., Rodrigues, E.F., Langohr, R., Shahpasandzadeh, H., Ribeiro, T., Guerreiro, P., Gerhardt, E., Kröhnert, K., Klucken, J., Pereira, M.D., Popova, B., Kruse, N., Mollenhauer, B., Rizzoli, S.O., Braus, G.H., Danzer, K.M., Outeiro, T.F., 2014. Systematic Comparison of the Effects of Alpha-synuclein Mutations on Its Oligomerization and Aggregation. *PLOS Genet.* 10, e1004741. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>
- Le, W., Wu, J., Tang, Y., 2016. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 89. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00089>
- Lee, A., Gilbert, R.M., 2016. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol. Clin.* 34, 955–965. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012>

- Lee, E.-J., Woo, M.-S., Moon, P.-G., Baek, M.-C., Choi, I.-Y., Kim, W.-K., Junn, E., Kim, H.-S., 2010. Alpha-synuclein activates microglia by inducing the expressions of matrix metalloproteinases and the subsequent activation of protease-activated receptor-1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 615–623. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903480>
- Lee, H., James, W.S., Cowley, S.A., 2017. LRRK2 in peripheral and central nervous system innate immunity: its link to Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 131–139. <https://doi.org/10.1042/BST20160262>
- Lee, H.J., Jang, S.H., Kim, H., Yoon, J.H., Chung, K.C., 2012. PINK1 stimulates interleukin-1 β -mediated inflammatory signaling via the positive regulation of TRAF6 and TAK1. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 3301–3315. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1004-7>
- Lee, H.-J., Suk, J.-E., Patrick, C., Bae, E.-J., Cho, J.-H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., Lee, S.-J., 2010. Direct Transfer of α -Synuclein from Neuron to Astroglia Causes Inflammatory Responses in Synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* 285, 9262–9272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081125>
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., Serra, P.A., Impagnatiello, F., Morale, M.C., Marchetti, B., 2010. Combining nitric oxide release with anti-inflammatory activity preserves nigrostriatal dopaminergic innervation and prevents motor impairment in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 7, 83. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-83>
- Lenhossek, M., 1893. *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschung.* Fischer's Medicinische Buchhandlung, Berlin
- Levi-Montalcini, Hamburger, 1951. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.1401160206> (accessed 6.7.18).
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503. <https://doi.org/10.1038/nm1746>
- Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A.C.-A., Aithmitti, N., Jankowsky, J.L., Zheng, H., 2016. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 577–589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>
- Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Przedborski, S., 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat. Med.* 5, 1403–1409. <https://doi.org/10.1038/70978>
- Liddel, S.A., Barres, B.A., 2017a. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddel, S.A., Barres, B.A., 2017b. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A., 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>

- Lim, N.S., Swanson, C.R., Cherng, H., Unger, T.L., Xie, S.X., Weintraub, D., Marek, K., Stern, M.B., Siderowf, A., Trojanowski, J.Q., Chen-Plotkin, A.S., 2016. Plasma EGF and cognitive decline in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 346–355. <https://doi.org/10.1002/acn3.299>
- Lindenau, J.D., Altmann, V., Schumacher-Schuh, A.F., Rieder, C.R., Hutz, M.H., 2017. Tumor necrosis factor alpha polymorphisms are associated with Parkinson's disease age at onset. *Neurosci. Lett.* 658, 133–136. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.049>
- Liu, J.-Q., Chu, S.-F., Zhou, X., Zhang, D.-Y., Chen, N.-H., 2019. Role of chemokines in Parkinson's disease. *Brain Res. Bull.* 152, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.05.020>
- Lofrumento, D.D., Saponaro, C., Cianciulli, A., De Nuccio, F., Mitolo, V., Nicolardi, G., Panaro, M.A., 2011. MPTP-induced neuroinflammation increases the expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors in mouse brain. *Neuroimmunomodulation* 18, 79–88. <https://doi.org/10.1159/000320027>
- Lopez Juarez, A., He, D., Richard Lu, Q., 2016. Oligodendrocyte progenitor programming and reprogramming: Toward myelin regeneration. *Brain Res.* 1638, 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.051>
- Loria, F., Vargas, J.Y., Bousset, L., Syan, S., Salles, A., Melki, R., Zurzolo, C., 2017. α -Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 134, 789–808. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1746-2>
- Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Wang, Ya, Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., Wang, X., Alexander, S.I., Harris, D.C.H., Wang, Yiping, 2013. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 745–755. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.135>
- Lu, J., Sun, F., Ma, H., Qing, H., Deng, Y., 2015. Comparison between α -synuclein wild-type and A53T mutation in a progressive Parkinson's disease model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 988–993. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.007>
- Luchtman, D.W., Shao, D., Song, C., 2009. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol. Behav.* 98, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.04.021>
- Lui, H., Zhang, J., Makinson, S.R., Cahill, M.K., Kelley, K.W., Huang, H.-Y., Shang, Y., Oldham, M.C., Martens, L.H., Gao, F., Coppola, G., Sloan, S.A., Hsieh, C.L., Kim, C.C., Bigio, E.H., Weintraub, S., Mesulam, M.-M., Rademakers, R., Mackenzie, I.R., Seeley, W.W., Karydas, A., Miller, B.L., Borroni, B., Ghidoni, R., Farese, R.V., Paz, J.T., Barres, B.A., Huang, E.J., 2016. Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell* 165, 921–935. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.001>
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2012. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Lundblad, M., Decressac, M., Mattsson, B., Björklund, A., 2012. Impaired neurotransmission caused by overexpression of α -synuclein in nigral dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3213–3219. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200575109>
- Luus, Hanani, Reynolds, Kassiuo, 2010. The development of PET radioligands for imaging the translocator protein (18 kDa): What have we learned? [WWW Document]. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jlcr.1752/abstract> (accessed 3.15.18).

- Ma, Y., Wang, J., Wang, Y., Yang, G.-Y., 2017. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol., New Perspectives on Healthy Aging* 157, 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.005>
- Maarouf, C.L., Beach, T.G., Adler, C.H., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., Wu, T., Walker, D.G., Kokjohn, T.A., Roher, A.E., Arizona PD Consortium, 2012. Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol. Res.* 34, 669–676. <https://doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000063>
- Magen, I., Chesselet, M.-F., 2010. Genetic mouse models of Parkinson's disease The state of the art. *Prog. Brain Res.* 184, 53–87. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84004-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84004-X)
- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., Di Monte, D.A., 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 277, 1641–1644. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100560200>
- Margulis, J., Finkbeiner, S., 2014. Proteostasis in striatal cells and selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 218. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00218>
- Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J.B., Medhurst, A.D., Dexter, D.T., 2009. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 110, 966–975. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06189.x>
- Marks, W.J., Bartus, R.T., Siffert, J., Davis, C.S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., Bakay, R., Watts, R., Guthrie, B., Jankovic, J., Simpson, R., Tagliati, M., Alterman, R., Stern, M., Baltuch, G., Starr, P.A., Larson, P.S., Ostrem, J.L., Nutt, J., Kieburtz, K., Kordower, J.H., Olanow, C.W., 2010. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 9, 1164–1172. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70254-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70254-4)
- Martín, A., Boisgard, R., Thézé, B., Van Camp, N., Kuhnast, B., Damont, A., Kassiou, M., Dollé, F., Tavitian, B., 2010. Evaluation of the PBR/TSPO radioligand $[(18)\text{F}]\text{DPA-714}$ in a rat model of focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 230–241. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.205>
- Martín de Pablos, A., García-Moreno, J.-M., Fernández, E., 2015. Does the Cerebrospinal Fluid Reflect Altered Redox State But Not Neurotrophic Support Loss in Parkinson's Disease? *Antioxid. Redox Signal.* 23, 893–898. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6423>
- Martin-Bastida, A., Pietracupa, S., Piccini, P., 2017. Neuromelanin in parkinsonian disorders: an update. *Int. J. Neurosci.* 127, 1116–1123. <https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1325883>
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Martinez, F.O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B.N., Draijer, C., Thomas, B., Fabbri, M., Crawshaw, A., Ho, L.P., Ten Hacken, N.H., Cobos Jiménez, V., Kootstra, N.A., Hamann, J., Greaves, D.R., Locati, M., Mantovani, A., Gordon, S., 2013. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121, e57–69. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-436212>
- Masuda, T., Itoh, J., Koide, T., Tomidokoro, Y., Takei, Y., Ishii, K., Tamaoka, A., 2017. Transforming growth factor- β 1 in the cerebrospinal fluid of patients with distinct neurodegenerative diseases. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 35, 47–49. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.09.018>

- Matcovitch-Natan, O., Winter, D.R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Ben-Yehuda, H., David, E., Zelada González, F., Perrin, P., Keren-Shaul, H., Gury, M., Lara-Astaiso, D., Thaiss, C.A., Cohen, M., Bahar Halpern, K., Baruch, K., Deczkowska, A., Lorenzo-Vivas, E., Itzkovitz, S., Elinav, E., Sieweke, M.H., Schwartz, M., Amit, I., 2016. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 353, aad8670. <https://doi.org/10.1126/science.aad8670>
- McCoy, M.K., Martinez, T.N., Ruhn, K.A., Szymkowski, D.E., Smith, C.G., Botterman, B.R., Tansey, K.E., Tansey, M.G., 2006. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 9365–9375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1504-06.2006>
- McFarland, N.R., Lee, J.-S., Hyman, B.T., McLean, P.J., 2009. Comparison of transduction efficiency of recombinant AAV serotypes 1, 2, 5, and 8 in the rat nigrostriatal system. *J. Neurochem.* 109, 838–845. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06010.x>
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G., 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285–1291.
- McGeer, P.L., Lee, M., McGeer, E.G., 2017. A review of human diseases caused or exacerbated by aberrant complement activation. *Neurobiol. Aging* 52, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.017>
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2004. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1035, 104–116. <https://doi.org/10.1196/annals.1332.007>
- McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., 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. <https://doi.org/10.1002/ana.10728>
- Mena, M.A., García de Yébenes, J., 2008. Glial cells as players in parkinsonism: the “good,” the “bad,” and the “mysterious” glia. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 14, 544–560. <https://doi.org/10.1177/1073858408322839>
- Merson, T.D., Binder, M.D., Kilpatrick, T.J., 2010. Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. *Neuromolecular Med.* 12, 99–132. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8112-z>
- Miller, G.W., 2007. Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 100, 1–2. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm223>
- Mills Ko, E., Ma, J.H., Guo, F., Miers, L., Lee, E., Bannerman, P., Burns, T., Ko, D., Sohn, J., Soulika, A.M., Pleasure, D., 2014. Deletion of astroglial CXCL10 delays clinical onset but does not affect progressive axon loss in a murine autoimmune multiple sclerosis model. *J. Neuroinflammation* 11, 105. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-105>
- Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P., Moos, T., 2000. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95, 425–432.
- Moehle, M.S., Webber, P.J., Tse, T., Sukar, N., Standaert, D.G., DeSilva, T.M., Cowell, R.M., West, A.B., 2012. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 1602–1611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5601-11.2012>
- Moehle, M.S., West, A.B., 2015. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience* 302, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.018>

- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T., 1994a. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 180, 147–150.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T., 1996. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 211, 13–16.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., Nagatsu, T., 1994b. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 165, 208–210. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90746-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90746-3)
- Mogi, M., Inagaki, H., Kojima, K., Minami, M., Harada, M., 1995. Transforming growth factor-alpha in human submandibular gland and saliva. *J. Immunoassay* 16, 379–394.
- Mogi, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Nagatsu, T., 2007. p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci. Lett.* 414, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.12.003>
- Morales, I., Sanchez, A., Rodriguez-Sabate, C., Rodriguez, M., 2017. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. *PLOS ONE* 12, e0185989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185989>
- Moran, L.B., Croisier, E., Duke, D.C., Kalaitzakis, M.E., Roncaroli, F., Deprez, M., Dexter, D.T., Pearce, R.K.B., Graeber, M.B., 2007. Analysis of alpha-synuclein, dopamine and parkin pathways in neuropathologically confirmed parkinsonian nigra. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 113, 253–263. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0181-6>
- Moran, L.B., Graeber, M.B., 2008. Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation. *Neurogenetics* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10048-007-0116-y>
- More, S.V., Kumar, H., Kim, I.S., Song, S.-Y., Choi, D.-K., 2013. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2013, 952375. <https://doi.org/10.1155/2013/952375>
- Moreno, M., Bannerman, P., Ma, J., Guo, F., Miers, L., Soulika, A.M., Pleasure, D., 2014. Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 8175–8185. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1137-14.2014>
- Mori, S., Maher, P., Conti, B., 2016. Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4. *Brain Sci.* 6. <https://doi.org/10.3390/brainsci6020018>
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Murphy-Royal, C., Dupuis, J., Groc, L., Oliet, S.H.R., 2017. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.* 95, 2140–2151. <https://doi.org/10.1002/jnr.24029>
- Mythri, R.B., Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Muthane, U.B., Yasha, T.C., Srinivas Bharath, M.M., Shankar, S.K., 2011. Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. *Neurochem. Res.* 36, 1452–1463. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0471-9>

- Nagatsu, T., Sawada, M., 2005. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr. Pharm. Des.* 11, 999–1016. <https://doi.org/10.2174/1381612053381620>
- Nash, Y., Schmukler, E., Trudler, D., Pinkas-Kramarski, R., Frenkel, D., 2017. DJ-1 deficiency impairs autophagy and reduces alpha-synuclein phagocytosis by microglia. *J. Neurochem.* 143, 584–594. <https://doi.org/10.1111/jnc.14222>
- Nayak, D., Roth, T.L., McGavern, D.B., 2014. Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 367–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>
- Ness, J.K., Wood, T.L., 2002. Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 20, 476–488.
- Nicklas, W.J., Youngster, S.K., Kindt, M.V., Heikkila, R.E., 1987. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci.* 40, 721–729.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Norazit, A., Meedeniya, A.C.B., Nguyen, M.N., Mackay-Sim, A., 2010. Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res.* 1360, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.070>
- Novikova, L., Garris, B.L., Garris, D.R., Lau, Y.-S., 2006. Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 140, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.007>
- Oberheim, N.A., Tian, G.-F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., Nedergaard, M., 2008. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3264–3276. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4980-07.2008>
- O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., Reinhard, J.F., 1990. Characterization of the origins of astrocyte response to injury using the dopaminergic neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res.* 521, 73–80. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91526-m](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91526-m)
- Ohno, Y., Kinboshi, M., Shimizu, S., 2018. Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir4.1 as a Novel Modulator of BDNF Expression in Astrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113313>
- Ojala, D.S., Amara, D.P., Schaffer, D.V., 2015. Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 21, 84–98. <https://doi.org/10.1177/1073858414521870>
- Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., Okano, H., 2006. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.* 12, 829–834. <https://doi.org/10.1038/nm1425>
- Oliveras-Salvá, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D'Hooge, R., Van den Haute, C., Baekelandt, V., 2013. rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 8, 44. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-44>

- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., Björklund, A., 1995. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 3863–3875.
- O'Regan, G., deSouza, R.-M., Balestrino, R., Schapira, A.H., 2017. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *J. Park. Dis.* 7, 411–422. <https://doi.org/10.3233/JPD-171092>
- Orenstein, S.J., Kuo, S.-H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., Cortes, E., Honig, L.S., Dauer, W., Consiglio, A., Raya, A., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2013. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* 16, 394–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3350>
- Orre, M., Kamphuis, W., Dooves, S., Kooijman, L., Chan, E.T., Kirk, C.J., Dimayuga Smith, V., Koot, S., Mamber, C., Jansen, A.H., Ovaa, H., Hol, E.M., 2013. Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 136, 1415–1431. <https://doi.org/10.1093/brain/awt083>
- Ory, D., Planas, A., Dresselaers, T., Gsell, W., Postnov, A., Celen, S., Casteels, C., Himmelreich, U., Debyser, Z., Van Laere, K., Verbruggen, A., Bormans, G., 2015. PET imaging of TSPO in a rat model of local neuroinflammation induced by intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Nucl. Med. Biol.* 42, 753–761. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.06.010>
- Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., Torizuka, T., 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 57, 168–175. <https://doi.org/10.1002/ana.20338>
- Pagonabarraga, J., Kulisevsky, J., Strafella, A.P., Krack, P., 2015. Apathy in Parkinson's disease: clinical features, neural substrates, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol.* 14, 518–531. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00019-8)
- Pal, R., Tiwari, P.C., Nath, R., Pant, K.K., 2016. Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol. Res.* 38, 1111–1122. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1249997>
- Palma, A., Jarrah, A.S., Tieri, P., Cesareni, G., Castiglione, F., 2018. Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States. *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01659>
- Pang, S.Y.-Y., Ho, P.W.-L., Liu, H.-F., Leung, C.-T., Li, L., Chang, E.E.S., Ramsden, D.B., Ho, S.-L., 2019. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* 8. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0165-9>
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Papa, M., De Luca, C., Petta, F., Alberghina, L., Cirillo, G., 2014. Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 42, 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.010>
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapère, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., Gavish, M., 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.005>

- Park, J.-Y., Paik, S.R., Jou, I., Park, S.M., 2008. Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric α -synuclein, not aggregated α -synuclein: Implications for Parkinson's disease. *Glia* 56, 1215–1223. <https://doi.org/10.1002/glia.20691>
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., Gan, W.-B., 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
- Patel, N., Jankovic, J., Hallett, M., 2014. Sensory aspects of movement disorders. *Lancet Neurol.* 13, 100–112. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70213-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70213-8)
- Pattarini, R., Smeyne, R.J., Morgan, J.I., 2007. Temporal mRNA profiles of inflammatory mediators in the murine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 145, 654–668. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.030>
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13, 139–143.
- Peelaerts, W., Bousset, L., Baekelandt, V., Melki, R., 2018. α -Synuclein strains and seeding in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy: similarities and differences. *Cell Tissue Res.* 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2839-5>
- Pekny, M., Pekna, M., 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.* 94, 1077–1098. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>
- Pfrieger, F.W., Ungerer, N., 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–371. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.002>
- Phelps, M.E., 2000a. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9226–9233.
- Phelps, M.E., 2000b. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 41, 661–681.
- Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S., Carta, A.R., 2014. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 71, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.011>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., Lang, A.E., 2017. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047.
- Popovic, D., Vucic, D., Dikic, I., 2014. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat. Med.* 20, 1242–1253. <https://doi.org/10.1038/nm.3739>
- Postuma, R.B., Berg, D., 2016. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 622–634. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.152>
- Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., Halliday, G., Goetz, C.G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B.R., Adler, C.H., Deuschl, G.,

2015. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 1591–1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Potashkin, J.A., Blume, S.R., Runkle, N.K., 2010. Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Park. Dis.* 2011, 658083. <https://doi.org/10.4061/2011/658083>
- Pöyhönen, S., Er, S., Domanskyi, A., Airavaara, M., 2019. Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury. *Front. Physiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00486>
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., Almer, G., 2000. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.* 16, 135–142.
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., Vila, M., 2004. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 375–379. <https://doi.org/10.1023/B:JOB0000041771.66775.d5>
- Puttaparthi, K., Elliott, J.L., 2005. Non-neuronal induction of immunoproteasome subunits in an ALS model: possible mediation by cytokines. *Exp. Neurol.* 196, 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.027>
- Qin, X.-Y., Zhang, S.-P., Cao, C., Loh, Y.P., Cheng, Y., 2016. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 73, 1316–1324. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.2742>
- Ramaswamy, S., Kordower, J.H., 2009. Are growth factors the answer? *Parkinsonism Relat. Disord.* 15 Suppl 3, S176-180. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70809-0](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70809-0)
- Rannikko, E.H., Weber, S.S., Kahle, P.J., 2015. Exogenous α -synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes. *BMC Neurosci.* 16, 57. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0192-0>
- Ransohoff, R.M., 2016. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.* 19, 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Ransom, B.R., Kunis, D.M., Irwin, I., Langston, J.W., 1987. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci. Lett.* 75, 323–328.
- Rappold, P.M., Tieu, K., 2010. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.001>
- Real, C.C., Doorduyn, J., Kopschina Feltes, P., Vázquez García, D., de Paula Faria, D., Britto, L.R., de Vries, E.F., 2017. Evaluation of exercise-induced modulation of glial activation and dopaminergic damage in a rat model of Parkinson's disease using [11C]PBR28 and [18F]FDOPA PET. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 0271678X17750351. <https://doi.org/10.1177/0271678X17750351>
- Redenšek, S., Flisar, D., Kojović, M., Kramberger, M.G., Georgiev, D., Pirtošek, Z., Trošt, M., Dolžan, V., 2019. Genetic variability of inflammation and oxidative stress genes does not play a major role in the occurrence of adverse events of dopaminergic treatment in Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 16, 50. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1439-y>
- Reif, D.W., Simmons, R.D., 1990. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 537–541. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90680-W](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90680-W)
- Reijnders, J.S.A.M., Ehrt, U., Weber, W.E.J., Aarsland, D., Leentjens, A.F.G., 2008. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 23, 183–189; quiz 313. <https://doi.org/10.1002/mds.21803>

- Reinert, K.R.S., Umphlet, C.D., Quattlebaum, A., Boger, H.A., 2014. Short-term effects of an endotoxin on substantia nigra dopamine neurons. *Brain Res.* 1557, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.02.005>
- Rentzos, M., Nikolaou, C., Andreadou, E., Paraskevas, G.P., Rombos, A., Zoga, M., Tsoutsou, A., Boufidou, F., Kapaki, E., Vassilopoulos, D., 2009. Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 119, 332–337. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01103.x>
- Riachi, N.J., LaManna, J.C., Harik, S.I., 1989. Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 744–748.
- Richardson, J.R., Caudle, W.M., Guillot, T.S., Watson, J.L., Nakamaru-Ogiso, E., Seo, B.B., Sherer, T.B., Greenamyre, J.T., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Miller, G.W., 2007. Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 95, 196–204. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl133>
- Rizor, A., Pajarillo, E., Johnson, J., Aschner, M., Lee, E., 2019. Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. *Antioxidants* 8. <https://doi.org/10.3390/antiox8080265>
- Robel, S., Buckingham, S.C., Boni, J.L., Campbell, S.L., Danbolt, N.C., Riedemann, T., Sutor, B., Sontheimer, H., 2015. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3330–3345. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1574-14.2015>
- Robillard, K.N., Lee, K.M., Chiu, K.B., MacLean, A.G., 2016. Glial Cell Morphological and Density Changes Through the Lifespan of Rhesus Macaques. *Brain. Behav. Immun.* 55, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.006>
- Rodriguez-Oroz, M.C., Jahanshahi, M., Krack, P., Litvan, I., Macias, R., Bezard, E., Obeso, J.A., 2009. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 8, 1128–1139. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70293-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70293-5)
- Rojas, S., Martín, A., Arranz, M.J., Pareto, D., Purroy, J., Verdaguer, E., Llop, J., Gómez, V., Gispert, J.D., Millán, O., Chamorro, A., Planas, A.M., 2007. Imaging brain inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and induction of the peripheral-type benzodiazepine receptor after transient focal ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1975–1986. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600500>
- Rossi, D., 2015. Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog. Neurobiol.* 130, 86–120. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.04.003>
- Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E.D., Triller, A., Bessis, A., 2004. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 11421–11428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2251-04.2004>
- Roy, A., Ghosh, A., Jana, A., Liu, X., Brahmachari, S., Gendelman, H.E., Pahan, K., 2012. Sodium phenylbutyrate controls neuroinflammatory and antioxidant activities and protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. *PloS One* 7, e38113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038113>
- Ruiz-Martínez, J., Gorostidi, A., Ibañez, B., Alzualde, A., Otaegui, D., Moreno, F., López de Munain, A., Bergareche, A., Gómez-Esteban, J.C., Martí Massó, J.F., 2010. Penetrance in Parkinson's disease

- related to the LRRK2 R1441G mutation in the Basque country (Spain). *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 25, 2340–2345. <https://doi.org/10.1002/mds.23278>
- Salter, M.W., Stevens, B., 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* 23, 1018–1027. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>
- Sanchez-Guajardo, V., Febbraro, F., Kirik, D., Romero-Ramos, M., 2010. Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PloS One* 5, e8784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008784>
- Sandhu, J.K., Gardaneh, M., Iwasiew, R., Lanthier, P., Gangaraju, S., Ribocco-Lutkiewicz, M., Tremblay, R., Kiuchi, K., Sikorska, M., 2009. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 33, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.016>
- Sandoval, K.E., Witt, K.A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* 32, 200–219. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.005>
- Savaskan, N.E., Borchert, A., Bräuer, A.U., Kuhn, H., 2007. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.033>
- Savchenko, A., Barnes, S., Kramer, R.H., 1997. Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide. *Nature* 390, 694–698. <https://doi.org/10.1038/37803>
- Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., Skibo, G.G., 2000. Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96, 195–203.
- Saxena, S., Caroni, P., 2011. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* 71, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.031>
- Scarf, A.M., Kassiou, M., 2011. The translocator protein. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 52, 677–680. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.086629>
- Schain, M., Kreisl, W.C., 2017. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17, 25. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0733-2>
- Scheperjans, F., Pekkonen, E., Kaakkola, S., Auvinen, P., 2015. Linking Smoking, Coffee, Urate, and Parkinson's Disease – A Role for Gut Microbiota? *J. Park. Dis.* 5, 255–262. <https://doi.org/10.3233/JPD-150557>
- Schitine, C., Nogaroli, L., Costa, M.R., Hedin-Pereira, C., 2015. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00076>
- Schmidt, O.I., Heyde, C.E., Ertel, W., Stahel, P.F., 2005. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 388–399. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.028>
- Schmidt, S., Linnartz, B., Mendritzki, S., Sczegan, T., Lübbert, M., Stichel, C.C., Lübbert, H., 2011. Genetic mouse models for Parkinson's disease display severe pathology in glial cell mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1197–1211. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq564>
- Schneider, S.A., Alcalay, R.N., 2017. Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 1504–1523. <https://doi.org/10.1002/mds.27193>

- Schober, A., 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318, 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>
- Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., McKenna, M.C., 2014. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes, in: *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain, Advances in Neurobiology*. Springer, Cham, pp. 13–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08894-5_2
- Schweinhardt, P., Fransson, P., Olson, L., Spenger, C., Andersson, J.L.R., 2003. A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J. Neurosci. Methods* 129, 105–113.
- Schweitzer, P.J., Fallon, B.A., Mann, J.J., Kumar, J.S.D., 2010. PET tracers for the peripheral benzodiazepine receptor and uses thereof. *Drug Discov. Today* 15, 933–942. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.012>
- Seidel, J.L., Faideau, M., Aiba, I., Pannasch, U., Escartin, C., Rouach, N., Bonvento, G., Shuttleworth, C.W., 2015. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) activation of astrocytes decreases spreading depolarization susceptibility and increases potassium clearance. *Glia* 63, 91–103. <https://doi.org/10.1002/glia.22735>
- Sekar, A., Bialas, A.R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T.R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., Genovese, G., Rose, S.A., Handsaker, R.E., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Daly, M.J., Carroll, M.C., Stevens, B., McCarroll, S.A., 2016. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530, 177–183. <https://doi.org/10.1038/nature16549>
- Sekiyama, K., Sugama, S., Fujita, M., Sekigawa, A., Takamatsu, Y., Waragai, M., Takenouchi, T., Hashimoto, M., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Lesson from Genetically Manipulated Mouse Models of α -Synucleinopathies. *Park. Dis.* 2012, 271732. <https://doi.org/10.1155/2012/271732>
- Sekiyama, K., Takamatsu, Y., Waragai, M., Hashimoto, M., 2014. Role of genomics in translational research for Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.028>
- Sen, A., Kalvakuri, S., Bodmer, R., Cox, R.T., 2015. Clueless, a protein required for mitochondrial function, interacts with the PINK1-Parkin complex in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* 8, 577–589. <https://doi.org/10.1242/dmm.019208>
- Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., Greenamyre, J.T., 2003. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp. Neurol.* 179, 9–16.
- Shi, M., Bradner, J., Hancock, A.M., Chung, K.A., Quinn, J.F., Peskind, E.R., Galasko, D., Jankovic, J., Zabetian, C.P., Kim, H.M., Leverenz, J.B., Montine, T.J., Ghingina, C., Kang, U.J., Cain, K.C., Wang, Y., Aasly, J., Goldstein, D.S., Zhang, J., 2011. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Parkinson Disease Diagnosis and Progression. *Ann. Neurol.* 69, 570–580. <https://doi.org/10.1002/ana.22311>
- Sidransky, E., Lopez, G., 2012. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 11, 986–998. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70190-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70190-4)
- Silvestroni, A., Faull, R.L.M., Strand, A.D., Möller, T., 2009. Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington's disease. *Neuroreport* 20, 1098–1103. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832e34ee>
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., Nedergaard, M., 2003. Signaling at the gliovascular interface. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 9254–9262.

- Simpson, J.E., Ince, P.G., Shaw, P.J., Heath, P.R., Raman, R., Garwood, C.J., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Matthews, F.E., Brayne, C., Wharton, S.B., MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group, 2011. Microarray analysis of the astrocyte transcriptome in the aging brain: relationship to Alzheimer's pathology and APOE genotype. *Neurobiol. Aging* 32, 1795–1807. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.013>
- Simunovic, F., Yi, M., Wang, Y., Macey, L., Brown, L.T., Krichevsky, A.M., Andersen, S.L., Stephens, R.M., Benes, F.M., Sonntag, K.C., 2009. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain J. Neurol.* 132, 1795–1809. <https://doi.org/10.1093/brain/awn323>
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., Banik, N.L., 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* 87, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>
- Sofroniew, M.V., 2015. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- Sofroniew, M.V., 2014. Astrogliosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020420. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
- Song, Y.J.C., Halliday, G.M., Holton, J.L., Lashley, T., O'Sullivan, S.S., McCann, H., Lees, A.J., Ozawa, T., Williams, D.R., Lockhart, P.J., Revesz, T.R., 2009. Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 1073–1083. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b66f1b>
- Soni, N., Reddy, B.V.K., Kumar, P., 2014. GLT-1 transporter: an effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 127, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.10.001>
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M., 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6469–6473.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Stefanova, N., Fellner, L., Reindl, M., Masliah, E., Poewe, W., Wenning, G.K., 2011. Toll-like receptor 4 promotes alpha-synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *Am. J. Pathol.* 179, 954–963. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.013>
- Stokholm, M.G., Iranzo, A., Østergaard, K., Serradell, M., Otto, M., Svendsen, K.B., Garrido, A., Vilas, D., Borghammer, P., Santamaria, J., Møller, A., Gaig, C., Brooks, D.J., Tolosa, E., Pavese, N., 2017. Assessment of neuroinflammation in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a case-control study. *Lancet Neurol.* 16, 789–796. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30173-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30173-4)
- Streit, W.J., Kreutzberg, G.W., 1988. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J. Comp. Neurol.* 268, 248–263. <https://doi.org/10.1002/cne.902680209>
- Strome, E.M., Cepeda, I.L., Sossi, V., Doudet, D.J., 2006. Evaluation of the integrity of the dopamine system in a rodent model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography compared to behavioral assessment and autoradiography. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 8, 292–299. <https://doi.org/10.1007/s11307-006-0051-6>

- Su, X., Federoff, H.J., Maguire-Zeiss, K.A., 2009. Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotox. Res.* 16, 238–254. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9053-x>
- Su, X., Maguire-Zeiss, K.A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., Federoff, H.J., 2008. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 29, 1690–1701. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006>
- Sugama, S., Takenouchi, T., Fujita, M., Conti, B., Hashimoto, M., 2009. Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment. *J. Neuroimmunol.* 207, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.11.007>
- Surmeier, D.J., Schumacker, P.T., 2013. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 288, 10736–10741. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.410530>
- Tabata, H., 2015. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114>
- Taguchi, Y.V., Liu, J., Ruan, J., Pacheco, J., Zhang, X., Abbasi, J., Keutzer, J., Mistry, P.K., Chandra, S.S., 2017. Glucosylsphingosine Promotes α -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 37, 9617–9631. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1525-17.2017>
- Takahashi, K., Rochford, C.D.P., Neumann, H., 2005. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201, 647–657. <https://doi.org/10.1084/jem.20041611>
- Takano, T., Kang, J., Jaiswal, J.K., Simon, S.M., Lin, J.H.-C., Yu, Y., Li, Y., Yang, J., Dienel, G., Zielke, H.R., Nedergaard, M., 2005. Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16466–16471. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506382102>
- Tang, Y., Le, W., 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Tansey, M.G., Goldberg, M.S., 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* 37, 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.004>
- Tapias, V., Escames, G., López, L.C., López, A., Camacho, E., Carrión, M.D., Entrena, A., Gallo, M.A., Espinosa, A., Acuña-Castroviejo, D., 2009. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* 87, 3002–3010. <https://doi.org/10.1002/jnr.22123>
- Tapias, V., Hu, X., Luk, K.C., Sanders, L.H., Lee, V.M., Greenamyre, J.T., 2017a. Synthetic alpha-synuclein fibrils cause mitochondrial impairment and selective dopamine neurodegeneration in part via iNOS-mediated nitric oxide production. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2851–2874. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2541-x>
- Tapias, V., Hu, X., Luk, K.C., Sanders, L.H., Lee, V.M., Greenamyre, J.T., 2017b. SYNTHETIC ALPHA-SYNUCLEIN FIBRILS CAUSE MITOCHONDRIAL IMPAIRMENT AND SELECTIVE DOPAMINE NEURODEGENERATION IN PART VIA iNOS-MEDIATED NITRIC OXIDE PRODUCTION. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2851–2874. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2541-x>
- Tatton, N.A., Kish, S.J., 1997. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77, 1037–1048.

- Taylor, J.M., Main, B.S., Crack, P.J., 2013. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 62, 803–819. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.016>
- Tenenbaum, L., Humbert-Claude, M., 2017. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Delivery in Parkinson's Disease: A Delicate Balance between Neuroprotection, Trophic Effects, and Unwanted Compensatory Mechanisms. *Front. Neuroanat.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00029>
- Terada, T., Yokokura, M., Yoshikawa, E., Futatsubashi, M., Kono, S., Konishi, T., Miyajima, H., Hashizume, T., Ouchi, Y., 2016. Extrastriatal spreading of microglial activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann. Nucl. Med.* 30, 579–587. <https://doi.org/10.1007/s12149-016-1099-2>
- Theodore, S., Cao, S., McLean, P.J., Standaert, D.G., 2008. Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1149–1158. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818e5e99>
- Tofaris, G.K., Garcia Reitböck, P., Humby, T., Lambourne, S.L., O'Connell, M., Ghetti, B., Gossage, H., Emson, P.C., Wilkinson, L.S., Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3942–3950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4965-05.2006>
- Trapani, A., Palazzo, C., de Candia, M., Lasorsa, F.M., Trapani, G., 2013. Targeting of the translocator protein 18 kDa (TSPO): a valuable approach for nuclear and optical imaging of activated microglia. *Bioconjug. Chem.* 24, 1415–1428. <https://doi.org/10.1021/bc300666f>
- Tremblay, M.-E., Cookson, M.R., Civiero, L., 2019. Glial phagocytic clearance in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 14. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0314-8>
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L., Majewska, A.K., 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* 8, e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>
- Tufekci, K.U., Meuwissen, R., Genc, S., Genc, K., 2012. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 88, 69–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398314-5.00004-0>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., Yamashita, T., 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.* 16, 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Ulusoy, A., Decressac, M., Kirik, D., Björklund, A., 2010. Viral vector-mediated overexpression of α -synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 184, 89–111. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84005-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84005-1)
- Ungerstedt, U., 1971. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367, 1–48.
- Valls-Solé, J., Valldeoriola, F., 2002. Neurophysiological correlate of clinical signs in Parkinson's disease. *Clin. Neurophysiol.* 113, 792–805.
- Van der Perren, A., Toelen, J., Casteels, C., Macchi, F., Van Rompuy, A.-S., Sarre, S., Casadei, N., Nuber, S., Himmelreich, U., Osorio Garcia, M.I., Michotte, Y., D'Hooge, R., Bormans, G., Van Laere, K., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2015. Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with

adeno-associated viral vectors. *Neurobiol. Aging* 36, 1543–1558. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.015>

Van Kampen, J.M., Robertson, H.A., 2017. The BSSG rat model of Parkinson's disease: progressing towards a valid, predictive model of disease. *EPMA J.* 8, 261–271. <https://doi.org/10.1007/s13167-017-0114-6>

Vardjan, N., Verkhatsky, A., Zorec, R., 2015. Pathologic potential of astrocytic vesicle traffic: new targets to treat neurologic diseases? *Cell Transplant.* 24, 599–612. <https://doi.org/10.3727/096368915X687750>

Varnäs, K., Cselényi, Z., Jucaite, A., Halldin, C., Svenningsson, P., Farde, L., Varrone, A., 2018. PET imaging of [¹¹C]PBR28 in Parkinson's disease patients does not indicate increased binding to TSPO despite reduced dopamine transporter binding. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4161-6>

Vawter, M.P., Dillon-Carter, O., Tourtellotte, W.W., Carvey, P., Freed, W.J., 1996. TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. *Exp. Neurol.* 142, 313–322. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0200>

Vázquez-Claverie, M., Garrido-Gil, P., San Sebastián, W., Izal-Azcárate, A., Belzunegui, S., Marcilla, I., López, B., Luquin, M.-R., 2009. Acute and chronic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administrations elicit similar microglial activation in the substantia nigra of monkeys. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 977–984. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181b35e41>

Venneti, S., Lopresti, B.J., Wang, G., Hamilton, R.L., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Apte, U.M., Wiley, C.A., 2009. PK11195 labels activated microglia in Alzheimer's disease and in vivo in a mouse model using PET. *Neurobiol. Aging* 30, 1217–1226. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.11.005>

Venneti, S., Lopresti, B.J., Wiley, C.A., 2013. Molecular imaging of microglia/macrophages in the brain. *Glia* 61, 10–23. <https://doi.org/10.1002/glia.22357>

Verkhatsky, A., Nedergaard, M., 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

Virchow, R. L. K., 1856. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin.* Hamm, Grote

Virchow, R. L. K., 1858. *Die cellularpathologie in ihrer begründung auf physiologische und pathologische gewebelehre.* A. Hirschwald, Berlin

Vivash, L., O'Brien, T.J., 2016. Imaging Microglial Activation with TSPO PET: Lighting Up Neurologic Diseases? *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 57, 165–168. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.141713>

Volpicelli-Daley, L.A., Kirik, D., Stoyka, L.E., Standaert, D.G., Harms, A.S., 2016. How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *J. Neurochem.* 139 Suppl 1, 131–155. <https://doi.org/10.1111/jnc.13627>

von Bartheld, C.S., Bahney, J., Herculano-Houzel, S., 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* 524, 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>

von Bernhardi, R., Eugénin-von Bernhardi, J., Flores, B., Eugénin León, J., 2016. Glial Cells and Integrity of the Nervous System. *Adv. Exp. Med. Biol.* 949, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40764-7_1

Wachter, B., Schürger, S., Rolinger, J., von Ameln-Mayerhofer, A., Berg, D., Wagner, H.-J., Kueppers, E., 2010. Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and

- striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell Tissue Res.* 342, 147–160. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1061-x>
- Wakabayashi, K., Hayashi, S., Yoshimoto, M., Kudo, H., Takahashi, H., 2000. NACP/ α -synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 99, 14–20. <https://doi.org/10.1007/PL00007400>
- Walker, L.C., Jucker, M., 2015. Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 87–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033828>
- Walsh, S., Finn, D.P., Dowd, E., 2011. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 175, 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.005>
- Wang, L., Cheng, R., Fujinaga, M., Yang, Jian, Zhang, Y., Hatori, A., Kumata, K., Yang, Jing, Vasdev, N., Du, Y., Ran, C., Zhang, M.-R., Liang, S.H., 2017. A Facile Radiolabeling of [18F]FDPA via Spirocyclic Iodonium Ylides: Preliminary PET Imaging Studies in Preclinical Models of Neuroinflammation. *J. Med. Chem.* 60, 5222–5227. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00432>
- Wang, Q., Shin, E.-J., Nguyen, X.-K.T., Li, Q., Bach, J.-H., Bing, G., Kim, W.-K., Kim, H.-C., Hong, J.-S., 2012. Endogenous dynorphin protects against neurotoxin-elicited nigrostriatal dopaminergic neuron damage and motor deficits in mice. *J. Neuroinflammation* 9, 124. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-124>
- Wang, X., Deckert, M., Xuan, N.T., Nishanth, G., Just, S., Waisman, A., Naumann, M., Schlüter, D., 2013. Astrocytic A20 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF- κ B- and STAT1-dependent chemokine production in astrocytes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 711–724. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1183-9>
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2013. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 12870–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2121-13.2013>
- Watson, M.B., Richter, F., Lee, S.K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R.B., Chesselet, M.-F., 2012. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp. Neurol.* 237, 318–334. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.025>
- Weinberg, M.S., Samulski, R.J., McCown, T.J., 2013. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology* 69, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.03.004>
- West, M.J., 1999. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 22, 51–61.
- Whiten, D.R., Cox, D., Horrocks, M.H., Taylor, C.G., De, S., Flagmeier, P., Tosatto, L., Kumita, J.R., Ecroyd, H., Dobson, C.M., Klenerman, D., Wilson, M.R., 2018. Single-Molecule Characterization of the Interactions between Extracellular Chaperones and Toxic α -Synuclein Oligomers. *Cell Rep.* 23, 3492–3500. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.074>
- Wild, E., Magnusson, A., Lahiri, N., Krus, U., Orth, M., Tabrizi, S.J., Björkqvist, M., 2011. Abnormal peripheral chemokine profile in Huntington's disease. *PLoS Curr.* 3, RRN1231. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1231>

- Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Ber-Gles, D.E., Searson, P.C., 2013. The blood-brain barrier: An engineering perspective. *Front Neu-Roeng* 6, 7.
- Wu, D., Tseng, I.-J., Yuan, R.-Y., Hsieh, C.-Y., Hu, C.-J., 2014. Memory consolidation and inducible nitric oxide synthase expression during different sleep stages in Parkinson disease. *Sleep Med.* 15, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.09.016>
- Wu, Q., Takano, H., Riddle, D.M., Trojanowski, J.Q., Coulter, D.A., Lee, V.M.-Y., 2019. α -Synuclein (α Syn) Preformed Fibrils Induce Endogenous α Syn Aggregation, Compromise Synaptic Activity and Enhance Synapse Loss in Cultured Excitatory Hippocampal Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 39, 5080–5094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0060-19.2019>
- Xie, X., Luo, X., Liu, N., Li, X., Lou, F., Zheng, Y., Ren, Y., 2017. Monocytes, microglia, and CD200-CD200R1 signaling are essential in the transmission of inflammation from the periphery to the central nervous system. *J. Neurochem.* 141, 222–235. <https://doi.org/10.1111/jnc.13972>
- Yamada, T., McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1992. Lewy bodies in Parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 84, 100–104.
- Yao, K., Zhao, Y.-F., 2018. Aging modulates microglia phenotypes in neuroinflammation of MPTP-PD mice. *Exp. Gerontol.* 111, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.07.010>
- Yasuda, T., Mochizuki, H., 2010. Use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev. Neurother.* 10, 915–924. <https://doi.org/10.1586/ern.10.55>
- Yasuda, Y., Shimoda, T., Uno, K., Tateishi, N., Furuya, S., Yagi, K., Suzuki, K., Fujita, S., 2008. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J. Neuroimmunol.* 204, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.08.003>
- Yu, S.-Y., Zuo, L.-J., Wang, F., Chen, Z.-J., Hu, Y., Wang, Y.-J., Wang, X.-M., Zhang, W., 2014. Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study. *BMC Neurol.* 14, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-14-113>
- Yun, S.P., Kam, T.-I., Panicker, N., Kim, SangMin, Oh, Y., Park, J.-S., Kwon, S.-H., Park, Y.J., Karuppagounder, S.S., Park, H., Kim, Sangjune, Oh, N., Kim, N.A., Lee, Saebom, Brahmachari, S., Mao, X., Lee, J.H., Kumar, M., An, D., Kang, S.-U., Lee, Y., Lee, K.C., Na, D.H., Kim, D., Lee, S.H., Roschke, V.V., Liddelow, S.A., Mari, Z., Barres, Ben.A., Dawson, V.L., Lee, Seulki, Dawson, T.M., Ko, H.S., 2018. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 24, 931–938. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
- Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., Manley, G.T., 2009. Role of Aquaporin-4 in Cerebral Edema and Stroke, in: *Aquaporins, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 159–170. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_7
- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A., 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zhan, J.S., Gao, K., Chai, R.C., Jia, X.H., Luo, D.P., Ge, G., Jiang, Y.W., Fung, Y.-W.W., Li, L., Yu, A.C.H., 2017. Astrocytes in Migration. *Neurochem. Res.* 42, 272–282. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2089-4>
- Zhang, G., Xia, Y., Wan, F., Ma, K., Guo, X., Kou, L., Yin, S., Han, C., Liu, L., Huang, J., Xiong, N., Wang, T., 2018. New Perspectives on Roles of Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 10, 370. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00370>

- Zhang, Q.-S., Heng, Y., Yuan, Y.-H., Chen, N.-H., 2017. Pathological α -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicol. Lett.* 265, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.002>
- Zhang, Wei, Dallas, S., Zhang, D., Guo, J.-P., Pang, H., Wilson, B., Miller, D.S., Chen, B., Zhang, Wanqin, McGeer, P.L., Hong, J.-S., Zhang, J., 2007. Microglial PHOX and Mac-1 are essential to the enhanced dopaminergic neurodegeneration elicited by A30P and A53T mutant alpha-synuclein. *Glia* 55, 1178–1188. <https://doi.org/10.1002/glia.20532>
- Zhao, Y., Perera, G., Takahashi-Fujigasaki, J., Mash, D.C., Vonsattel, J.P.G., Uchino, A., Hasegawa, K., Jeremy Nichols, R., Holton, J.L., Murayama, S., Dzamko, N., Halliday, G.M., 2018. Reduced LRRK2 in association with retromer dysfunction in post-mortem brain tissue from LRRK2 mutation carriers. *Brain* 141, 486–495. <https://doi.org/10.1093/brain/awx344>
- Zinnhardt, B., Viel, T., Wachsmuth, L., Vrachimis, A., Wagner, S., Breyholz, H.-J., Faust, A., Hermann, S., Kopka, K., Faber, C., Dollé, F., Pappata, S., Planas, A.M., Tavitian, B., Schäfers, M., Sorokin, L.M., Kuhlmann, M.T., Jacobs, A.H., 2015. Multimodal imaging reveals temporal and spatial microglia and matrix metalloproteinase activity after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1711–1721. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.149>
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., Carmignoto, G., 2003. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>

