

Tese de Doutorado



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

DELSON JOSÉ DA SILVA

**NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON:
AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS VIA *TOLL LIKE*
RECEPTORS EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO**

**Goiânia
2014**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Delson José da Silva		
E-mail:	delsonjsilva@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Técnico Administrativo – Médico – HC/UFG		
Agência de fomento:	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	FAPEG
País:	Brasil	UF: GO	CNPJ: 08.156.102/0001-02
Título:	Neuroinflamação na doença de Parkinson: avaliação de citocinas induzidas via <i>Toll like receptors</i> em células do sangue periférico		
Palavras-chave:	Doença de Parkinson. TLR2. TLR7/8. Monócitos. Citocinas		
Título em outra língua:	Nueroinflammation in Parkinson´s disease: evaluation of cytockines induced via Toll like receptors in cells of peripheral blood		
Palavras-chave em outra língua:	Parkinson´s disease. TLR2. TLR7/8. Monocytes. Cytokines		
Área de concentração:	Doenças Infecciosas e Parasitárias		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/08/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP/UFG.		
Orientador (a):	Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias		
E-mail:	fatimardias@gmail.com		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 02/03/2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

DELSON JOSÉ DA SILVA

**NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON:
AVALIAÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDAS VIA *TOLL LIKE*
RECEPTORS EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias

**Goiânia
2014**

S585n Silva, Delson José da.
Neuroinflamação na doença de Parkinson :
avaliação de citocinas induzidas via Toll Like Re-
ceptors em células do sangue periférico / Delson
José da Silva. – Goiânia : [s. n.], 2014.
106 p.

Dissertação (Doutorado) – Universidade Fede-
ral de Goiás, 2014.

Referências bibliográficas

1. Doença de Parkinson. 2. Doença de Parkin-
son - neuroinflamação. I. Título.

CDU 616.8

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da
Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE
DOUTORADO**

Aluno(a): DELSON JOSÉ DA SILVA

Orientador(a): PROFA. DRA. FÁTIMA RIBEIRO DIAS

Membros:

- 1. Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias**
- 2. Prof. Antônio Lúcio Teixeira**
- 3. Prof. Dr. Osvaldo Vilela Filho**
- 4. Profa. Dra. Araci Hoffmann Pfrimer**
- 5. Prof. Dr. Paulo César Ragazzo**

Suplentes:

- 1. Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros**
- 2. Profa. Dra. Adriana Oliveira Guilard**
- 3. Prof. Dr. José Edison da Silva Cavalcante**
- 4. Prof. Dra. Miriam Leandro Dorta**

Data: 29/08/2014

*Dedico este trabalho aos pacientes com doença de Parkinson
que voluntariamente aceitaram participar desta pesquisa.*

Todo meu respeito e consideração a eles.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus sem o qual jamais poderia alcançar todos os meus objetivos. A Ele toda honra, toda glória e todo louvor.

À Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias, que acreditou em mim, neste projeto, me acolheu de forma especial na condução e realização deste trabalho me proporcionando segurança e certeza da vitória. A você meu afetuoso e sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira que mesmo à distância, mas muito perto e com competência se dispôs a contribuir com seus ricos conhecimentos neste trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso que de forma expressiva participou com sua valiosa experiência.

Ao Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira que contribuiu com suas relevantes sugestões

À Arissa Felipe Borges por sua efetiva participação técnica na realização deste trabalho

Ao Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho por sua contribuição na revisão de literatura.

Às Profas. Dras. Miriam Leandro Dorta, Priscila Oliveira Souza, Patrícia Reis de Souza, que contribuíram para realização da pesquisa.

À Mayara Kelly Alves Ribeiro pelo auxílio na avaliação dos paciente, à Pollyana Goularte Mesquita pela coleta de material, à Rosilene Ferreira da Silva e Marilda Aparecida do Nascimento Souza pelo agendamento e orientação aos pacientes.

Ao Prof. Dr. José Edison Cavalcante pela sua amizade e motivação na busca de novos conhecimentos durante ao longo de vários anos.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Vilela Filho pela amizade, incentivo, apoio e parceria em pesquisas.

À Tereza Raquel, minha amada esposa, companheira, cúmplice, fiel ajudadora na minha caminhada, sem a qual seria difícil alcançar meus objetivos.

Às minhas filhas Sarah Raquel e Ana Lídia pelo amor, compreensão das ausências, incentivo e apoio.

Aos meus pais Dorcy José da Silva (in memorian) e Nair Correia da Silva por conduzir minha vida na presença de Deus com amor, ética e moral.

À minha irmã Marlene (in memorian) por te se doado com muito amor durante toda a minha vida o que me proporcionou segurança para chegar até aqui. Aos meus irmãos Davidson, Donaldo e Deuler por me apoiarem sempre.

Enfim, a todos os meus amigos que trilharam comigo nesta árdua jornada...

SUMÁRIO

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (ARTIGO 2).....	17
3. METODOLOGIA (ARTIGO 2).....	18
3.1 DESENHO DO ESTUDO, PACIENTES E CONTROLES.....	18
3.1.1 Critérios de inclusão	18
3.1.2 Critérios de exclusão	19
3.2 COLETA DO SANGUE.....	20
3.3 LEUCOMETRIA	20
3.4 HEMOCULTURAS COM AGONISTAS DE TLR	20
3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO - CBA.....	21
3.6 ANÁLISES DOS MONÓCITOS E EXPRESSÃO DE TLR2 E TLR4	21
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22

4. RESULTADOS	23
4.1 CAPÍTULO 1: ARTIGO 1 - NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON	23
4.2 CAPÍTULO 2: ARTIGO 2 - <i>DECREASED TOLL-LIKE RECEPTOR 2 (TLR2)-INDUCED CYTOKINES IN PARKINSON DISEASE'S PATIENTS BLOOD CULTURES</i>	55
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS.....	96
Anexo A: Protocolo CEP/UFG	97
Anexo B: TCLE - Pacientes e Controles	98
Anexo C: Escalas UPDRS e HY	101
Anexo D: Portaria 2.712/2013	102
Anexo E: Comprovante de Publicação Artigo 1	103
Anexo F: Comprovante de Submissão do Artigo 2	105

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BHE	Barreira hematoencefálica
CBA	<i>Cytometer bead array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CerMovi	Centro de Referência em Transtorno do Movimento
COX	Cicloxigenase
CpG DNA	Motivos guanosina-citosina não metilados do DNA
LCR	Líquido céfalo-raquidiano
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAMP	<i>Damage - associated molecular pattern</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DP	Doença de Parkinson
6-HDA	6-Hidroxidopamina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
H&Y	<i>Hoehn & Yahr scale</i>
IINEURO	Instituto Integrado de Neurociências
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INGOH	Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LCR	Líquido cerebro-raquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo

LRRK	<i>Leucine-rich repeat kinase</i>
M-CSF	<i>Monocyte-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
Pam3Cys	<i>N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered-saline</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SNC	Sistema nervoso central
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
vs	<i>Versus</i>

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção neurodegenerativa que ocorre devido à perda neuronal na substância negra, produtora de dopamina. Evidências sugerem que várias citocinas inflamatórias estão aumentadas no cérebro e no sangue de pacientes com DP. Essas citocinas podem ser induzidas por ativação dos receptores similares a *Toll* (*Toll-like receptors*, TLR). No sangue periférico, os monócitos expressam TLR e podem participar na imunopatogenia de doenças neurodegenerativas. Os objetivos deste trabalho foram: realizar uma revisão de literatura sobre neuroinflamação na DP; avaliar possíveis alterações na produção de citocinas inflamatórias em hemoculturas de pacientes com DP ativada por agonistas de TLR; avaliar as porcentagens das duas principais subpopulações de monócitos e a expressão de TLR2 e TLR4 nestas subpopulações no sangue periférico de pacientes com DP. Foram avaliados 31 pacientes com DP e 31 indivíduos saudáveis, pareados por gênero e idade, sendo os pacientes avaliados quanto à gravidade dos sintomas neurológicos e psiquiátricos utilizando-se as escalas H&Y (*Hoehn & Yahr scale*) e UPDRS (*Unified Parkinson's Disease Rating Scale*). As hemoculturas foram ativadas com agonistas de TLR2 (Pam₃Cys), TLR4 (LPS) ou TLR7/8 (R848). As citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12p70 e IL-10) foram quantificadas no soro e nos sobrenadantes das culturas utilizando citometria (*Cytometer bead array*). Os monócitos (CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺) e a expressão de TLR2 e TLR4 nestes foram identificados por citometria de fluxo. As concentrações de citocinas nos soros de pacientes e controles foram similares e não houve

associação significativa entre as concentrações das citocinas e os escores da UPDRS. No entanto, após ativação das hemoculturas dos pacientes, foi observada significativa resposta diminuída aos agonistas de TLR2 (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10) e de TLR7/8 (IL-6). Não foi observada correlação entre as concentrações de citocinas induzidas pelos agonistas de TLR2 ou de TLR7/8 e os escores de UPDRS. As porcentagens dos monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ não diferiram significativamente entre os pacientes e os controles, e não foram detectadas alterações nas expressões de TLR2 ou TLR4 nestas subpopulações de monócitos nos pacientes. Os resultados indicam que os leucócitos, especialmente os monócitos, de pacientes com DP apresentam diminuída capacidade de resposta à ativação via TLR2. Essa diminuição pode estar associada à ativação prévia de TLR2 *in vivo*, tornando as células tolerantes a novos estímulos *ex vivo*. Avaliar a ativação de monócitos no sangue periférico, via TLR, pode auxiliar na avaliação do processo neurodegenerativo/neuroinflamatório na DP, contribuindo para a melhor compreensão da patofisiologia desta doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. TLR2. TLR7/8. Monócitos. Citocinas.

NEUROINFLAMMATION IN PARKINSON'S DISEASE: EVALUATION OF CYTOKINES INDUCED VIA TOLL LIKE RECEPTORS IN CELLS OF PERIPHERAL BLOOD

Parkinson's disease (PD) is as a neurodegenerative disorder caused by neuron loss in the substantia nigra, which produces dopamine. Evidences suggest that several inflammatory cytokines are enhanced in the brain and blood of patients presenting with PD. These cytokines might be induced by Toll-like receptor (TLR) activation. In peripheral blood, monocytes express TLR and may participate in the immunopathogenicity of neurodegenerative diseases. The objectives of this work were: carry out a literature review about neuroinflammation in PD; assess possible alterations in production of inflammatory cytokines in blood cultures of patients presenting with PD activated by TLR agonists; evaluate the percentages of the two main monocyte subpopulations, as well as TLR2 and TLR4 expression in these subpopulations in peripheral blood of patients presenting with PD. Patients presenting with PD (n = 31) and healthy individuals (n = 31), matched by gender and age, were evaluated and the patients were assessed regarding the severity of their neurological and psychiatric symptoms using the Hoehn & Yahr scale (H&Y) and the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS). Blood cultures were activated with TLR2 agonists (Pam₃Cys), TLR4 (LPS), or TLR7/8 (R848). Cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12p70, and IL-10) were

quantified in the serum and supernatant of blood cultures using Cytometer bead array. Monocytes (CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺) and TLR2 and TLR4 expression were identified using flow cytometry. Cytokine concentrations in the serum of patients and controls were similar and no significant association was found between cytokine concentrations and UPDRS scores. However, after activation of blood cultures of patients, a significant decreased response to TLR2 (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10) and TLR7/8 (IL-6) agonists was observed. No correlation was observed between the concentrations of cytokines induced by TLR2 or TLR7/8 agonists and UPDRS scores. The percentages of monocytes CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ did not significantly differ between patients and controls, and no alterations in TLR2 or TLR4 expressions were detected in these monocyte subpopulations in patients. The results indicate that leukocytes, especially monocytes, of patients presenting with PD show decreased capacity to respond to the activation via TLR2. This decrease may be associated with the previous activation of TLR2 *in vivo*, making the cells tolerant to new stimuli *ex vivo*. Assessing the activation of monocytes in peripheral blood, via TLR, may help the evaluation of the neurodegenerative/neuroinflammatory process in PD, contributing to a better understanding of the pathophysiology of this disease.

Keywords: Parkinson's disease. TLR2. TLR7/8. Monocytes. Cytokines.

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção neurodegenerativa, de causa ainda desconhecida, que ocorre devido a perda de neurônios na substância negra produtora de dopamina. É caracterizada pela presença de sintomas evolutivos que podem levar a incapacitação funcional e ao comprometimento da qualidade de vida do indivíduo, devido à combinação dos seguintes sinais e sintomas: bradicinesia (lentidão dos movimentos), tremor de repouso, rigidez e alterações posturais, que são considerados cardinais da DP. Sintomas não motores tais como distúrbios cognitivos, psiquiátricos, sensitivos, sensoriais e outros acompanham a doença (Verbaan et al., 2007; Lees, 2009). A natureza progressiva da DP implica uma rede de interações entre vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, predisposição genética e fatores tóxicos ambientais. Uma vez iniciado o processo neurodegenerativo pelos fatores causais, uma cascata de eventos secundários deletérios provocaria as alterações neuroquímicas observadas nos pacientes com DP (Hirsch et al., 2013).

Recentemente, os fatores neuroinflamatórios têm sido abordados como possíveis promotores da neurodegeneração nigral dopaminérgica, devendo os mesmos ser avaliados dentro de um conceito multifatorial na etiopatogenia da DP. A micróglia, célula da imunidade natural presente no Sistema Nervoso Central (SNC), pode ser ativada não somente por microrganismos ou seus produtos durante infecções no SNC, mas também pode ser ativada por estes microrganismos e seus produtos durante infecções sistêmicas (Orr et al, 2002;

Heneka et al., 2010). Células do sangue periférico, ativadas ou não, podem ter acesso ao SNC, como os monócitos, os quais se diferenciam em macrófagos e contribuem para o processo neuroinflamatório (Zozulya et al., 2010). Nos tecidos ou no sangue periférico, as células ativadas por agonistas de *toll-like receptors* (TLR), sendo estes agonistas endógenos ou exógenos, produzem citocinas pro e anti-inflamatórias, cujo desequilíbrio pode levar a um processo inflamatório crônico (Cross et al., 2010; Noelker et al., 2013).

Avaliar o perfil de citocinas em hemoculturas, após ativação com agonistas de TLR, permite uma definição do estado funcional de leucócitos no sangue periférico. A alterada produção de citocinas frente a algum agonista de TLR pode ser devida às alterações nas subpopulações de monócitos, as quais podem expressar quantidades diferentes de vários TLR; na expressão de um determinado TLR nos monócitos; ou alterações nas vias de sinalização acionadas pelos TLR nestas células. As alterações periféricas podem ser decorrentes do processo neuroinflamatório, indicando, portanto, mecanismos centrais ou periféricos que devam ser avaliados para uma melhor compreensão da etiopatogenia da DP. Uma combinação de possíveis fatores ambientais, tais como produtos microbianos, agindo em TLR nos monócitos, somados a uma suscetibilidade genética para fortes respostas inatas inflamatórias que atinjam o SNC, pode agravar a DP. A realização do presente estudo, o qual consiste na avaliação do perfil de citocinas induzidas por agonistas de TLR em células do sangue periférico, avaliação de subpopulações de monócitos e a expressão de TLR2 e TLR4 nestas células, permitirá um maior conhecimento da etiopatogenia da DP, podendo contribuir, posteriormente, para novas perspectivas na prevenção e tratamento da DP.

A DP é a segunda mais prevalente doença neurodegenerativa da terceira idade, sendo progressiva, incapacitante e geradora de altos custos para o sistema de saúde. É cada vez mais importante, portanto, conhecer esta doença que constitui um dos problemas de saúde pública do idoso.

Assim, com o propósito de aprofundar conhecimentos sobre fatores etiopatogênicos da DP, neste estudo foi realizada uma revisão da literatura, incluindo temas como doença de Parkinson, neuroinflamação, *Toll-like receptors* e monócitos na DP (Capítulo 1); e uma avaliação do perfil de citocinas da imunidade inata induzidas por diferentes agonistas de TLR, bem como das subpopulações de monócitos de pacientes com DP (Capítulo 2).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

– Realizar uma revisão sobre neuroinflamação, monócitos e TLR na DP (Artigo 1)

– Avaliar a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias no soro e em hemoculturas de pacientes com DP ativadas com diferentes agonistas de TLR; e avaliar as subpopulações de monócitos e a expressão de TLR2 e TLR4 nestas células de pacientes com DP (Artigo 2)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (ARTIGO 2)

– Avaliar as concentrações de citocinas TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12p70 presentes no soro e em hemoculturas de pacientes com DP e controles sadios, após ativação com agonistas dos receptores TLR2, TLR4 e TLR7/8.

– Avaliar as porcentagens das subpopulações de monócitos CD14⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺ no sangue periférico de pacientes com DP e controles sadios.

– Avaliar a expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos do sangue periférico de pacientes com DP e em indivíduos sadios.

– Avaliar a gravidade da doença por meio da escala UPDRS e correlacionar os resultados com as concentrações de citocinas.

3. METODOLOGIA (ARTIGO 2)

3.1 DESENHO DO ESTUDO, PACIENTES E CONTROLES

Trata-se de um estudo transversal que incluiu pacientes com DP, assistidos no Núcleo de Neurociências do Hospital das Clínicas da UFG e no Instituto Integrado de Neurociências - IINEURO, Goiânia, Goiás. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, protocolo nº 092/2011 (Anexo A).

A amostra foi constituída de 31 pacientes com DP e 31 indivíduos sadios voluntários. Os pacientes foram acompanhados no Centro de Referência em Transtornos do Movimento - CerMovi do Núcleo de Neurociências do Hospital das Clínicas da UFG e no Instituto Integrado de Neurociências - IINEURO, clínica privada. Os controles foram doadores de sangue do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH). Pacientes e controles que preencheram os critérios de inclusão e aceitaram o convite para participar do estudo voluntariamente, participaram da pesquisa após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo B).

3.1.1 Critérios de inclusão

– Pacientes de ambos os gêneros, com idade entre 20 e 70 anos, com diagnóstico de DP pelo critério do Banco de Cérebro de Londres (Litvan et al, 2003), avaliados pelas escalas: Unificada da Doença de Parkinson

(UPDRS) (Lang & Fahn, 1989) e Hoen & Yahar (Hoen & Yahar, 1967) (Anexo C). Controles sadios, de ambos os gêneros, com idade entre 20 e 70 anos, doadores de sangue do INGOH, que obedeceram todos os critérios da Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União nº 221, de 13 de novembro de 2013, Seção 1, página 106 (Anexo D) que redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos [brevemente, indivíduo com aparência sadia à ectoscopia; peso corporal acima de 50 Kg; aferição do pulso mostrando de 50 a 100 batimentos por minuto; aferição da pressão arterial < 100 mmHg (diastólica) e < 180 mmHg (sistólica); dosagem de hemoglobina/hematócrito com valores mínimos aceitáveis do nível de: mulheres: Hb = 12,5g/dL ou Ht = 38%; e homens: Hb = 13,0g/dL ou Ht = 39%; temperatura corpórea inferior a 37°C; ausência de história médica de doenças que levem à inaptidão definitiva ou temporária de doação de sangue (anexos I e II da presente portaria); não uso de medicações que possam interferir com funções celulares ou fatores sanguíneos, incluindo aspirina e outros antiinflamatórios (anexo III da presente resolução)].

3.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes que apresentem parkinsonismo secundário e/ou atípico, bem como sujeitos portadores de infecção aguda e/ou crônica.
- Pacientes que apresentaram alterações sugestivas de infecção e/ou inflamação, avaliados pelo hemograma, velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR).
- Pacientes ou controles que estavam fazendo uso de medicação antiinflamatória.

3.2 COLHEITA DO SANGUE

O sangue (5 mL), de pacientes e controles, foi colhido em tubos contendo heparina (Vacuette, Greiner Bio-one, Americana, SP, Brasil), para leucometria, identificação de monócitos e TLR e hemoculturas. Ainda, 5 mL foram colhidos em tubos sem anticoagulante, para a separação de soro. Após ~1 h, temperatura ambiente, o sangue foi centrifugado (500 g, 5 min, 4°C) e o soro foi colhido, aliquotado e estocado a -80° C, até o momento da dosagem de citocinas.

3.3 LEUCOMETRIA

Uma alíquota de sangue dos pacientes e controles foi diluída em líquido de Turk (1/20) e os leucócitos foram quantificados em hematocitômetro. Os resultados foram expressos em leucócitos/mm³.

3.4 HEMOCULTURAS COM AGONISTAS DE TLR

O sangue de pacientes e controles foi diluído 1:2 em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO, EUA). O meio RPMI 1640 foi suplementado com Heps 10 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomina 100 µg/L, 11 mM de bicarbonato de sódio e 2 mM de L-glutamina (todos os reagentes Sigma). O sangue diluído foi distribuído em tubos de fundo cônico (capacidade 2 mL; Axygen Scientific Inc., Union City, CA, EUA), livres de Dnase, Rnase e endotoxinas). As hemoculturas foram incubadas na ausência ou presença de lipopolissacarídeo (LPS), agonista de TLR4 (*E. Coli*, sorotipo

0111:B4, Sigma), na concentração de 100 ng/mL; Pam3Cys SKKKK, agonista de TLR2 (EMC, Tübingen, Baden-Württemberg, Alemanha), na concentração de 100 ng/mL; ou de R848, agonista de TLR7/8 (Invivogen, San Diego, CA, EUA), na concentração de 100 ng/mL. Os tubos, contendo um volume final de 0,8 mL, em duplicatas, foram fechados e incubados, sob agitação leve, a 37°C (em um termobloco Mixing Block MB-101, Bioer, Hangzhou, China). Após 24 h de incubação, o sangue foi centrifugado (3 min, 90 g) e o sobrenadante foi colhido e congelado a -80°C, até o momento da dosagem das citocinas, pelo ensaio descrito a seguir (Item 3.5).

3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO - CBA

As citocinas foram quantificadas nos soros e sobrenadantes das culturas, de pacientes e controles, usando kits CBA de inflamação (*Human Inflammatory Cytokines Kit*: IL-8, IL-1, IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70 - Catálogo 551811, Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, BD, San Diego, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.6 ANÁLISES DOS MONÓCITOS E EXPRESSÃO DE TLR2 E TLR4

O sangue do paciente e seu respectivo controle, foi incubado na ausência ou presença de anticorpos monoclonais anti-CD14 (PE, clone M5E2, BioLegend, San Diego, CA, EUA), anti-CD16 (PE/Cy5, clone 3G8, BioLegend), anti-TLR2 (FITC, clone TLR2.1, eBioscience, San Diego, CA, EUA) e anti-TLR4 (Alexa Fluor 488, clone HTA 125, eBioscience) por 30 min.,

temperatura ambiente. Os anticorpos anti-CD16 foram do clone 3G8, para facilitar a exclusão de neutrófilos CD16⁺ (Heimbeck et al., 2010). Em seguida, os eritrócitos foram rompidos com 2 mL de solução de lise (BioLegend) por 15 min., a 4°C. As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,3 (PBS; 500 g, 5 min, 4°C), fixadas com solução de PBS-paraformaldeído 4% (15 min, temperatura ambiente). Para completar a lise dos eritrócitos, foi utilizada uma solução de saponina a 0,3% (15 min, temperatura ambiente). Após este período as células foram lavadas com PBS (salina tamponada com fosfatos) e ressuspendidas em solução de PBS-paraformaldeído 1% (200 uL). A aquisição foi realizada em citômetro Accuri C6 (BD). Foram adquiridos 50.000 eventos totais, baseados em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e 5.000 eventos da população CD14⁺. A análise dos dados foi realizada no programa Flow Cytometry Software (FCS) versão 4 (DNS, Los Angeles, CA, EUA).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de citocinas e expressão de CD14, CD16 e TLR (porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência) foram apresentados como valores individuais, medianas (mínimo e máximo) ou interquartis (25% - 75%), sendo comparados por meio do teste de Mann Whitney para amostras independentes e teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Para estudos de correlação, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Foi utilizado o Graph Pad PRISM software versão 4.0 (San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4.1 CAPÍTULO 1: ARTIGO 1 - NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

Manuscrito escrito e publicado de acordo com as normas da revista *Latin American Multiple Sclerosis Journal* - Silva DJ, Alcântara-silva TR, Sobrinho HMR, Oliveira MAP, Ribeiro-dias F. Neuroinflamação na Doença de Parkinson. LAMSJ. 2013; 2 (4): 178-186 -http://www.lamsj.org/detalhe_artigo.asp?id=94 (Anexo E)

A Neuroinflamação na Doença de Parkinson

The Neuroinflammation in Parkinson's disease

La neuroinflamación en la enfermedad de Parkinson

Delson José da Silva^{1*}, Tereza Raquel Alcântara-Silva², Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho³, Milton Adriano Pelli de Oliveira⁴, Fátima Ribeiro-Dias⁵

1. Mestre e Doutorando em Medicina Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás. Coordenador do Núcleo de Neurociências da Universidade Federal de Goiás, Diretor Técnico do Instituto Integrado de Neurociências.

2. Professora Doutora em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás e Coordenadora do curso de Musicoterapia

da Escola de Música e Artes Cênicas/Universidade Federal de Goiás (EMAC/UFG).

3. Professor Mestre do Departamento de Medicina da PUC Goiás. Doutorando em Medicina Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás.

4. Professor Doutor em Imunologia. Orientador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro/Universidade Federal de Goiás.

5. Professora Doutora em Imunologia. Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás.

*Correspondência: Rua T-38, nº 1097, apto 101 - Setor Bueno - CEP: 74.223-045 - Goiânia - Goiás - Brasil. E-mail: delsonjsilva@gmail.com

Resumo:

Introdução: Estudos genéticos e epidemiológicos têm destacado o papel da neuroinflamação na fisiopatologia da doença de Parkinson (DP). Além disso, estudos pós-morte confirmam o envolvimento de elementos do sistema imune inato, bem como do adquirido, afetando regiões cerebrais de pacientes com DP. A ativação da micróglia tem sido detectada na substância negra destes pacientes, concomitantemente com o aumento da expressão de diferentes mediadores proinflamatórios. **Objetivo:** Nesta revisão, os autores investigaram

o envolvimento de elementos constituintes da imunidade inata na etiopatogenia da DP, ressaltando-se, principalmente, o papel da micróglia no processo de neuroinflamação. **Método:** A pesquisa bibliográfica foi realizada no período de agosto a dezembro de 2013, nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS, utilizando-se, isoladamente ou em combinação, os seguintes descritores em inglês: “Parkinson’s disease”, “neuroinflammation”, “microglia”, “toll-like receptors”, “cytokines”. **Resultados:** Foram selecionadas e analisadas 97 referências que apresentavam conteúdos que contribuíram para o cumprimento do objetivo proposto, reforçando o embasamento teórico-conceitual do assunto em questão. A presente revisão permite ressaltar que o processo de neuroinflamação está associado à morte de neurônios dopaminérgicos, sendo, provavelmente, um dos principais fatores indutores da neurodegeneração na DP. **Conclusões:** No sangue periférico ou nos tecidos, as células ativadas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou a danos teciduais (DAMPs), via receptores similares a Toll (TLR), produzem mediadores pro- e anti-inflamatórios, cujo desequilíbrio pode levar a um processo inflamatório crônico. O desequilíbrio ou a desregulação dos elementos envolvidos na neuroinflamação podem sustentar a progressão deste processo, perpetuando os eventos deletérios que favorecem a neurodegeneração na DP. Uma combinação de possíveis fatores ambientais, tais como produtos microbianos, agindo em diferentes TLR expressos na micróglia e nos leucócitos, somada a uma suscetibilidade genética para fortes respostas inatas inflamatórias que atinjam o sistema nervoso central (SNC), pode desencadear ou agravar a DP. Em pacientes com DP, a avaliação da expressão dos TLR, nas células do SNC e nos leucócitos, especialmente nos monócitos, e do perfil de citocinas induzidas por agonistas destes receptores, permitirá maior conhecimento da

etiopatogenia desta doença, podendo contribuir, posteriormente, para novas perspectivas em prevenção e tratamento da DP.

Palavras-chave: Parkinson's disease, Neuroinflammation, Microglia, Toll-like receptors, Cytokines, Monocytes.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho.

Abstract

Introduction: Genetic and epidemiological studies have highlighted the role of neuroinflammation on the physiopathogenesis of Parkinson's disease (PD). Additionally, post-mortem studies have confirmed the involvement of the elements of the innate immune system, as well as the acquired immune system, affecting cerebral regions of PD patients. The activation of the microglia in the substantia nigra of these patients and the concurrent increased expression of different proinflammatory mediators have been detected. **Objective:** In this review, the authors investigated the involvement of the elements of the innate immune system in the etiopathogenicity of PD, mainly the role of microglia in neuroinflammatory processes. **Method:** The literature review was carried out from August to December 2013, searching on PubMed, SciELO, and LILACS databases, using isolatedly or in combination the following descriptors: "Parkinson's disease", "neuroinflammation", "microglia", "Toll-like receptors", "cytokines". **Results:** The authors selected and analyzed 87 references presenting contents that contributed to achieve the objective proposed, reinforcing the theoretical-conceptual foundations of the subject under study. According to the findings of the present review, the neuroinflammatory process

is associated with the death of dopaminergic neurons, and is probably one of the main factors which induce neurodegeneration in PD. **Conclusions:** In peripheral blood or tissues, the cells activated by pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs) and/or tissue damage (DAMPs), via Toll-like receptors (TLR), produce pro and anti-inflammatory mediators, and their imbalance may lead to a chronic inflammatory process. The imbalance or deregulation of the elements involved in neuroinflammation may maintain the progression of this process, perpetuating the deleterious events which favor neurodegeneration in PD. A combination of possible environmental factors, such as microbial products, acting on different TLR expressed in microglia and leukocytes, added to a genetic susceptibility for strong innate inflammatory responses which reach the central nervous system (CNS), may trigger or aggravate PD. In PD patients, the assessment of TLR expression, both in CNS cells and leukocytes, especially monocytes, as well as the profile of cytokines induced by the agonists of these receptors, may help produce more knowledge of the etiopathogenicity of this disease, and posteriorly contribute to the generation of new possibilities for the prevention and treatment of PD.

Keywords: Parkinson's disease, Neuroinflammation, Microglia, Toll-like receptors, Cytokines, Monocytes.

The authors declare no conflict of interest in conducting this work

Resumen

Introducción: Estudios genéticos y epidemiológicos han destacado el papel de la neuroinflamación en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (EP). Además, estudios pos mortem confirman el involucramiento del sistema

inmune innato, así como del adquirido, afectando regiones cerebrales de pacientes con EP. La activación de la microglia ha sido detectada en la sustancia negra de estos pacientes, concomitante con el aumento de la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios. **Objetivo:** En esta revisión, los autores investigaron el desarrollo de elementos constitutivos de la inmunidad innata en la etiopatogenia de la EP, resaltando, principalmente, el papel de la microglia en el proceso de neuroinflamación. **Método:** La investigación bibliográfica fue realizada en el período de agosto a diciembre de 2013, en las bases de datos PubMed, SciELO e LILACS, utilizándose, aisladamente o en combinación, los siguientes descriptores en inglés: “Parkinson’s disease”, “neuroinflammation”, “microglia”, “toll-like receptors”, “cytokines”. **Resultados:** Fueron seleccionadas y analizadas 97 referencias que presentaban contenidos que contribuyeron para la realización del objetivo propuesto, reforzando el aporte teórico-conceptual del tema en cuestión. La presente revisión permite resaltar que el proceso de neuroinflamación está asociado a la muerte de las neuronas dopaminérgicas, probablemente, uno de los principales factores inductores de la neurodegeneración en la EP. **Conclusiones:** En la sangre periférica o en los tejidos, las células activadas por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o a patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMPs), vía receptores tipo Toll (TLR), producen mediadores pro - y antiinflamatorios, cuyo desequilibrio puede llevar a un proceso inflamatorio crónico. El desequilibrio o el desajuste de los elementos involucrados en la neuroinflamación pueden sostener la progresión de este proceso, perpetuando los eventos deletéreos que favorecen a la neurodegeneración en la EP. Un ajuste de posibles factores ambientales, como productos microbianos, actuando en distintos TLR expresos en la

microglia y en los leucocitos, que se suman a una susceptibilidad genética para fuertes respuestas innatas inflamatorias que atinjan el sistema nervioso central (SNC), puede desencadenar o agravar la EP. En pacientes con EP, la evaluación de la expresión de los TLR en las células del SNC y en los leucocitos, especialmente en los monocitos, y del perfil de citocinas inducidas por agonistas de estos receptores, permitirá mayor conocimiento de la etiopatogenia de esta enfermedad, pudiendo contribuir, posteriormente, para nuevas perspectivas en la prevención y tratamiento de la EP.

Palabras-clave: Parkinson's disease, Neuroinflammation, Microglia, Toll-like receptors, Cytokines, Monocytes.

Los autores declaran no tener conflicto de interés en este trabajo.

Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção neurodegenerativa de etiologia ainda desconhecida que afeta os gânglios da base, provocando a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, na substância negra (*pars compacta*) no mesencéfalo. Bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e alterações posturais são caracterizados como sinais cardinais da DP. Pode apresentar sintomas não motores como cognitivos, psiquiátricos, sensitivos, sensoriais e outros, podendo levar à incapacidade funcional e comprometimento da qualidade de vida.^{1,2} Compreender os mecanismos etiopatogênicos envolvidos no processo de neurodegeneração na DP é de suma importância para elucidação dos eventos relacionados com a destruição neuronal nesta doença. Ainda, é relevante para o desenvolvimento de terapias para diminuir a progressão da doença, aumentar a expectativa de vida e

melhorar a qualidade de vida do paciente. Em função da complexidade da doença e da necessidade de ampliar os conhecimentos, principalmente sobre a etiopatogenia, objetivamos realizar uma revisão com enfoque, principalmente, no aspecto da neuroinflamação na DP.

O papel da neuroinflamação na etiopatogenia da DP

Quanto a etiopatogenia, algumas hipóteses foram postuladas em relação às possíveis causas da degeneração neuronal em pacientes com DP que incluem, basicamente, a associação entre fatores genéticos e fatores ambientais (agentes infecciosos e substâncias neurotóxicas).³

No contexto de uma predisposição genética, ressalta-se que a forma familiar da DP é rara e está associada a mutações gênicas, pois a maioria dos casos (> 90%) é considerada doença de natureza esporádica.⁴ Mutações de genes (*parkin* e α -sinucleína, p.ex.) têm sido identificadas em alguns casos de DP familiar, sugerindo que elas podem desempenhar um papel importante nesta doença.⁵ Os insultos ambientais decorrentes da exposição do indivíduo a substâncias tóxicas (pesticidas, herbicidas, produtos petroquímicos, alguns metais pesados, etc.) e a certos agentes infecciosos tais como, vírus e bactérias, podem causar lesão neuronal e neuroinflamação, associadas ao processo neurodegenerativo da DP.^{4,5,6,7,8}

Alguns agentes infecciosos estão, possivelmente, associados à etiopatogenia da DP, principalmente vírus como Epstein Barr, influenza, coronavírus e vírus da encefalite viral japonesa, assim como outros micro-organismos, tais como *Borrelia burgdorferi*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*.^{9,10,11,12,13} Todos estes agentes microbianos podem levar à morte neuronal

dopaminérgica na substância negra e, conseqüentemente, a sintomas parkinsonianos decorrentes da neurodegeneração.^{14,15,16}

Estudos experimentais e *post-mortem* sugerem que a inflamação está presente tanto em lesões agudas do sistema nervoso central (SNC) quanto em doenças neurodegenerativas.¹⁷ Os astrócitos e a micróglia são as principais células cerebrais envolvidas na neuroinflamação e morte neuronal dos neurônios dopaminérgicos. As células da glia correspondem a um eficiente sistema imune inato e assim, sob condições patológicas, a desregulação ou ativação glial excessiva pode resultar na neurodegeneração.^{7,18}

A natureza progressiva da DP implica, portanto, numa rede de fatores, tais como a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais aos insultos cerebrais, a predisposição genética a desenvolver disfunções neuronais (anormalidades mitocondriais, estresse oxidativo, alterações no sistema de degradação de proteínas, etc.) e a exposição do SNC a certos fatores ambientais. Uma vez que o processo neurodegenerativo foi iniciado pelos fatores causais, uma cascata de eventos secundários deletérios provoca alterações neuroquímicas e neurológicas observadas nos pacientes com DP.^{5,8,19,20}

A neuroinflamação na DP: O papel da micróglia e a participação dos mediadores proinflamatórios

A micróglia é uma célula que faz parte do sistema imune natural do cérebro. São macrófagos residentes que se originam de precursores da medula óssea vermelha. Na vida adulta, há uma contínua substituição da micróglia por estes precursores que muito lentamente infiltram o parênquima cerebral. A micróglia exerce um importante papel na imunovigilância do cérebro, mas

diferente dos macrófagos de tecidos periféricos, suas ações têm que ser finamente controladas para que a resposta inflamatória não seja danosa ao SNC. Por muito tempo, o cérebro foi considerado um sítio de privilégio imune, no qual a barreira hematoencefálica (BHE) exerceria uma função de proteção do SNC contra insultos periféricos e o sistema imune.²¹ No entanto, a micróglia exerce funções locais importantes na imunidade natural e na adquirida, funcionando como células inflamatórias e células apresentadoras de antígenos para linfócitos T ativados que infiltram o cérebro continuamente em baixos números. A micróglia é altamente sensível a qualquer perturbação no microambiente neuronal e sua ativação ocorre gradualmente, podendo voltar a qualquer momento ao estado de repouso, mediante suspensão do estímulo. Inicialmente, a micróglia ativada expressa vários receptores e moléculas de adesão, pode entrar em replicação aumentando em número, e, posteriormente, se o estímulo persistir, pode adquirir capacidade de célula apresentadora de antígenos, fagocítica e proinflamatória, por meio da secreção de citocinas e quimiocinas.¹⁴ Sob condições inflamatórias, citocinas e quimiocinas favorecem a entrada de leucócitos do sangue periférico no cérebro, especialmente linfócitos e monócitos.^{22,23} O desequilíbrio entre sinais pro e anti-inflamatórios pode favorecer um processo inflamatório crônico, com continuada ativação da micróglia, que nestas condições, além de produzir citocinas proinflamatórias [fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*); interleucina 1, 6, 8, (IL-1, IL-6, IL-8)], passa também a secretar reativos intermediários do oxigênio, óxido nítrico e prostaglandinas, todos tóxicos para os neurônios dopaminérgicos da substância negra. A neurodegeneração na DP pode, portanto, ser consequência da neuroinflamação mediada pela ativação da micróglia, o que vem sendo exaustivamente revisado por vários autores.^{4,14,19,20,24,25}

O aumento da expressão e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF, já foi encontrado no líquido cefalorraquidiano (LCR), soro e em cérebros de pacientes com DP, bem como um aumento dos receptores solúveis para o TNF no soro dos pacientes.^{21,26,27,28,29,30,31}

Em relação ao processo imuno-inflamatório na DP, Janeway & Travers (1994)³² referem alterações locais, com acúmulo de líquidos, plasma, proteínas e linfócitos, que são iniciadas por trauma, infecção ou outro fator agressor externo, conduzindo a uma resposta imune. Neste contexto, o processo inflamatório na DP é marcado pelo aumento dos níveis de citocinas no *striatum* e no LCR dos pacientes, quando comparando pacientes e indivíduos saudáveis.³² Além das várias citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-2, IL-6 e interferon gama - IFN- γ ,)^{33,34}, ativação de linfócitos T, citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10)^{27,35,36,37}, receptor CD23 para imunoglobulina E (IgE), enzimas como ciclooxigenase 2 (COX-2)³⁸, e óxido nítrico sintase induzida (iNOS, do inglês *inducible Nitric Oxide Synthase*)^{18,34,38,39}, produção de ânion superóxido⁴¹ receptor de complemento (CR3) e aumento de ferritina⁴² estão envolvidos nos mecanismos neuroinflamatórios da DP, associados à diminuição dos neurônios dopaminérgicos na DP.^{34,42,43} A produção de moléculas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e o fator transformador do crescimento β (TGF- β , do inglês *Transforming growth factor* β), deve controlar as ações da micróglia. Estudos em animais e em culturas de células demonstraram um efeito neuroprotetor da IL-10 frente à ação tóxica do glutamato e à induzida por lipopolissacarídeo (LPS).^{44,45,46}

O LPS, uma endotoxina de bactéria Gram negativa, exacerba o parkinsonismo em modelo de DP em ratos. Em um estudo em roedores, Godoy et al (2008)⁴⁷ injetaram 6 – hidroxidopamina (6-HDA) (neurotoxina

que mata neurônios dopaminérgicos) no estriado destes animais, induzindo parkinsonismo nos mesmos. Subseqüentemente, injetaram LPS, em doses não tóxicas, na substância negra, ativando a micróglia, com conseqüente exacerbação do processo degenerativo da parte compacta da substância negra, causando piora dos sintomas parkinsonianos nos ratos. A piora foi associada a um aumento da secreção de IL-1 β pela micróglia, demonstrando que a injeção de LPS na parte compacta da substância negra de roedores produz uma forte resposta da micróglia, seguida da morte de células dopaminérgicas. Esta neurodegeneração, resultante da ativação da micróglia pelo LPS, é de quatro a oito vezes mais intensa na substância negra do que em outra região do cérebro.³⁴ Em experimentos animais, tratamentos que interferem diretamente na neuroinflamação causada pela ativação da micróglia, tais como os com inibidores de iNOS³⁹ e de ânion superóxido,⁴⁰ reduzem a morte celular induzida pelo LPS. Estes achados sustentam o conceito de que os insultos ambientais podem causar uma ativação prolongada da micróglia, induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, recrutamento de linfócitos e alterações do metabolismo celular.¹⁴

Evidências do aumento de várias citocinas inflamatórias, incluindo TNF, IL-6 e IL-1 β , no cérebro de pacientes com DP, em paralelo a um aumento da ativação da micróglia na substância negra, tem sido demonstradas. Tais alterações, juntamente com a participação do óxido nítrico, podem contribuir para o processo neurodegenerativo na DP.²⁷ Foi detectado um aumento da concentração da IL-6 também no sangue periférico de pacientes com DP que apresentavam comprometimento cognitivo, quando comparados com indivíduos saudáveis. Houve ainda, uma associação entre o aumento da IL-6 e a piora da fraqueza e da fadiga na DP, provavelmente, por aceleração do

catabolismo, levando à sarcopenia, o que resulta em alterações da marcha e da habilidade motora.⁴⁷ Em outro estudo, foi demonstrado um aumento de IL-6, IL-8 e IL-10 no plasma de pacientes com doença de Alzheimer (DA), sugerindo o envolvimento destas citocinas em processos neurodegenerativos.⁴⁸ Assim, não somente alterações locais no cérebro tem sido detectadas, mas também periféricamente, no sangue dos pacientes com DP. Infecções podem levar a uma resposta inflamatória sistêmica com produção de moléculas que atingem o cérebro dos pacientes com DP, por exemplo, as citocinas TNF e IL-1, que aumentam o tráfego de células para o SNC¹¹, incluindo o de monócitos do sangue.⁴⁹ Agentes infecciosos podem também atingir o cérebro e causar infecção local, ativando a micróglia, provocando inflamação e neurodegeneração, conseqüentemente o surgimento de sintomas parkinsonianos. Ainda, mesmo após a eliminação do agente infeccioso do cérebro, as manifestações neurológicas podem persistir.¹² Portanto, agentes infecciosos podem disparar neurodegeneração uma vez que tenham ultrapassado a BHE e ativem a micróglia, mas podem, também, por meio de infecção sistêmica, gerar insultos cerebrais que podem causar a neurodegeneração.

Os *Toll-like receptors* na DP

Os receptores similares a *Toll* (*Toll-like receptors* - TLR) são essenciais para o reconhecimento de moléculas associadas a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), bem como de substâncias endógenas produzidas ou liberadas em situações de dano tecidual (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*). Tais receptores consistem em um grupo de proteínas transmembrânicas presentes nas células da imunidade natural, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas

e polimorfonucleares. Os TLR medeiam a sinalização para a produção de citocinas pro e anti-inflamatórias, bem como para a produção de óxido nítrico,^{50,51} sendo que o TLR4 é um dos TLR mais bem estudados e o primeiro a ser descrito.⁵² O TLR2 e o TLR4 são importantes para a identificação de lipoproteínas de bactérias Gram positivas e LPS de bactérias Gram negativas, respectivamente. Já os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucléicos, como RNA de fita simples ou dupla e CpG DNA não metilado.^{53,54,55}

A micróglia expressa todos os TLR em baixa quantidade, porém, após ativação, a expressão destes receptores aumenta, ampliando a capacidade da micróglia em reconhecer e ser ativada pelos PAMPs ou DAMPs, gerando inflamação e, assim, exercendo sua função de imunovigilância no cérebro.⁵⁶

Neste modelo, a resposta imune inata induzida pelo LPS converte uma agressão por isquemia-hipóxia sem lesão aparente em lesão neuronal grave, sugerindo que uma infecção sistêmica pode agravar os sinais/sintomas da DP por ativação da imunidade natural no cérebro via TLR4. Em outro modelo experimental de DP, em camundongos lesionados com metilfenil tetrahidróxiperidina (MPTP), um produto tóxico para a substância negra mesencefálica produtora de dopamina, houve aumento da expressão do TLR4 na substância negra desses animais, sugerindo novamente que uma injúria inicial no cérebro pode depois ser ampliada pela resposta imune natural, ampliando a neurodegeneração dopaminérgica.^{58,59} Em modelo animal da DP, a inoculação de LPS, via endovenosa, induz ativação da BHE e lesão de neurônios do sistema nigroestriatal dopaminérgico, permitindo infiltração de monócitos e posterior neuroinflamação, evidenciando-se o importante envolvimento dos monócitos no processo inflamatório do SNC.⁶⁰ Os monócitos

apresentam expressão de vários tipos de TLR, como TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6, os quais são receptores para antígenos microbianos presentes na superfície celular e outros intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Estes receptores participam das vias de transdução de sinais bioquímicos que ativam genes envolvidos com a transcrição de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas, produzidos por monócitos.^{55,61,62}

Estudo recente demonstra que em camundongos tratados com MPTP, há um aumento da expressão de TLR4 nas micróglia destes animais e que camundongos deficientes na expressão de TLR4 são menos vulneráveis à intoxicação, neuroinflamação e perda neuronal no SNC induzidas pelo MPTP, sugerindo que a via de ativação celular por meio do TLR4 está envolvida na patogênese da DP experimental.⁶²

Além do TLR4, outros TLR participam na patogênese de doenças neurodegenerativas.^{63,64} Culturas de micróglia murina com peptidoglicana (produto bacteriano) mostram que a micróglia expressa TLR2 e é ativada via este receptor, produzindo citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF, IL-6) e expressando iNOS e COX-2.⁶⁵ Estes dados mostram que a ativação da micróglia via TLR2 pode causar neuroinflamação e, conseqüentemente, neurodegeneração. A α -sinucleína é uma proteína presente nos corpúsculos de Lewy, inclusões proteicas presentes nos neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP. A α -sinucleína pode ser liberada durante o processo de neurodegeneração. Trabalhos recentes mostram que a α -sinucleína é reconhecida por TLR2 expresso em monócitos humanos e micróglia de ratos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo, portanto, considerada um DAMP importante na etiopatogenia da DP.^{66,67,68} A ativação da micróglia por α -sinucleína via TLR2 ativa uma cascata de sinalização

intracelular que ocasiona, além da produção de citocinas, a expressão de TLR2 e a produção de quimiocinas, ROS e óxido nítrico, importantes mediadores da neuroinflamação.^{66,68} A Estudos mostram níveis elevados de α -sinucleína no plasma de pacientes com DP abrindo, desta forma, a possibilidade de estudos mostrando sua ligação com TLR nos monócitos dos pacientes.^{69,70}

Além do TLR2, o TLR4 também medeia a ativação da micróglia e de astrócitos murinos induzida por diferentes formas de α -sinucleína.^{71,72} Estes autores observaram que o TLR4 medeia a atividade fagocítica da micróglia, a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) e a produção de ROS induzidas por α -sinucleína. Portanto, acredita-se que a liberação de diferentes formas de α -sinucleína (agregadas, modificadas, monomérica, fibrilar), lançadas a partir, principalmente, da degeneração neuronal no SNC, atua como um gatilho endógeno para indução de fortes respostas inflamatórias na DP.

Também a possível participação de TLR9 no processo neuroinflamatório e neurodegenerativo tem sido mostrada em modelo experimental de DP. Injeção intracerebroventricular de DNA bacteriano (CpG DNA não metilado), em camundongos, provocou pronunciada resposta inflamatória, com ativação da micróglia e os animais apresentaram piora em sua memória espacial, demonstrando disfunção neurodegenerativa. Todavia, nos animais em que havia deficiência de expressão do TLR9 não houve alteração da memória, sugerindo a participação deste receptor na neurodegeneração.⁷³ Em modelo murino de DP induzida por MPTP foi demonstrado um aumento da expressão de TLR9 nos cérebros dos animais, bem como o TLR9 foi detectado no estriado de pacientes com DP em níveis mais elevados do que nos de indivíduos saudáveis.⁷⁴ Estes dados sugerem a participação do TLR9 na neuroinflamação

na DP. Ainda, a ativação de TLR3 no cérebro de ratos, mimetizando uma infecção viral não citopática no SNC, induz ativação do sistema imune inato no cérebro, sensibilizando os neurônios dopaminérgicos para lesões por estresse oxidativo. Estes dados apontam para uma possível participação deste receptor e os PAMPs por ele reconhecidos no processo neurodegenerativo da DP.⁷⁵

Monócitos na DP

Pouco se sabe sobre a participação de células periféricas no processo neuroinflamatório/neurodegenerativo da DP. No sangue circulante, dentre as células da imunidade natural, os monócitos têm acesso ao cérebro, especialmente durante processos inflamatórios.^{49,76,77} Estas células expressam vários TLR e após interação com PAMPs produzem citocinas, tanto pro quanto anti-inflamatórias, participando ativamente no processo inflamatório.^{55,78,79} Os monócitos migram para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas.⁸⁰ Em camundongos, foi demonstrada a diferenciação *in vivo* de monócitos em micróglia durante processos infecciosos.^{76,77} *In vitro*, os monócitos humanos podem ser diferenciados em células com características de micróglia.²⁵ Estes dados indicam os monócitos como importantes células da imunidade inata a serem avaliadas na DP.

No sangue periférico humano, distintas subpopulações de monócitos podem ser observadas. Inicialmente, foi descrito que os monócitos clássicos expressam a molécula CD14 em grande intensidade (CD14⁺⁺ ou CD14^{high}) e não expressam CD16 (CD16⁻), compreendendo cerca de 90% dos monócitos do sangue. Além destes, cerca de 10% dos monócitos expressam o CD14 e o CD16, identificando duas novas subpopulações, a CD14^{high} CD16⁺, denominados monócitos intermediários; e a CD14^{low}CD16⁺ ou monócitos não

clássicos.⁸¹ O CD14 é um co-receptor do TLR4, que é o receptor do LPS e o CD16 é o receptor de baixa afinidade para a imunoglobulina G (Fc β RIII). Um estudo demonstrou que polimorfismos do gene CD14 podem aumentar a predisposição de mulheres à DP.⁸² Os monócitos CD14^{low}CD16⁺ apresentam características fenotípicas e funcionais similares a macrófagos teciduais (macrófagos alveolares, micróglia), ou seja, são CD14^{low}CD11b^{low}CD33^{low}CD16⁺MHC II⁺ (MHC II, moléculas classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), expressam TNF, mas parecem não expressar IL-10, após estimulação com LPS. Por estas características, acredita-se que os monócitos CD14^{low}CD16⁺ sejam mais maduros do que os monócitos clássicos.⁸³

Trabalhos recentes sugerem um contínuo de maturação dos monócitos clássicos em direção aos monócitos não clássicos e confirmam a presença das três subpopulações distintas no sangue periférico em estado fisiológico.^{84,85,86,87}

Os monócitos CD14^{low}CD16⁺ estão aumentados no sangue periférico de pacientes com doenças inflamatórias crônicas tais como a artrite reumatóide, aterosclerose e doença de Kawasaki.⁸⁸ Estes monócitos expressam mais TLR2 do que os monócitos clássicos, tanto em indivíduos saudáveis, quanto naqueles com artrite.^{89,90} Nestes pacientes, tanto os monócitos CD16⁺ quanto os macrófagos sinoviais CD16⁺ expressam elevados níveis de TLR2 e em resposta a um agonista deste receptor produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.⁸⁹ Em indivíduos com demência associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) esta subpopulação foi observada, em biópsias do SNC, nos nódulos microgliais e em infiltrados perivascularres.⁹¹ A subpopulação de monócitos murinos equivalente aos monócitos humanos não clássicos infiltra o SNC

durante infecção fatal por vírus Oeste do Nilo e diferenciam-se em micróglia, aumentando o processo inflamatório. Os dados sugerem que diferentes subpopulações de monócitos podem infiltrar o SNC, o que pode ocorrer durante a DP, contribuindo para a etiopatogenia da doença.

As diferentes subpopulações de monócitos podem responder diferencialmente a produtos bacterianos (CD14⁺⁺CD16⁻ e CD14⁺CD16⁺) e virais (CD14^{low}CD16⁺), via diferentes TLR, para a produção de citocinas pro e anti-inflamatórias.⁵⁵ Em geral, monócitos CD16⁺ apresentam um perfil de citocinas mais pró-inflamatórias do que os monócitos CD16⁻.^{83,86,88,90} Além disso, os monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) são considerados vasculhadores do endotélio dos vasos, podendo chegar rapidamente aos tecidos, participando tanto da reposição de macrófagos teciduais quanto dos processos inflamatórios.⁵⁵ A expressão dos marcadores CD14 e CD16 é variada nos macrófagos teciduais. Por exemplo, enquanto os macrófagos peritoneais são CD14⁺⁺CD16⁻, os macrófagos alveolares são CD14^{low}CD16⁺ e segundo Fisher-Smith et al. (2004)⁹¹ micróglia devem ser CD14^{low}CD16⁺.^{91,92} Estas populações de macrófagos podem ser oriundas das diferentes subpopulações de monócitos ou podem ter a expressão das moléculas CD14 e CD16 reguladas no microambiente tecidual.^{61,93}

Os monócitos tem sido avaliados como uma população única na DP e, como referido anteriormente, eles expressam TLR2 e podem reconhecer a β -sinucleína, participando ativamente da resposta a um DAMP durante a DP.⁶⁷ Os dados acima indicam que a expressão de TLR2 pode ser diferencial entre subpopulações de monócitos, sugerindo a necessidade de avaliar as subpopulações. Recentemente, foram avaliadas as subpopulações de monócitos em pacientes com DP e encontrado um aumento da expressão de

receptores para quimiocinas na subpopulação CD16⁻ (monócitos clássicos), sugerindo um preferencial recrutamento desta subpopulação de monócito para o cérebro inflamado.³¹ Mais estudos são necessários para compreender o papel de subpopulações de monócitos na etiopatogenia da DP.

A figura 01 ilustra o envolvimento de componentes do sistema imunológico humano com possíveis agentes desencadeantes de agravos cerebrais, ocasionando alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) facilitando o acesso de substâncias com potencial capacidade de indução de lesões no SNC estimulando o processo de neuroinflamação.

Conclusão

A natureza multifatorial da DP tem emergido claramente com os estudos dos mecanismos biológicos que contribuem para o processo de morte celular neuronal nigral. Estes mecanismos incluem: ativação das células gliais, defeitos mitocondriais, alterações genéticas neuronais e produção de ROS, RNI e outros mediadores inflamatórios no SNC, tais como citocinas e quimiocinas. Estas condições estão intimamente ligadas à agregação anormal de proteínas como a α -sinucleína, que é considerada um DAMP capaz de ativar a neuroinflamação, ao ser reconhecida por TLR2 expresso nas células da imunidade inata do SNC (micróglia) e da periferia (monócitos).

Os mecanismos etiopatogênicos da DP não estão bem esclarecidos e pouco se sabe sobre a participação de citocinas e células periféricas no processo neurodegenerativo da doença. A resposta inflamatória, associada ao aparecimento e progressão da perda de células no trato nigrostriatal dopaminérgico, eos mecanismos imunológicos são cada vez mais reconhecidos como cruciais na patogênese da DP.

Identificar e compreender a natureza e o papel dos mediadores neuroinflamatórios envolvidos na patogênese da DP pode fornecer várias opções para modular essas vias neuroinflamatórias para ajudar a reduzir a morte neuronal na DP. Uma avaliação dos monócitos quanto às subpopulações, expressão de TLR e produção de citocinas em pacientes com DP pode contribuir para maiores esclarecimentos sobre a etiopatogenia da DP e talvez para a identificação de biomarcadores de prognóstico da doença.

Referências

1. Verbaan D, Marinus J, Visser M, Van Rooden SM, Stiggilbout AM, Van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69(4):333-41.
2. Lees AJ. The Parkinson chimera. *Neurology*. 2009;72(7 Suppl):S2-11.
3. Nolan YM, Sullivan AM and Toulouse A. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol Med*. 2013;19(3):187-96.
4. Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory process in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53 (Suppl3): S49-60.
5. Hirsch EC, Jenner P, Pharm S and Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2013;28(1): 24-30.
6. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol*. 1999;46(4):598-605.
7. Liu B, hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304(1):1-7.

8. Warner TT, Schapira AH. Genetics and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol.*2003;53 (Suppl 3): S16-23.
9. Duvoisin RC, Yahr MD. Encéphalopathie et parkinsonisme. *Arch Neurol.* 1965;12:227-39.
10. Altschuler E. Gastric *Helicobacter pylori* infection as a cause of idiopathic Parkinson disease and non-arteric anterior optic ischemic neuropathy. *Med Hypotheses.*1996; 47(5):413-4.
11. Dobbs RJ, Dobbs SM, Weller C, Charlet A, Bjarnason IT, Curry A, et al. Helicobacter hypothesis for idiopathic parkinsonism: before and beyond. *Helicobacter.* 2008; 13(5):309-22.
12. Diaz-Corrales FJ, Colasante C, Contreras Q, Puiq M, Serrano JA, Hernández L, et al.. *Nocardia ovioides* (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(4):539-48.
13. Loeffler DA, Camp DM, QuS, Beaman BL, Lewitt PA. Characterization of dopamine-depleting activity of *Nocardia asteroides* strain GUH-2 culture on PC 12 cells. *Microb Pathog.* 2004;37(2):73-85.
14. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2002; 68(5):325-40.
15. McGeer PL, McGeer EG. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.*2004;10Suppl 1:S3-7.
16. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009; 8(4):382-97.
17. Marchetti B, Abbracchio MP. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26(10): 517-25.

18. Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002; 81(6):1285-97.
19. Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2009;89(3): 277-87.
20. Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neurologia in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2010; 63(1-2):189-211.
21. Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, et al.. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* 2009;23(1):55-63.
22. Neumann H, Wekerle H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(1):1-9.
23. Zozulya AL, Clarkson BD, Ortler S, Fabry S, Wiendl H. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *J Mol Med (Berl).* 2010;88(6):535-44.
24. Choi D, Suk K. Glial reaction in Parkinson's diseases: inflammatory activation signaling of glia as a potential therapeutic target. *Cur Sig Transd Ther.* 2007;2:77-90.
25. Etemad S, Zamin RM, Ruitenber MJ, Filgueira L. A novel in vitro human microglia model: Characterization of human monocyte-derived microglia. *J Neurosci Methods.* 2012; 209(1):79-89.
26. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantianigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988; 38(8):1285-91.

27. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from Parkinsonian patients. *Neurosci Lett.* 1994;165 (1-2):208-10.
28. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and Parkinson's diseases patients. *Neurosci Lett.* 1995; 202(1-2):17-20.
29. Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, et al.. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett.* 2008;441(2):158-62.
30. Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett.* 2010;468(1):56-8.
31. Funk N, Wieghofer P, Grimm S, Schaefer R, Bühring HJ, Gasser T, Biskup S, et al.. Characterization of Peripheral Hematopoietic Stem Cells and Monocytes in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2013; 28(3):392-95.
32. Janeway CA, Travers P. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* London/New York: Current Biology Ltd/Garland Publishing, 1994.
33. Nagatsu T, Mogi M, Ichnose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm. (Suppl)* 2000; 60:277-90.
34. Gayle DA, Ling Z, Tong C, Landers T, Lipton JW, Carvey PM. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1b, and nitric oxide. *Brain Res Dev.* 2002; 133(1):27-35.

35. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, John GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*. 2009;20(16):6309-16.
36. Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile Parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996;211(1):13-06.
37. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid Y, Hirsch EC. Immunohistochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1994;172:151-4.
38. Rentzos M, Nikolaou C, Andreadou E, Paraskevas GP, Rombos A, Zoga M, et al. Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 2009;119(5):332-7.
39. Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*. 2000;16(6):724-39.
40. Iravani M M, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience*. 2002;110(1):49-58.
41. Liu B, Du L, Hong JS. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;293(2): 607-17.
42. Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moss T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2000; 95(2):425-32.

43. Standaert DG, Caldwell KA, Tucci ML, Armagost J, Hodges TW, Chen J, et al. Investigating bacterial sources of toxicity as an environmental contributor to dopaminergic neurodegeneration. PLoS One. 2009;4(10):e 7227.
44. Zhang W, Phillips K, Wielgus AR, Liu J, Albertini A, Zucca FA, et al.. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. Neurotox Res. 2011;19(1):63-72.
45. Bachis A, CaoIngelo AM, Vicini S, Doe PP, de Bernardi MA, Brooker G, et al.. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell-death by blocking caspase-2-like activity. J Neurosci. 2001;21(9):3104-12.
46. Molina-Holgado F, Grecis R, Rothwell NJ. Actions of exogenous endogenous IL-10 on glial responses to bacterial LPS/ cytokines. Glia. 2001;33(2):97-106.
47. Godoy MCP, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor of Parkinson's disease. Brain. 2008;131(7):1880-94.
48. Magaki S, Mueller C, Dickson C, Kirsch W. Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment. Exp Gerontol. 2007;42(3):233-40.
49. Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JE, Stoner JA, Leenen PJM. IFN-gamma triggers CCR2-independent monocyte entry into the brain during systemic infection by virulent *Listeria monocytogenes*. Brain Behav Immun. 2010;24(6):919-29.
50. Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. Microbes Infect. 2004; 6(15):1361-7.

51. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med.* 2007;22(2):63-72.
52. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu My, Van Huffel C, Du X, et al.. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10SeCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science.*1998;282(5396):2085 -8.
53. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yangy RB, Belisle JT, Bleharsky JR, et al.. Host defence mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll – like receptors. *Science.* 1999;285(5428):732-6.
54. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2003;21:335-76.
55. Cros J, Cagnard N, Woollard k, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3): 375-86.
56. Trudler D, Farfara D, Frenkel D. Toll-like receptors expression signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:1-12. pii: 497987.
57. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al.. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependet pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(14):8514-9.
58. Panaro MA, Lofrumento DD, Saponaro C, Nuccio F, Cianciulli A; Mitolo V, et al.. Expression of TLR4 and CD14 in the Central Nervous System (CSN) in a MPTP mouse modelo f Parkinson ´s-like disease. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2008;30(4):729 -40.
59. Panaro MA, Cianciulli A. Current opinions and perspectives on the role of immune system in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2012;18(2):200-8.

60. Ji KA, Yang MS, Jeong HK, et al. Resident microglia die and infiltrated neutrophils and monocytes become major inflammatory cells in lipopolysaccharide-injected brain. *Glia*. 2007;55(15):1577-88.
61. Skinner NA; Macisaac CM, Hamilton JA, Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):270-8.
62. Noelker C, Morel L, Lescot T, Osterloh A, Alvarez-Fischer D, Breloer M, et al.. Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. *Sci Rep*. 2013;3:1393.
63. Fisher M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann N.Y. Acad Sci*. 2008;1143:21-34.
64. Jana M, Palencia CA, Pahan K. Fibrillar Amyloid- β Active Microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol*. 2008;181:7254- 62.
65. Lin H, Tang C, Chen Y, Wei I, Lai C, Lu D. Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT and NF-KappaB pathways in BV-2 microglia. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(8):883-91.
66. Béraud D, Twomey M, Bloom B, Mittereder A, Ton V, Neitzke K, et al. α -synuclein alters Toll-like Receptor Expression. *Front Neurosci*. 2011;5(80):1-11.
67. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, et al.. Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55375.
68. Kim C, Ho D, Suk J, You S, Michael S, Kang J, et al.. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*. 2013;4:1562.

69. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, et al. Alpha-Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J*. 2003;17(13):1945-7.
70. Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OU, Joo IS, Hut K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm*. 2006;113: 1435-39.
71. Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, et al. Toll-like receptor 4 is required for α -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. 2013;61(3):349-60.
72. Blandini F. Neural and immunemechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(1):189-201.
73. Tauber SM, Ebert S, Weishaupt JH, Reich A, Nau R, Gerber J. Stimulation of Toll – Like Receptor 9 by chronic intraventricular unmethylated cytosine – guanine DNA infusion causes neuroinflammation and impaired spatial memory. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(10):1116-24.
74. Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, Parnadeau S, Corvol JC, Lu L, et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6632-7.
75. Deleidi M, Hallett PJ, Koprach JB, Chung CY, Isacson O. The Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid triggers nigrostriatal dopaminergic degeneration. *J Neurosci*. 2010;30(48):16091-101.
76. Djukic M, Mildner A, Schmidt H, et al. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*, 2009;129: 2394-2403.

77. Getts DR, Terry RL, Getts MT, et al. Ly6c+ “Inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med*. 2008; 205: 2319-37.
78. Mirlashari MR, Lyberg T. Expression and involvement of toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in *monocyte* TNF α production induced by lipopolisaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit*. 2003; 9:316-24.
79. Skrzecynka-Moncznik J, Bzowska M, Loeseke S, Grage-Griebnow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;2(2):152-9.
80. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):609-18.
81. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
82. Lin JJ, Chen CH, Yueh KC, Chang CY, Lin SZ. A CD14 monocyte receptor polymorphism and genetic susceptibility to Parkinson’s disease for females. *Parkinsonism. Relat Disord*. 2006;12:9- 13.
83. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1996; 87:373-7.
84. Ganea D, Kocieda V, Kong W, Yen J. Modulation of dendritic cell function by PGE₂ and DHA: a framework for understanding the role of dendritic cells in neuroinflammation. *Clin Lipidol*. 2011;6:277-91.

85. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al.. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118(12):e50-61.
86. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2011; 53: 41-57.
87. Colton CA. Immune heterogeneity in neuroinflammation: dendritic cells in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(1):145-62.
88. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: Their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*.2007;81:584-92.
89. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okomoto A, Ueno A, Ogawa N, et al.. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16⁺ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1457-67.
90. Belge K, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger B, Frankenberger T, et al. The proinflammatory CD14⁺ CD16⁺ DR⁺⁺ Monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002; 168: 3536-42.
91. Fischer-Smith T, Croul S, Adeniyi A, Rybicka K, Morgello S, Khalili K, et al.. Macrophage/microglial accumulation and proliferating cell nuclear antigen expression in the central nervous system in human immunodeficiency virus encephalopathy. *Am J Pathol*. 2004;164:2089-99.
92. Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today*. 1996;17:424-8.
93. Randolph GJ. The fate of monocytes in atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(Suppl 1):28-30.

Anexo: Figura do manuscrito

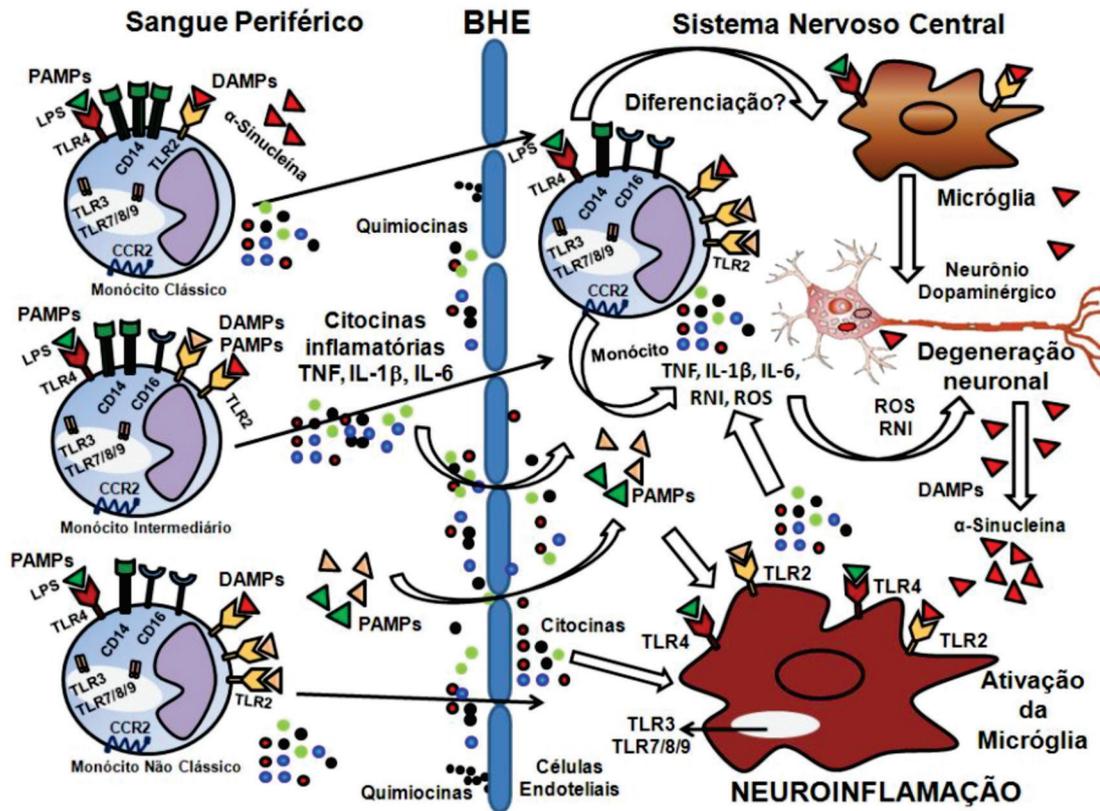


Figura 1 - Resposta imune inata associada ao processo de neuroinflamação na Doença de parkison. Fatores ambientais como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, p.ex: produtos bacterianos como LPS, lipopolissacarídeo), assim como produtos provenientes de danos teciduais (DAMPs, p. ex: α -sinucleína) podem ativar células do sangue periférico como os monócitos e células do SNC como a microglia, importantes células da imunidade natural. Os DAMPs e PAMPs são reconhecidos por receptores similares a Toll (*Toll-like receptors* – TLR), tais como o TLR4 (LPS) e o TLR2 (α -sinucleína), entre outros. Três subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) são identificados por meio da expressão de moléculas de superfície celular (CD14, CD16), receptores para quimiocinas (CCR) e TLR. As diferentes subpopulações de monócitos e a microglia ativadas liberam diversos mediadores proinflamatórios (citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio [ROS] e nitrogênio [RNI]) que provocam alteração da permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE), permitindo o acesso de moléculas (PAMPs e substâncias neurotóxicas) presentes no sangue periférico e a infiltração de leucócitos no cérebro. A microglia ativada e os monócitos recém-migrados, que podem se diferenciar em macrófagos ou em microglia, promovem a neuroinflamação que está associada à degeneração dos neurônios dopaminérgicos.

4.2 CAPÍTULO 2: ARTIGO 2 - DECREASED TOLL-LIKE RECEPTOR 2 (TLR2)-INDUCED CYTOKINES IN PARKINSON DISEASE'S PATIENTS BLOOD CULTURES

Manuscrito de acordo com as normas da revista *Movement Disorders*, à qual foi submetido em 30/05/2014 (Anexo F).

Decreased toll-like receptor 2-induced cytokines in Parkinson's disease patients' blood cultures

Delson José da Silva, MS,¹ Arissa Felipe Borges, MS,¹ Priscila Oliveira Souza, BSC,¹ Patrícia Reis de Souza, MS,² Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, PhD,² Miriam Leandro Dorta, PhD,¹ Milton Adriano Pelli de Oliveira, PhD,¹ Antonio Lúcio Teixeira, PhD,³ and Fátima Ribeiro-Dias, PhD^{1*}

¹ *Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil*

² *Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil*

³ *Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Instituto de Estudos Avançados Transdisciplinares, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

*Corresponding author: Dr. Fátima Ribeiro-Dias, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 s/n, Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, GO, Brazil. Tel.: +55 62 3209 6116; fax: +55 62 3209 6363; fatimardias@gmail.com

Word count: 2999.

Running title: Decreased TLR2 response in Parkinson's disease

Key Words – Parkinson's disease; TLR2; TLR7/8; monocytes; cytokines

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report.

Full financial disclosures and author roles may be found in the online version of this article.

Funding agencies: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)

Abstract:

Background: Toll-like receptors (TLR) are expressed in several immune system cells, including blood monocytes and resident macrophages in the Central Nervous System. TLR recognize pathogen- or damage-associated molecular patterns (PAMPs, DAMPs), leading to the release of inflammatory and toxic molecules that can contribute to neuroinflammation associated with Parkinson's disease (PD). This study aimed to compare the ability of peripheral blood cells from PD patients and healthy subjects to produce cytokines after exposure to TLR agonists, as well as investigate TLR2 and TLR4 expression on

monocytes. **Method:** The sample consisted of 31 PD patients and 31 healthy subjects. Patients were evaluated using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) and Hoehn & Yahr Staging Scale. Cytokines were measured in supernatants of whole blood cell cultures after incubation with TLR4, TLR2, and TLR7/8 agonists, using the Cytometer Bead Array. Expression of CD16, TLR2, and TLR4 was analyzed using flow cytometry. **Results:** Patients' blood cells produced lower levels of cytokine (tumor necrosis factor, interleukin-1 β IL-6, and IL-10) in response to TLR2 and after TLR7/8/R848 activation (IL-6) than controls'. Percentages of CD14⁺CD16⁺ or CD14⁺CD16⁻ monocytes and TLR2 and TLR4 expression were similar for patients and controls. No correlation was found between UPDRS scores and cytokines. **Conclusions:** Data suggest that TLR2 response in PD patients is impaired in blood leukocytes. This impairment was not associated with imbalance between monocyte subsets or TLR2 expression on these cells. The possibility that TLR2 can be inhibited by previous stimulation with PAMPs/DAMPs during neuroinflammation needs further investigation.

Parkinson's disease (PD) is as a neurodegenerative movement disorder characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. The classical tetrad of PD includes bradykinesia, rigidity, resting tremor, and postural instability. These motor disorders can be associated with cognitive, psychiatric, and sensorial symptoms that can often lead to significant impairment of patients' quality of life.¹

Interactions between genetic and environmental factors can be involved in the etiopathogenesis of PD.²⁻⁴ The neurodegenerative process is associated with an inflammatory response in the brain.⁴⁻⁸ Moreover, several studies have evidenced that exposure of microglia, a brain resident innate immune cell, to

pathogen- or damage-associated molecular patterns (PAMPs, DAMPs) leads to the release of several inflammatory and toxic molecules that contribute to neurodegeneration.⁹⁻¹³

PAMPs and DAMPs are recognized by innate immune system receptors, such as toll-like receptors (TLR), which are expressed by microglia. These receptors are essential in immune defense against viral or bacterial infections in the brain. Although microglial cells express TLR1–4, TLR2 is the most expressed among them.¹⁴ TLR are responsible for recognizing bacterial PAMPs such as lipopeptides (TLR1, TLR2) and lipopolysaccharide (LPS) (TLR4). Also, TLR3 and TLR7, which recognize viral nucleotides, and TLR9, responsible for the recognition of bacterial CpG DNA, are expressed in microglia. Therefore, once TLR are triggered by PAMPs, microglia produces inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and nitrogen species.^{14,15} Tissue damage caused by these microglia-derived factors leads to the release of endogenous molecules (DAMPs), which in turn activate microglia through TLR, enhancing the inflammatory response. Neuromelanin and α -synuclein are examples of DAMPs that activate microglia.^{13,15} Recently, it has been demonstrated that α -synuclein, the main protein in Lewy bodies, structures typically present in patients with PD, triggers TLR2 in rat microglia¹⁶ and in human monocytes inducing interleukin-1 β (IL-1 β) production.¹⁷

Monocytes are a heterogeneous cell population that can be characterized according to CD14 and CD16 expression.¹⁸ In general, CD16⁺ monocytes present a more pro-inflammatory profile than CD16⁻ monocytes.¹⁹⁻²² CD14⁺CD16⁺ monocytes are increased in inflammatory diseases, indicating that imbalance in proportions of monocyte subsets can contribute to their pathogenesis.²¹⁻²⁵ Indeed, in patients with PD, alterations in chemokine

receptor expression in CD16- monocytes suggest a preferential recruitment of this monocyte subset into inflamed brain.²⁶

Since PAMPs and DAMPs can trigger immune responses in the brain and also in peripheral blood cells, circulating monocytes arise as important leukocytes because they are precursors of microglia.^{27,28} Also, monocytes express TLR and produce proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), IL-1 β , IL-6, IL-12p70, as well as IL-10, an anti-inflammatory cytokine, when TLR are triggered.²⁹⁻³² These cytokines seem to have a role in neuroinflammation in patients with PD.^{5,6,10,33-35} Furthermore, increased levels of serum IL-6 and TNF receptor 1 have been found in patients with PD.^{36,37}

It is known that monocytes are very sensitive to stimulation and, because of this, whole blood cell cultures have been extensively used to evaluate their functions, especially regarding cytokine production.^{29,38-42} Due to a crosstalk between immune cells in the central nervous system (CNS) and peripheral blood cells, the evaluation of the status of immune cell function in peripheral blood could unravel the participation of peripheral leukocytes in neuroinflammation. Additionally, systemic immune alterations could be biomarkers and highlight the level of neuroinflammation/neurodegeneration in PD, since DAMPs released during brain damage can modulate peripheral blood cell functions. Accordingly, in this study, the ability of peripheral blood cells in patients with PD to be activated by different TLR agonists was evaluated in an attempt to better elucidate the interplay between the inflammatory process and PD. Additionally, percentages of monocyte subsets and TLR2 and TLR4 expression on these cells were evaluated.

Patients and Methods

Study Population

Patients with PD were recruited at Hospital das Clínicas (Universidade Federal de Goiás, UFG) and Instituto Integrado de Neurociências (IINEURO), Goiânia, Brazil. Controls were healthy blood donors from the blood bank of Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) that filled all criteria established by Brazilian Guide Lines for blood donation. Briefly, the donors were apparently healthy based in ectoscopy evaluation, normal pulse and blood pressure, normal levels of hematocrit and hemoglobin, no alterations of body weight and temperature, absence of disease (cardiovascular, allergic, metabolic or infeccious), no use of drugs or medicines. All procedures were approved by the local Ethics Committee (Research Ethics Comittee of Hospital das Clínicas, UFG, Protocol n. 092/2011), and participants signed the informed consent. Patients (n = 31) and controls (n = 31) were matched by gender and age. Diagnosis of PD followed the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria,⁴³ and patients were evaluated using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS),⁴⁴ and the Hoehn & Yahr (H&Y) Staging Scale.⁴⁵ All patients were receiving conventional PD treatment (amantadine, pramiprexol, and levodopa). Patients and controls undertaking anti-inflammatory drugs and/or presenting inflammatory or infectious diseases were excluded from the study. Patients presented no signals of inflammatory disease or comorbidities and were checked to normal blood cell counts, C-reactive protein and erythrocyte sedimentationrate.

Activation of Whole blood cell cultures with TLR Agonists

Samples of venous blood from patients and controls were collected for culture (with heparin; 4 mL), and serum sampling (4 mL, Vacuette® tubes, Greiner Bio-one, Americana, SP, Brazil), between 8:00 and 10:00 a.m. After 1 h at room temperature (r.t.), the blood samples were centrifuged ($500 \times g$, 5 min, 4°C), and serum was collected and stored at -80°C until analysis. Leukocyte count was performed using light microscopy, and results were expressed as leukocytes/ mm^3 . For cultures, blood samples were diluted (1:2) into RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 11 mM sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (all reagents from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Diluted blood was distributed into 2-mL tubes (endotoxin, DNase, RNase free; Axygen Scientific Inc., Union City, CA, USA), in a final volume of 0.8 mL. Whole blood cell cultures were incubated in the absence or presence of: LPS; a TLR4 agonist (*E. coli*, serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich Co.); Pam₃Cys SKKKK, a synthetic triacyl-lipopeptide, which is a TLR2/1 agonist (EMC Microcollections, Tübingen, Baden-Württemberg, Germany); or R848, an imidazoquinoline compound that acts as a TLR7/8 agonist (Invivogen, San Diego, CA, USA). All TLR agonists were added to the cultures at the concentration of 100 ng/mL, as standardized in previous experiments of our team. Tubes were closed and kept under shaking at 37°C (Mixing Block MB-101, Bioer, Hangzhou, China) for 24 h. After incubation, cells were centrifuged ($90 \times g$, 3 min) for collecting supernatants, which were stored at -80°C until analysis.

Cytokine Measurement Using Cytometer Bead Array (CBA)

Cytokines, in serum or culture supernatants, were measured using Cytometer Bead Array (CBA) kits (Human Inflammatory Cytokines Kit: IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70 – Catalog # 551811, Becton, Dickinson and Company, Biosciences - Pharmingen, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as pg/mL. Data acquisition and analyses were performed using BD FACS Compt™ Cytometric Bead Array software (Becton, Dickinson and Company).

Monocyte (CD14, CD16, TLR2, TLR4 Expressions) Analyses Using Flow Cytometry

Peripheral blood was collected in EDTA Vacuette® tubes (4 mL) and leukocytes from patients and controls (10^6) were stained with labeled antibodies against CD14 (PE, clone M5E2, BioLegend, San Diego, CA, USA), CD16 (PE/Cy5, clone 3G8, BioLegend), TLR2 (FITC, clone TLR2.1, eBioscience, San Diego, CA, USA), or TLR4 (Alexa Fluor 488, clone HTA 125, eBioscience) for 30 min, r.t. Clone 3G8 to CD16 was used to enable the exclusion of CD16⁺ neutrophils.⁴⁶ Lysis of erythrocytes was performed using lysis solution (BioLegend) for 15 min at 4°C. To complete red blood cell lysis, 0.3% saponin was used (15 min, r.t.) and, after washings and centrifuging ($500 \times g$, 5 min, 4°C), cells were fixed with 1% paraformaldehyde for 15 min, r.t. Data acquisition was performed in Accuri C6 cytometer (BD), based in FSC \times SSC parameters (50,000 events/tube); 5,000 events were also acquired in CD14 gate. Analyses of monocytes (FSC \times SSC) and CD14⁺ cells for expression of CD16, TLR2, and TLR4 were carried out using FCS Express version 4.0 software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

Statistical Analyses

Data were presented as median (minimum and maximum or interquartile range, 25–75%). Mann-Whitney U test was used to compare unpaired samples (patients vs controls) and Wilcoxon test for paired samples (medium vs TLR agonist). For correlation analysis, Spearman's test was used. All analyses were performed using GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Characteristics of Patients with PD and Healthy Controls

Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics of the 31 patients and 31 controls included in this study. The group of patients presented variable duration of the disease (1–20 years) and severity according to UPDRS scale ranging from 9.5 to 42.0. Circulating leukocyte numbers were similar in patients and controls.

Similar Cytokine Concentrations Detected in Serum of Patients with PD and Healthy Controls

The concentrations of cytokines were investigated in the serum of patients with PD and controls. TNF, IL-1 β , IL-8, and IL-6 were detected in both groups in similar concentrations (patients vs controls: TNF = 18.9 [0–260.6] vs 11.5 [0–180.8] pg/mL; IL-1 β = 0 [0–200.8] vs 0 [0–14.6] pg/mL; IL-8 = 291.7 [6.1–13,251.0] vs 174.3 [0.3–1,614.0] pg/mL; IL-6 = 6.0 [0–1,559.0] vs 3.7 [1.0–10.0] pg/mL, $n = 26$ –27). IL-12p70 and IL-10 were not detected. No association was detected between UPDRS scores and cytokine concentrations in serum from patients with PD (data not shown).

Decreased Cytokine Production in TLR2- or TLR7/8-activated Whole Blood Cultures of Patients with PD

To evaluate the cytokine production after leukocyte activation with TLR agonists, whole blood cell cultures were incubated with LPS (TLR4 agonist), Pam₃Cys (TLR2 agonist), or R848 (TLR7/8 agonist). IL-8 results were not included because all concentrations detected in activated cultures were higher than the maximum limit of the detection curve. As shown in Fig. 1, all TLR agonists induced significant production of TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10, and IL-12p70 in both groups, except Pam₃Cys, which did not induce IL-12p70 (Fig. 1D). Similar levels of cytokines were produced when whole blood cultures from patients with PD and controls were incubated with LPS (Fig. 1A–E). However, TLR2- and TLR7/8-activated whole blood cell cultures of patients with PD produced lower amounts of cytokines than controls (Fig. 1A–E).

In the present study, no association was detected between UPDRS scores and cytokine concentrations in TLR-activated cultures (data not shown). Since most patients were in the first two phases of illness according to the H&Y Staging Scale, no association was detected between cytokine levels and H&Y scores.

Monocyte Evaluation and TLR2 and TLR4 Expression in Patients with PD

The decreased cytokine production in whole blood cell cultures of patients with PD after TLR stimulation could be ascribed to monocyte disturbances, once monocytes are the main cells producing cytokines after TLR activation.³⁹ Nonetheless, the percentage of monocytes CD14⁺CD16⁻ or CD14⁺CD16⁺ was not significantly different between patients and controls (Fig. 2A). Moreover, the expression of TLR2 and TLR4 as well as the frequency of TLR2 and TLR4-positive monocytes were similar between patients and controls. No differences

were detected in TLR2 (Fig. 2C) or TLR4 (Fig. 2D) expression in CD14⁺CD16⁺ or CD14⁺CD16⁻ monocyte subsets comparing patients and controls. Similar results were obtained when analyzing monocytes (FSC × SSC; Fig. 2) and CD14⁺ monocytes (data not shown).

Discussion

The present study investigated the response of peripheral blood leukocytes from patients with PD to different TLR agonists and adds novel data about inflammation process in PD. The main findings are: a) whole blood cell cultures from patients with PD presented lower cytokine production in response to TLR2/Pam₃Cys (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10) and TLR7/8/R848 (IL-6) activation; b) no alterations in percentages of CD14⁺CD16⁺ or CD14⁺CD16⁻ monocytes and their TLR2 and TLR4 expression were detected in patients with PD.

First, we analyzed cytokine levels in serum from patients with PD and controls and no significant differences were detected between them regarding TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, or IL-10 production. Also, no associations between circulating levels of cytokines and UPDRS scores were found. These data indicate that PD is not related to differential systemic accumulation or general production of pro- or anti-inflammatory cytokines. However, a previous study demonstrated increased cytokines (TNF, IL-6, IL-10) in serum from patients with PD concomitantly with an increase in leukocyte number in peripheral blood.⁴⁷ Also, a positive correlation has been found between circulating TNF levels and UPDRS motor scores in patients with PD.⁴⁸ As levels of circulating cytokines can be the result of cytokines produced by CNS cells during neuroinflammation and by peripheral blood cells, the apparent discrepancies between studies could be attributed to differences in disease

severity in the groups evaluated. Our data showed no differences in serum cytokine levels between patients with PD and controls, which is in accordance with the results of peripheral blood leukocyte amounts, since they did not present differences between patients and controls.

Next, we showed that whole blood cell cultures from patients with PD presented lower cytokine production in response to TLR2/Pam₃Cys (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10) and TLR7/8/R848 (IL-6) activation. Stimulation of TLR4 with LPS induced similar levels of cytokines in cultures from patients with PD and controls. Previous studies have investigated the production of cytokines in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and isolated monocytes under stimulation with LPS and have shown results that contradict our study. Bessler et al.⁴⁹ showed that PBMC from patients with PD produced higher levels of IL-1 β and IL-6 after activation with LPS than those from controls. In opposition to that, Hasegawa et al.⁵⁰ reported a decrease in TNF, IL-1 β , and IL-6 production in LPS-activated PBMC cultures of patients with PD in comparison with cultures of healthy controls. Also, they showed that monocytes isolated from patients with PD by adherence produced lower amounts of TNF than monocytes from controls. We used whole blood cell culture to evaluate the cytokine production, considered a very sensitive assay, especially to assess the function of monocytes, which are believed to be the main responders to TLR agonists in these cultures.^{39,42} The different techniques used could explain, at least partially, the discrepant results between studies evaluating LPS/TLR4 activation. Yet, differences in severity of motor and non-motor symptoms in the groups of patients with PD could contribute to these conflicting data. To the best of our knowledge, no study to date has evaluated PBMC/monocyte cultures activated with TLR2 or TLR7/8 agonists in patients with PD.

As altered cytokine production can be, at least in part, associated with antiparkinsonian drugs,⁵¹⁻⁵⁴ it could be argued that in our experiments the antiparkinsonian treatment could interfere with cytokine production in whole blood cell cultures. However, the levels of cytokines induced by LPS/TLR4 were not altered, and only the levels of IL-6 presented alteration in R848/TLR7/8-activated cultures, whereas the levels of all cytokines induced by TLR2 agonist decreased in cultures from patients with PD. Thus, although we cannot rule out the possibility of drug effects on leukocytes, these results suggest that responses to TLR agonists showed selective alterations not related to general effects of treatments.

In the present study, the lower responsiveness to TLR2 agonist could be due to monocyte disturbances in whole blood cell cultures. Nonetheless, in patients with PD we did not detect any significant alterations in percentages of CD16⁺ or CD16⁻ monocytes in peripheral blood compared with controls. These results are in line with those published by Funk et al.²⁶ who evaluated chemokine receptors in monocyte subsets but did not report alterations in the proportions of these cells in patients with PD. In addition, we did not find differences in TLR2 or in TLR4 expression between monocytes from patients with PD and controls, suggesting that the differential responses observed in our study could be due to altered leukocyte functions during PD. It has been described that CD16⁺ monocytes express higher levels of TLR2 than CD16⁻ monocytes,²⁰ a fact that is in agreement with our results (Fig. 2C, MFI of TLR2 in CD14⁺CD16⁺ vs CD14⁺CD16⁻ monocytes, both in control and patients with PD $p < 0.05$). However, no differences were detected in TLR2 levels of both monocyte subsets between patients with PD and controls in the present study.

It is known that previous stimulation of cells through TLR can make them tolerant to a subsequent re-stimulation with a TLR agonist.^{55,56} Pre-treatment of a human monocytic cell line with Pam₃Cys reduced the response of these cells to a subsequent TLR2 triggering due to the inhibition of IL-1R-associated kinase 1 expression (IRAK1).⁵⁷ In macrophages, IRAK4 activation is important for tolerance induced by Pam₃Cys.⁵⁵ These enzymes play a crucial role in TLR signaling pathway and TLR tolerance is a mechanism to prevent high production of cytokines that could be harmful to the host when cells are exposed to repeated TLR agonist stimulation. In PD, the release of DAMPs that bind to TLR2 has been observed during the neurodegenerative process. Although considered a cytoplasmic protein, α -synuclein protein has been detected in plasma and cerebrospinal fluid of patients with PD.⁵⁸⁻⁶⁰ Recently, it has been shown that this protein is a DAMP that activates rat microglia and human monocytes using TLR2.^{16,17} Based on these results, we suggest that in our patients with PD circulating α -synuclein (or another unknown ligand) could bind to TLR2 on monocytes turning them tolerant to further stimulation with Pam₃Cys in whole blood cell cultures. This is a point to be addressed in isolated monocytes in future studies.

In CNS, microglia expresses TLR2, TLR4, or TLR7/8, and triggering these receptors induces neuroinflammation that can contribute to the neurodegenerative process. Besides, α -synuclein can change the responses of mouse microglia to TLR2 and TLR7 agonists, thus favoring activation of microglia by PAMPs with subsequent acceleration of synucleinopathies as PD.⁶¹ Activation of TLR2 with lipopeptide in CNS causes neuroinflammation and neuronal damage in a microglia-dependent manner.⁶² Also, microglia activated by TLR2 endogenous ligands during axonal injury is responsible for

recruitment of leukocytes into brain, an effect dependent on chemokines and TNF.⁶³ Thus, in neurodegenerative disorders, such as PD, TLR activation in sterile or infectious conditions can contribute to the outcome of the disease.

In conclusion, in the present study the group of patients with PD showed a decrease in responsiveness of blood cells to TLR2 and TLR7/8 activation not associated with UPDRS scores. The lower cytokine production was not associated with alterations in monocyte subsets or TLR2 expression, therefore suggesting a possible mechanism of tolerance caused by DAMPs generated during neuroinflammation, which act on TLR2 receptors in peripheral blood cells. The investigation of TLR responsiveness during PD could reveal the level of neurodegenerative/neuroinflammation process and contribute to the understanding of the role of PAMPs and DAMPs in the pathophysiology of PD.

Acknowledgments: We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) for the financial support. FR-D and ALT are research fellows of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). POS was a fellow of CNPq (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC); AFB was a fellow of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Author roles: DJS was responsible for conception, organization, and execution of the research project; AFB carried out the experiments of flow cytometry; POS and PRS performed the assays of cytokine; CRBC, MLD, MAPO, ALT, and FR-D were in charge of the analysis and critical review; FR-D was responsible for the experimental design; DJS, CRBC, ALT, and FR-D prepared the manuscript.

Full financial disclosures of all authors for the past year: None.

References

1. Less AJ. The Parkinson chimera. *Neurology* 2009;72:S2-S11. doi: 10.1212/WNL.0b013e318198daec.
2. Harris AN, Tsui JK, Marion SA, Shen H, Teschke K. Association of Parkinson's disease with infections and occupational exposure to possible vectors. *Mov Disord* 2012; 27:1111-1117. doi: 10.1002/mds.25077.
3. Angeli A, Mencacci NE, Duran R, et al. Genotype and phenotype in Parkinson's disease: lessons in heterogeneity from deep brain stimulation. *Mov Disord* 2013; 28:1370-1375. doi: 10.1002/mds.25535.
4. Hirsch EC, Jenner P, Pharm S, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013;28:24-30. doi: 10.1002/mds.25032.
5. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002;68:325-340. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00127-2.
6. Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53:S49-S60.
7. Liu B, Hong JS. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1-7. doi: 10.1124/jpet.102.035048.
8. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 2010;63:189-211. doi: 10.1016/j.brainresrev. 2009.11.004.
9. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8514-8519.
10. Arai H, Furuya T, Yasuda T, Miura M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are

- mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem* 2004;279:51647-51653. doi: 10.1074/jbc.M407328200.
11. Tauber SM, Ebert S, Weishaupt JH, Reich A, Nau R, Gerber J. Stimulation of Toll-like receptor 9 by chronic intraventricular unmethylated cytosine-guanine DNA infusion causes neuroinflammation and impaired spatial memory. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:1116-1124. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181b7fde5.
 12. Lin HY, Tang CH, Chen YH, et al. Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia. *Int Immunopharmacol* 2010;10:883-891. doi: 10.1016/j.intimp.2010.04.026.
 13. Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:S210-S212. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70065-7.
 14. Trudler D, Farfara D, Frenkel D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm* 2010;2010. doi: 10.1155/2010/497987.
 15. Béraud D, Twomey M, Bloom B, et al. α -synuclein alters toll-like receptor expression. *Front Neurosc*. 2011;5:1-11. doi: 10.3389/fnins.2011.00080.
 16. Kim C, Ho DH, Suk JE, et al. Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun* 2013;4:1562. doi: 10.1038/ncomms2534.
 17. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, et al. Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One* 2013;8: e55375. doi: 10.1371/journal.pone.0055375.

18. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74-e80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.
19. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996; 87:373-377.
20. Belge KU, Dayyani F, Horelt A et al. The proinflammatory CD14⁺ CD16⁺ D1R⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168: 3536-3542.
21. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007;81:584-592.
22. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012;53:41-57. doi: 10.1007/s12026-012-8297-3.
23. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, et al. CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2578-2586. doi: 10.1002/art.10545.
24. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993;82:3170-3176.
25. Han Q, Bradshaw EM, Nilsson B, Hafler DA, Love JC. Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving. *Lab Chip* 2010;10:1391-1400. doi: 10.1039/B926849A.
26. Funk N, Wieghofer P, Grimm S, et al. Characterization of peripheral hematopoietic stem cells and monocytes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013;28:392-395. doi: 10.1002/mds.25300.

27. Djukic M, Mildner A, Schmidt H, et al. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 2009;129:2394-2403. doi:10.1093/brain/awl206.
28. Getts DR, Terry RL, Getts MT, et al. Ly6c+ “inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med* 2008;205:2319-2337. doi: 10.1084/jem.20080421.
29. Fokkema SJ, Loos BG, Slegte C, et al. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2003;30:1091-1096. doi: 10.1046/j.0303-6979.2003.00435.x.
30. Kamgang RK, Ramos I, Duarte LR, et al. Using distinct molecular signatures of human monocytes and dendritic cells to predict adjuvant activity and pyrogenicity of TLR agonists. *Med Microbiol Immunol* 2008;197:369-379. doi: 10.1007/s00430-008-0081-6.
31. Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010;33:375-386. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012.
32. Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res* 2010;11:2. doi: 10.1186/1465-9921-11-2.
33. Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer’s and de novo Parkinson’s disease patients. *Neurosci Lett* 1995;202:17-20. doi: 10.1016/0304-3940(95)12192-7.

34. Bick RJ, Poindexter BJ, Kott MM, et al. Cytokines disrupt intracellular patterns of Parkinson's disease-associated proteins alpha-synuclein, tau and ubiquitin in cultured glial cells. *Brain Res* 2008;1217:203-212. doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.081.
35. Godoy MCP, Tarelli R, Ferrari C, Sarchi MI, Pitossi FJ. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain* 2008;131:1880-1894. doi: 10.1093/brain/awn101.
36. Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci Lett* 2010;468:56-58. doi: 10.1016/j.neulet.2009.10.062.
37. Scalzo P, Kümmer A, Cardoso F, Teixeira AL. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *J Neuroimmunol* 2009;216:122-125. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.08.001.
38. Miles EA, Allen E, Calder PC. In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. *Cytokine* 2002;20:215-223. doi: 10.1006/cyto.2002.2007.
39. Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TM, Frøkiaer H. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines – A comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *J Immunol Methods* 2009;340:95-101. doi: 10.1016/j.jim.2008.10.005.

40. Fokkema SJ. Peripheral blood monocyte responses in periodontitis. *Int J Dent Hyg* 2012;10:229-235. doi: 10.1111/j.1601-5037.2012.00572.x.
41. Schildberger A, Rossmanith E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm* 2013;2013:697972. doi: 10.1155/2013/697972.
42. Beenakker KGM, Westendorp RGJ, Craen AJM, et al. Pro-inflammatory capacity of classically activated monocytes relates positively to muscle mass and strength. *Aging Cell* 2013;12:682-689. doi: 10.1111/accel.12095.
43. Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, et al. SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2003;18:467-486. doi: 10.1002/mds.10459.
44. Lang AF, Fahn S. Assessment of Parkinson's disease. In: Munsat TL Ed. *Quantification of Neurologic Deficit*. Boston: Butterworth, 1989; p. 285-309.
45. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967;17:427-442. doi: 10.1212/WNL.17.5.427.
46. Heimbeck I, Hofer TPJ, Eder C, et al. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry Part A* 2010;77A: 823-830. doi: 10.1002/cyto.a.20942.
47. Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, et al. 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* 2008;441:158-162. doi: 10.1016/j.neulet.2008.06.040.
48. Varani K, Vincenzi F, Tosi A, et al. A_{2A} adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF α levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *FASEB J* 2010;24:587-598. doi: 10.1096/fj.09-141044.

49. Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M. IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 1999;53:141-145. doi: 10.1016/S0753-3322(99)80079-1.
50. Hasegawa Y, Inagaki T, Sawada M, Suzumura A. Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 2000;101:159-164. doi: 10.1034/j.1600-0404.2000.101003159.x.
51. Stypuła G, Kunert-Radek J, Stępień H, Żylińska K, Pawlikowski M. Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 1996;3:131-134. doi: 10.1159/000097237.
52. Gangemi S, Basile G, Merendino RA, et al. Effect of levodopa on interleukin-15 and RANTES circulating levels in patients affected by Parkinson's disease. *Mediators Inflamm* 2003;12:251-133.
53. Hofmann KW, Schuh AFS, Saute J, et al. Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2009;34:1401-1404. doi: 10.1007/s11064-009-9921-z.
54. Kubera M, Maes M, Budziszewska B, et al. Inhibitory effects of amantadine on the production of pro-inflammatory cytokines by stimulated in vitro human blood. *Pharmacol Rep* 2009;61:1105-1112. doi: 10.1016/S1734-1140(09)70173-2.
55. Xiong Y, Pennini M, Vogel SN, Medvedev AE. IRAK4 kinase activity is not required for induction of endotoxin tolerance but contributes to TLR2-mediated tolerance. *J Leukoc Biol* 2013;94:291-300. doi: 10.1189/jlb.0812401.

56. Sun Y, Li H, Sun MJ, Zheng YY, Gong DJ, Xu Y. Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*: alternations in toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway. *Inflammation* 2014;37:268-276. doi: 10.1007/s10753-013-9737-5.
57. Siedlar M, Frankenberger M, Benkhart E, et al. Tolerance induced by the lipopeptide Pam₃Cys is due to ablation of IL-1R-associated kinase-1. *J Immunol* 2004;173:2736-2745. doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2736.
58. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, et al. α -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J*, 2003;17:1945-1947. doi: 10.1096/fj.03-0098fje.
59. El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, et al. Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J*, 2006;20:419-425. doi: 10.1096/fj.03-1449com.
60. Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 2006;113:1435-1439. doi: 10.1007/s00702-005-0427-9.
61. Roodveldt C, Labrador-Garrido A, Gonzalez-Rey E, et al. Preconditioning of microglia by α -synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation. *PLoS One* 2013;8: e79160. doi: 10.1371/journal.pone.0079160.
62. Hoffmann O, Braun JS, Becker D, et al. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *J Immunol* 2007;178:6476-6481. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6476.
63. Babcock AA, Wirenfeltdt M, Holm T, et al. Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *J Neurosci* 2006;26:12826-12837. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4937-05.2006.

Figure legends

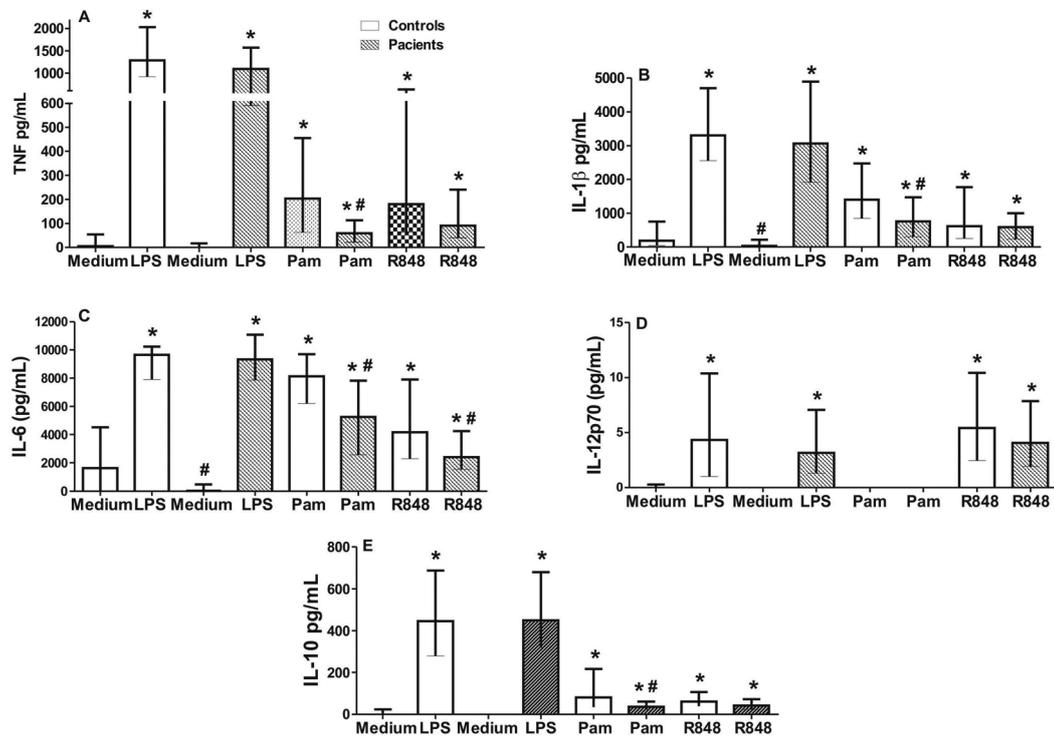


FIG. 1. TLR2- and TLR7/8-activated whole blood cell cultures of patients with Parkinson's disease produce lower amounts of cytokines than controls. Whole blood cell cultures were treated with TLR4 (LPS), TLR2 (Pam3Cys, Pam), or TLR7/8 (R848) agonists, at 100 ng/mL each, for 24 h. Cytokines were measured in supernatants using CBA kit. (A) TNF. (B) IL-1 β . (C) IL-6. (D) IL-12p70. (E) IL-10. Data represent median and interquartile range (n = 30–31). * p < 0.05 (medium vs TLR agonist; Wilcoxon paired test); # p < 0.05 (patients vs controls; Mann Whitney U test).

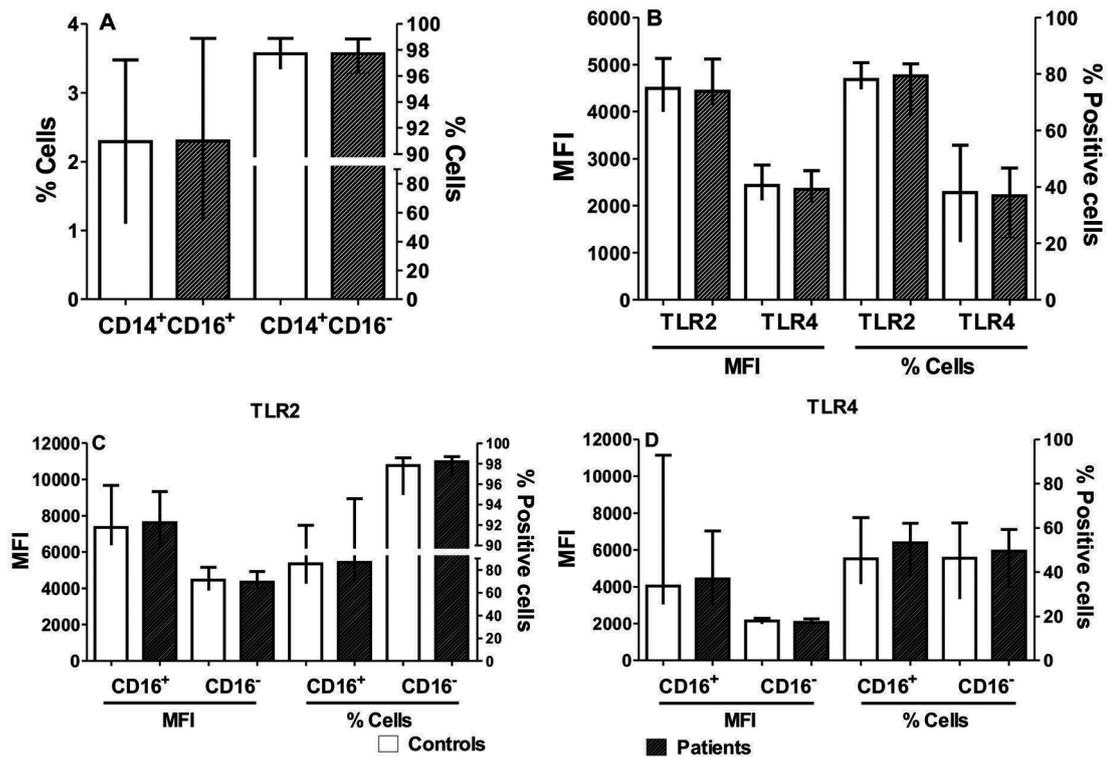


FIG. 2. Evaluation of monocytes and their expression of TLR2 and TLR4 in patients with Parkinson's disease. Fresh peripheral blood was incubated with antibodies against CD14, CD16, TLR2, or TLR4 and percentage of cells or mean fluorescence intensity (MFI) of TLR2/TLR4 were assessed. (A) and (B) expression of CD16, TLR2, and TLR4 in monocytes (identified by FSC × SSC). (C) TLR2. (D) TLR4 expressed on CD14⁺ monocyte CD16⁻ or CD16⁺ subsets. Data represent median and interquartile range (n = 30).

Table legend

TABLE 1. Demographic and clinical characteristics of patients with Parkinson's disease (PD) and healthy controls^a

Variable	Patients	Controls	<i>p</i>
Age (years)	56 (44-68)	52 (32-69)	0.30
Age of PD onset (years)	50 (36-61)	-	
Disease duration (years)	4 (1-20)	-	
UPDRS	19 (9.5-42.0)	-	
H&Y	2 (1.0-2.50)	-	
Blood leukocytes (mm ³)	6,000 (3,100-10,000)	6,150 (4,000-10,400)	0.61
Male (M)/Female (F)	22 M/9 F	22 M/9 F	

^a31 patients with PD and 31 healthy controls were paired by gender and age; data represent median (minimum–maximum) values.

Abbreviations: UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale; H&Y, Hoehn-Yahr Staging Scale.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a neuroinflamação na DP e uma investigação sobre o perfil de resposta dos leucócitos do sangue periférico, de pacientes com DP, a agonistas de TLR. Neste trabalho, uma análise das subpopulações de monócitos e a expressão de TLR2 e TLR4 nestas células foram realizadas com o objetivo de verificar se as alterações nas respostas aos agonistas de TLR seriam explicadas por alterações nestas subpopulações.

A causa da DP, apesar de inúmeros estudos e progressos obtidos nos últimos anos ainda permanece desconhecida. Várias hipóteses têm sido aventadas para explicar a perda neuronal dopaminérgica da *pars compacta* da substância negra mesencefálica. No entanto, de uma forma geral, duas correntes têm sido consideradas principais: fatores exógenos ambientais e os fatores intrínsecos (Hunot & Hirsch 2003, Hirsch et al. 2013). Recentemente, estudos têm demonstrado que a exposição a agentes infecciosos seria um fator causal da DP, que, em última instância, poderia promover neuroinflamação direta ou mediada pelo sistema imune (Diaz-Corales et al 2004, Jang et al 2009, Ulusoy et al. 2010).

Considerando a participação da neuroinflamação e da imunomediação na DP, o contato com agentes infecciosos pode levar à ativação da micróglia que, sob estímulo persistente e repetitivo, pode adquirir capacidade de célula apresentadora de antígeno, fagocitária e pró-inflamatória, por meio de citocinas e quimiocinas, favorecendo a entrada de leucócitos do sangue

periférico no cérebro. Um desequilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios pode favorecer o aparecimento de um processo inflamatório crônico, com persistente ativação da micróglia, favorecendo o microambiente cerebral à produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), dentre outros fatores inflamatórios (óxido nítrico, prostaglandinas, histaminas, espécies intermediárias de oxigênio), tóxicos para os neurônios dopaminérgicos, com consequente neurodegeneração na DP. Vários estudos tem sido realizados no sentido de esclarecer esta hipótese (Dufek et al. 2009, Reale et al. 2009, Hirsch et al 2013).

A revisão bibliográfica aqui apresentada aponta a participação de células da imunidade inata no SNC e na periferia que podem estar envolvidas na etiopatogênese da DP. Dentre elas, a micróglia e os monócitos são células que expressam diferentes TLR e podem responder a estímulos de DAMPs ou PAMPs, gerando substâncias inflamatórias potencialmente lesivas aos neurônios dopaminérgicos. A infiltração do SNC por células do sangue periférico, especialmente de monócitos, os quais podem dar origem a micróglia, pode contribuir para a imunopatogênese da DP.

No presente estudo, foi investigado o estado funcional dos leucócitos do sangue periférico frente à ativação de TLR, baseado na hipótese de que a neuroinflamação na DP pode ser modulada por células sanguíneas periféricas, após exposição a substâncias indutoras de processo inflamatório; ou ainda, que alterações no SNC, durante a neuroinflamação, podem levar a alterações do estado funcional dos leucócitos do sangue periférico. Em nosso estudo, os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6) foram similares em ambos os grupos, pacientes e controles. Em relação às citocinas IL-12p70 e IL-10, as concentrações eram muito baixas, não sendo

detectadas diferenças significantes entre os pacientes e controles. Estudo prévio tem demonstrado aumento dos níveis de citocinas – TNF, IL-6, IL-10 e outras citocinas em pacientes com DP (Brodacki et al. 2008). Scalzo et al. (2010) encontraram um aumento de IL-6 no sangue periférico em pacientes com DP, quando comparados com indivíduos saudáveis. Quanto à participação de citocinas em processo neurodegenerativo, Magaki et al. (2007) encontraram, no plasma de pacientes com doença de Alzheimer, outra frequente doença neurodegenerativa, aumento de IL-6, IL-8, IL-10. Estes achados diferem do nosso estudo, em que os níveis séricos dessas citocinas foram semelhantes entre pacientes com DP e controles.

É importante ressaltar que durante as infecções sistêmicas ocorre resposta inflamatória com a produção de TNF e IL-1 β , podendo, desta forma, aumentar o tráfego de células para o SNC, inclusive de monócitos, contribuindo para a neuroinflamação, pois os monócitos podem se diferenciar em micróglia no SNC (Banks et al. 2000, Dobbs et al. 2008, Drevets et al. 2010). Estudo avaliando os níveis de citocinas no LCR de pacientes com DP e DA mostrou uma elevação do nível de IL-1 β em comparação com controles (Blum-Degen et al. 1995). Porém, esse mesmo estudo mostrou que, no plasma, as concentrações de citocinas estavam elevadas, mas sem atingir diferença significativa em relação ao controle e também demonstrou a elevação da concentração da IL-6 no LCR de pacientes com DP e DA, quando comparado com os controles. Entretanto, no plasma, a IL-6 estava reduzida na DP e DA em comparação aos controles, porém, não foi observada significância estatística. Esses achados da IL-1 β e da IL-6 estão em consonância ao nosso estudo. Todavia, entendemos que a presença de níveis elevados destas citocinas no LCR podem refletir a existência de processo neuroimunológico

e inflamatório nas doenças neurodegenerativas, em particular na DP, mesmo que em alguns estudos, bem como no nosso, os níveis séricos de citocinas não estejam significativamente alterados. A realização de novas pesquisas poderia elucidar a importância ou não do papel das citocinas séricas neste processo. Ainda, seria importante um trabalho mais extenso para subdividir os grupos de acordo com a idade, uma vez que os nossos resultados sugerem uma tendência de níveis mais elevados de citocinas séricas nos pacientes mais jovens (dados não mostrados).

Nosso estudo mostrou que em hemoculturas de pacientes com DP houve menor produção das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10 em resposta a agonista Pam3Cys/TLR2 e diminuição da IL-6, quando as culturas foram ativadas com R848/TLR7/8. A estimulação das culturas com LPS (TLR4) induziu concentrações semelhantes de citocinas nos pacientes com DP e controles. Diferente dos nossos achados, Hasegawa et al. (2000) mostraram níveis significativamente baixos de TNF, IL-1 β e IL-6 em culturas de PBMC de pacientes com DP, ativadas com LPS, quando comparados com os controles sadios. Mostraram ainda, que monócitos, isolados por aderência, produziam quantidades mais baixas de TNF nos controles. Todavia, a IL-10 não foi significativamente diferente entre os grupos, similar aos resultados encontrados no nosso estudo. Sawada et al. (2006) descreveram um declínio progressivo de IL-10 após infecção viral do SNC e mostraram que este foi inversamente proporcional ao aumento de citocinas inflamatórias, indicando o papel regulador da IL-10 na inflamação. Resultados contraditórios foram encontrados no estudo de Bessler et al. (1999). Eles mostraram que as PBMC de pacientes com DP produziram níveis mais elevados de IL-1 β e IL-6, após a ativação com LPS, do que os controles. A discrepância dos

resultados pode ser explicada pelas diferentes técnicas utilizadas entre os estudos (cultura de sangue total vs cultura de PBMC), que avaliaram somente respostas a LPS/TLR4.

No presente estudo, não foi encontrada uma associação entre os escores de UPDRS e as concentrações de citocinas, diferentemente de Varani et al. (2010) que encontraram uma correlação positiva entre os níveis séricos de TNF e os escores motores da UPDRS-III em pacientes com DP. Outro estudo realizado por Reale et al. (2009) mostrou que as concentrações de TNF e IL-1 β estavam significativamente aumentadas nos pacientes com DP em relação aos controles e também em relação ao aumento dos escores da UPDRS III. Outros investigadores não conseguiram confirmar esta correlação (Dufek et al. 2009). Interessante trabalho de Çomoglu et al. (2013) encontrou aumento significativo de TNF em lágrimas de pacientes com DP em relação aos controles. Porém, não demonstrou evidência de associações entre os níveis de TNF e a idade, início e duração da doença ou UPDRS, à semelhança dos nossos achados. Esses dados controversos sobre os níveis de citocinas séricas podem ser explicados com base nos diferentes níveis de gravidade dos sintomas motores e não motores, avaliados pela UPDRS em pacientes com DP.

Quanto à escala HY, nosso estudo mostrou que os escores dos pacientes com DP apresentaram estágios de leve a moderado (1, 2, 3) e não houve correlação com os níveis de citocinas. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Çomoglu et al. (2013). Por outro lado, uma correlação negativa entre escores H&Y e a produção de IL-1 β e IL-6, estimuladas por LPS em culturas de PBMC de pacientes com DP, foi observada nos estágios mais avançados da doença (Hasegawa et al., 2000). A correlação negativa

encontrada no trabalho pode sugerir que o tratamento com a levodopa ou a própria evolução da doença estaria influenciando a reação imune. Diferente do nosso estudo, Reale et al (2009) mostraram que o TNF e a IL-1 β estavam significativamente aumentados no sangue de pacientes com DP em relação aos controles, havendo uma correlação positiva com o aumento dos escores HY. No estudo de Varani et al. (2010), o nível sérico de TNF encontrava-se aumentado nos pacientes com DP, quando pareados com os controles, associado aos escores da HY.

Em relação à ativação de hemoculturas com o agonista TLR2, foi detectada uma diminuída resposta, resultado inesperado diante da nossa hipótese de haver uma resposta inflamatória periférica elevada nos pacientes com DP. O presente estudo mostrou que a capacidade dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes em responder a determinados agonistas de TLR estava diminuída, apesar de não ter mostrado diferenças significantes entre as concentrações séricas de citocinas entre pacientes e controles. Em seguida, a investigação dos monócitos ocorreu porque em hemoculturas, estas são as células que mais contribuem para a produção de citocinas, após a ativação via TLR.

Nosso estudo mostrou que os percentuais dos monócitos CD14⁺CD16⁺ ou CD14⁺CD16⁻ não estavam significativamente alterados nos pacientes com DP, nem a expressão de TLR2 e TLR4 nestas células estava significativamente alterada. Esses resultados são similares aos encontrados por Funk et al. (2013) que avaliaram receptores de quimiocinas em subgrupos de monócitos, mas não relataram alterações na proporção das subpopulações de monócitos em pacientes com DP. Neste mesmo estudo, no grupo de indivíduos assintomáticos com fator de risco geneticamente elevado para DP por

mutação LRRK2 em comparação aos pacientes com DP, mostrou elevação de precursores de monócitos, o que poderia, ao longo do tempo, contribuir para neurodegeneração e consequente aparecimento da DP nestes indivíduos.

Nós não encontramos diferença significativa entre a expressão de TLR2, como também de TLR4, em monócitos de pacientes e controles. Tem sido descrito que monócitos CD16⁺ expressam níveis mais elevados de TLR2 do que monócitos CD16⁻ (Belge et al., 2002), o que está de acordo com os nossos resultados (Artigo 2; Figura 2C, MFI de TLR2 em monócitos CD14⁺, CD16⁺ vs CD14⁺ CD16⁻, tanto em pacientes como nos controles com $p < 0,05$). No entanto, não foram detectadas diferenças entre pacientes com DP e controles no presente estudo. Sabe-se que a estimulação prévia das células, via TLR pode torná-las tolerantes a uma re-estimulação com agonista de TLR (Sun et al., 2013; Xiong et al., 2013). Tolerância a TLR é um mecanismo para impedir a produção elevada de citocinas que podem ser prejudiciais ao organismo, quando as células são expostas a repetidas estimulações de TLR. Tem sido descrito que a liberação de DAMP, que se liga à TLR2, ocorre durante a neuroinflamação na DP. Nesse contexto, a α -sinucleína, que é uma proteína citoplasmática, foi detectada em níveis elevados no plasma e no LCR de pacientes com DP (El-Agnaf et al. 2003, Lee et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que a α -sinucleína é um DAMP que ativa TLR2 na micróglia de rato, induzindo resposta inflamatória (Kim et al. 2013). Além disto, Codolo et al. (2013) mostraram que essa proteína aciona TLR2 em monócitos humanos, induzindo a síntese de IL-1 β . A α -sinucleína pode alterar a resposta da micróglia para TLR2 e TLR7 e favorecer a sua ativação por PAMPs, levando a um processo de degeneração na DP, classificando esta doença como uma sinucleinopatia (Roodveldt et al., 2013). Nós sugerimos

que durante a DP, a α -sinucleína presente no sangue pode se ligar a TLR2 nos monócitos, causando uma inibição de futuras respostas a agonistas de TLR2 nestas células, o que explicaria a diminuída produção de citocinas nas hemoculturas dos pacientes com DP no presente estudo.

Os dados do presente estudo abrem a possibilidade para a realização de pesquisas futuras que visem avaliar a ligação de DAMPs, como a α -sinucleína ou outras proteínas endógenas, com os TLR, gerando possíveis esclarecimentos de mecanismos da neuroinflamação, que provocariam, em última instância, a morte de neurônios dopaminérgicos na DP. Para isto, o isolamento de monócitos deve ser realizado e as subpopulações separadas devem ser analisadas quanto à expressão e funcionamento de TLR2 e seus pares, o TLR1, TLR6 e TLR10 (van Bergenhenegouwen et al., 2013; Mikacenic et al., 2012).

6. CONCLUSÕES

- Em pacientes com DP, as concentrações séricas de citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 foram similares àquelas dos controles;
- Em hemoculturas de pacientes com DP as produções de TNF, IL-1 β , IL-6 em resposta à estimulação de TLR2 foram menores do que as dos controles; e a concentração de IL-6, quando as culturas foram ativadas com agonista de TLR7/8, estava diminuída em relação à dos controles;
- As porcentagens das subpopulações de monócitos CD14+CD16- e CD14+CD16+ no sangue periférico de pacientes com DP não estavam significativamente alteradas, assim como a expressão de TLR2 e TLR4 nestas subpopulações;
- Na avaliação da gravidade da DP pela UPDRS não foi encontrada associação com as concentrações de citocinas, assim como com os escores da escala HY;
- Os dados do estudo abrem novas perspectivas para a avaliação de monócitos na DP, investigando moléculas endógenas, tais como a alfa-sinucleína, como ligante de TLR2, para uma melhor compreensão da neuroinflamação na etiopatogenia da DP.

REFERÊNCIAS

BANKS WA, FARRS SA, MONKEY JE. Entry of blood-bone cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation*, vol. 3, p. 319-327, 2002.

BELGE KU, DAYYANI AF, HORELT M, SIEDLAR M, FRANKENBERGER B, FRANKENBERGER T, ESPEVIK L, ZIEGLER-HEITBROCK. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol*, vol. 168, p. 3536-3542, 2002.

BESSLER H, DJALDETTI R, SALMAN H, BERGMAN M, DJALDETTI M. IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*, vol. 53, p. 141-145, 1999.

BLUM-DEGEN D, MULLER T, KUHN W et al. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluido of Alzheimer's and Parkinson's diseases patientes. *Neuroscience Letters*, vol. 202, p. 17-20, 1995.

BRODACKI B, STASZEWSKI J, TOCZYŁOWSKA B, et al.. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*, vol. 441, p. 158-162, 2008.

CODOLO G, PLOTEGHER N, POSSOBON T et al. Triggering of inflammation by aggregated α -synuclein, and inflammatory response in synucleinopathies. *PLOS on*, vol. 8, p. 1-12, 2013.

ÇOMOGLU SS, GÜVEN H, ACAR M, ÖZTÜRK G, KOÇER B. Tear levels of tumor necrosis factor- α in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, p. 1-5, 2013.

CROS J, CAGNARD N, Woollard k et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, vol. 33, n. 3, p. 375-386, 2010.

DÍAZ-CORRALES, FJ; COLASANTE, C; CONTRERAS, Q; PUIQ, M; SER-RANO, JA; HERNÁNDEZ, L; BEAMAN, BL *Nocardia otiitidiscaviarum* (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. *Braz. J. Med. Biol. Res*, vol. 37, p. 539-548, 2004.

DOBBS, RJ; DOBBS, SM.; WELLER C; CHARLET, A; BJARNASON, IT; CURRY, A; et al. Helicobacter hypothesis for idiopathic parkinsonism: before and beyond. *Helicobacter*, vol. 1, n. 3, p. 309-322, 2008.

DREVETS, DA; DILLON, MJ; SCHAWANG, JE; STONER, JA; LEENEN, PJM. IFN γ triggers CCR2-independent monocyte entry into the brain during systemic infection by virulent *Listeria monocytogenes*. *Brain Behav. Immun*, vol. 24, p. 919-929, 2010.

DUFEK M, HAMANOVÁ J, LOKAJ D, GOLDEMUND L, REKTORAVÁ Z, MI-
CHÁLKOVÁ K et al. Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease.
Parkinsonism Relat. Disord, vol. 15, p. 318-320, 2009.

EL-AGNAF OMA, SALEM SA, PALEOLOGOU KE et al. α -Synuclein implicat-
ed in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including
human plasm. *FASEB J*, vol. 15, p. 1-16, 2003.

FUNK N, WIEGHOFFER P, GRIMM S, SCHAEFER R, BÜHRING HJ, GASSER
T AND BISKUP S. Characterization of Peripheral Hematopoietic Stem Cells
and Monocytes in Parkinson's disease. *Mov Disord*, vol. 28, n. 3 p. 392-395,
2013.

HASEGAWA Y, INAGAKI T, SAWADA M, SUZUMURA A. Impaired cytokine
production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macro-
phages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, vol. 101, p.159-164, 2000.

HENEKA MT, RODRIGUEZ JJ, VERKHRATSKY A. Neurologia in neurode-
generation. *Brain Res Rev*, vol. 63, n. 1-2, p. 189-211, 2010.

HOEHN MM, YAHR MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality.
Neurology, vol. 17, n. 5, p. 427-42, 1967.

HIRSCH EC, JENNER P, PHARM S, AND PRZEDBORSKI S. Pathogenesis of
Parkinson's disease. *Mov Disorders*, vol. 28, n. 1, p. 24-30, 2013.

HUNOT, S.; HIRSCH, E.C. Neuroinflammatory process in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*, vol. 53 (sup l3), p. 49-60, 2003.

JANG, H; BOLTZ, D; STURM-RAMIREZ, K; SHEPHERD, KR; JIAO, Y; SM-EYNE, RJ. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *PNAS*. U.S.A, vol. 106, p. 14063-14068, 2009.

KIM C, HO D, SUK J, YOU S, MICHAEL S, KANG J, LEE SJ, et I. Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nature Communication*, vol. 4, p. 1562, 2013.

LEE PH, LEE G, PARK HJ, BANG OY, JOO IS, HUT K. The plasm α -synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm*, vol. 113, p. 1435-1439, 2006.

LEES AJ. The Parkinson chimera. *Neurology*, vol. 72, n. 7 (supl), p. 2-11, 2009.

LITVAN KP, BHATIA DJ, BURN CG, GOETZ AE, LANG L, McKEITH N et al. Wenning Movement disorders society scientific issues committee, Movement disorders society scientific issues committee reporte: SIC task force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov. Disord*, vol. 18, p. 467-486, 2003.

LANG AF, FAHN S. Assessment of Parkinson's disease. In: *Munsat TL* Ed. Quantification of Neurologic Deficit. Boston: Butterworth, p. 285-309, 1989.

MAGAKI, S.; MUELLER, C.; DICKSON, C.; KIRSCH, W. Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment. *Exp. Gerontol.* vol. 42, p. 233-240, 2007.

MIKACENIC C, REINER AP, HOLDEN TD, NICKERSON DA, WURFEL MM. Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 locus is the major genetic determinant of interindividual difference in TLR1/2-mediated responses. *Genes Immun*, vol. 14, n. 1, p. 52-57, 2013.

NOELKER C, MOREL L, LESCOT T, OSTERLOH A, ALVAREZ-FISCHER D, BRELOER M, et al. Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. *Sci Rep*, vol. 3, p. 1393, 2013.

ORR CF, ROWE DB, HALLIDAY GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, vol. 68, n. 5, p. 325-40, 2002.

REALE M, IARLORI C, THOMAS A, GAMBI D, PERFETTI B, DI NICOLA M, ONOFRJ M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*, vol. 23, p. 55-63, 2009.

ROODVELDTC, LABRADOR-GARRIDO A, GONZALEZ-REY E, et al. Preconditioning of Microglia by α -Synuclein Strongly Affects the Response Induced by Toll-like Receptor (TLR) Stimulation., vol. 8, n. 11, p. e79160, 2013.

SAWADA M, IMAMURAK, NAGTSU T. Role of Cytokines in Inflammatory process in Parkinson's disease. *J. Neural Transm*, vol. 70, p. 373-381, 2006.

SCALZO, P; KÜMMER A.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA A. L. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neurosci. Lett.* vol. 468, p. 56-58, 2010.

ULUSOY A, DEGRESSAC M, KIRIK D, BJORKLUND A. Viral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Prog Brain Res*, vol. 184, p. 89-111, 2010.

VAN BERGENHENEGOUWEN J, PLANTINGA TS, JOOSTEN LA, NETEA MG, FOLKERTS G, KRANEVELD AD, GARSSSEN J, VOS AP. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. *J Leukoc Biol* vol. 24, n. 5 p. 885-902, 2013.

VARANI K, VINCENZI F, TOSI A, et al. A_{2A} adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF α levels, correlated with motor symptoms in Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, vol. 24, p. 587-598, 2010.

VERBAAN D, MARINUS J, VISSER M, VAN ROODEN SM, STIGGILBOUT AM, VAN HILTEN JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology*, vol. 69, n. 4, p. 333-41, 2007.

ZOZULYAAL, CLARKSON BD, ORTLER S, FABRY S, WIENDL H. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*, vol. 88, n. 6, p., 536-44, 2010.

ANEXO A:

PROTOCOLO CEP/UFMG



PROTOCOLO CEP/HC/UFMG Nº 092/2011

Goiânia, 11/08/2011

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: *Dr. Delson José da Silva*

ORIENTADOR: *Farmª. Fátima Ribeiro Dias*

PESQUISADORES PARTICIPANTES: *Profª. Patricia Resende Alo Loyola; Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira; Farmª. Miriam Leandro Dorta; Biolª. Arissa Leandro Borges; Dr. Antonio Lucio Teixeira Junior.*

TÍTULO- *“Avaliação de monicitos na doença de Parkinson: possíveis implicações na neuroinflamação”.*

Área Temática: *Grupo III*

Instituição Proponente: *IPATSP/UFMG*

Local de realização: *Instituto Integrado de Neurociência – HC/UFMG*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa **analisou e aprovou** o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFMG, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões). O relatório deverá ser entregue em CD devidamente assinado.

O CEP/HC/UFMG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*).


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEP/HC/UFMG

ANEXO B:

TCLE - PACIENTES E CONTROLES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Voce está sendo convidado(a) para participar, como voluntário em uma pesquisa. Meu nome é Delson Jose da Silva, sou o pesquisador responsável e minha área de atuação é neurologia. Após ler com atenção esta documento, ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer partes do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, voce poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Dr. Delson Jose da Silva no telefones (62) 4011-9191. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, voce poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269-8338 / 3269-8426 ou no endereço: 1ª Avenida S/Nº Setor Leste Universitário - Prédio da FUNDAH - 1º andar.

Informações sobre o que voce precisa saber sobre esta pesquisa

Título: Avaliação da imunidade natural da patogenia da doença de Parkinson: possíveis implicações de receptores similares a toll na neuroinflamação.

Pesquisador responsável: Delson Jose da Silva orientado pela Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias

Descrição da Pesquisa

A doença de Parkinson é uma doença progressiva que afeta muitos indivíduos principalmente os idosos. Neste estudo queremos avaliar possíveis alterações que levem o possível descobrimento da causa da doença, dentre elas se há algum processo infeccioso-inflamatório que, voce possivelmente tenha entrado em contato em alguma época da sua vida. Para isso, estaremos pesquisando, no seu sangue, a presença ou não de algum fator que comprove este contato e sua ligação com a doença. Este conhecimento poderá auxiliar na descoberta de novas formas de tratamento e prevenção da doença de Parkinson.

Procedimento da Pesquisa

Caso você aceite em participar da pesquisa, serão coletados 10 mL de sangue em um tubo a vácuo contendo anticoagulante. Este sangue será rotulado com um código contendo as três primeiras letras do seu nome, seguido de sua idade e sexo. Um número de identificação no local onde será coletado o sangue será levado com intuito apenas de saber o resultado da sua sorologia. Nenhuma informação adicional será levada ao Laboratório de Pesquisa do IPTSP além destas. Ressaltamos que sua participação é voluntária e não irá além da coleta dos 10 mL de sangue que será levada para o Laboratório do IPTSP, não havendo nenhum tipo de risco à sua saúde ou integridade física, a não ser os riscos mínimos de uma coleta de sangue. Entretanto, caso algum dano a sua pessoa seja causado pelo desenvolvimento desta pesquisa, você tem o direito de solicitar indenização pelo dano causado. Não haverá nenhum benefício direto a sua pessoa por esta pesquisa, porém, você estará contribuindo para estudos que tentam melhorar a qualidade de vida de pessoas com doença de Parkinson.

Indenizações

Voce terá o direito de pleitear indenização em caso de danos e ressarcimento de despesas decorrentes de sua participação nesta pesquisa referentes.

Não haverá nenhum tipo de remuneração ou compensação pela sua participação neste estudo nem pelos pesquisadores e nem por parte do Hospital das Clínicas, nem do IINEURO e nem do INGOH. Também, não haverá atendimento especial e nenhuma outra forma de privilégio quanto a horário de atendimento e marcação de consultas.

Confidencialidade

Os resultados da pesquisa serão usados apenas pelos pesquisadores do projeto para fins científicos. Nenhum resultado individual que possibilite a sua identificação será divulgado. Você poderá desistir do consentimento a qualquer momento da pesquisa sem qualquer ônus.

Goiânia, _____.

Nome do pesquisador/colaborador

Assinatura do pesquisador/colaborador

ANEXO C:
ESCALAS UPDRS E HY

ESCALA UNIFICADA DE AVALIAÇÃO PARA DOENÇA DE PARKINSON - UPDRS																	
Nome						Examinador											
Data																	
DOPA comp./dia			Duração DOPA														
Forma AADCI : [B]Benserazida [C] Carbidopa																	
ON /OFF																	
I - Atividade Mental e Humor (Pontuar de 0 a 4)																	
1	Deterioração intelectual																
2	Transtornos do pensamento																
3	Depressão																
4	Motivação/Iniciativa																
Subtotal (Máximo = 16)																	
II - Atividade de Vida Diária (Pontuar de 0 a 4)																	
5	Linguagem Falada																
6	Sialorréia																
7	Deglutição																
8	Escrita																
9	Cortar Alimento																
10	Vestir-se																
11	Higiene																
12	Virar na cama / Ajustar lençóis																
13	Queda sem rotação																
14	Congelamento																
15	Marcha																
16	Tremor																
17	Alterações sensitivas da DP																
Subtotal (Máximo = 52)																	
III - Exame Motor (Pontuar de 0 a 4)																	
18	Linguagem Falada																
19	Expressão Facial																
20	Tremor de repouso					D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
	A – Face, lábios, queixo																
	B – mãos																
	C – pés																
21	Tremor de ação ou postural das mãos																
22	Rigidez					D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
	A – Membros superiores																
	B – Membros inferiores																
	C – Pescoço																
23	Destreza Digital					D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
24	Extensão / Flexão das mãos																
25	Pronação / Supinação das mãos																
26	Agilidade de Pernas																
27	Levantar-se de uma cadeira																
28	Postura																
29	Marcha																
30	Estabilidade Postural																
31	Bradicinesia / Hipocinesia																
Subtotal (Máximo = 108)																	
Estadiamento de HOEHN e YAHR																	
Escala de Atividade Diária - %																	
Discinesias – ON/OFF																	
	A - Duração																
	B - Intensidade																
	C -Dor																
	D - Distonia Matinal																

Adaptação: Fahn S, Elton R, Members of the UPDRS Development Committee. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M, eds. Recent Developments in Parkinson's Disease, Vol 2. Florham Park, NJ. Macmillan Health Care Information 1987, pp 153-163, 293-304.

ANEXO D:
PORTARIA 2.712/2013

Link:

http://www.hemominas.mg.gov.br/export/sites/default/hemominas/menu/aInstituicao/legislacao/portaria_2712_de_12_novembro_2013.pdf

ANEXO E:
COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO ARTIGO 1

Link:

http://www.lamsj.org/detalhe_artigo.asp?id=94

ISSN 2238-3247

Latin American
Multiple Sclerosis
Journal



VOLUME 2 | NUMBER 4 | DECEMBER 2013

- *Imaging techniques in early MS*
- *Neuroinflamação na Doença de Parkinson*
- *Neuromusicoterapia em pacientes com EM com síndrome cerebelar*
- *HTLV-1 associated myelopathy treated with azathioprine*
- *Encefalomielite disseminada aguda multifásica*
- *Cochrane review summary: Vitamina D e esclerose múltipla*

www.lamsj.org

Christian Confavreux (Lyon, França - 1949-2013).....	167
Marcos Moreira	
Role of imaging techniques in early detection of adult and pediatric clinically and radiologically isolated syndrome subjects.....	169
<i>Papel dos métodos de imagem na detecção precoce de indivíduos adultos e pediátricos com síndrome clinicamente e radiologicamente isolada</i>	
<i>Papel de los métodos de imagen en la detección precoz en pacientes adultos y pediátricos con síndrome clínica y radiológicamente aislada</i>	
Mihael Varosanec, Roberto Cappellani, Tereza Gabelic, Robert Zivadinov	
Neuroinflamação na Doença de Parkinson.....	178
<i>Neuroinflammation in Parkinson's Disease</i>	
<i>Neuroinflamación en la Enfermedad de Parkinson</i>	
Delson José da Silva, Tereza Raquel Alcântara-Silva, Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho, Milton Adriano Pelli de Oliveira, Fátima Ribeiro-Dias	
Neuromusicoterapia em pacientes com esclerose múltipla com síndrome cerebelar: um estudo piloto.....	187
<i>Neuro-Music therapy in multiple sclerosis patients with cerebellar syndrome: a pilot study</i>	
<i>Neuromusicoterapia en pacientes con esclerosis múltiple con síndrome cerebeloso: un estudio piloto</i>	
Shirlene Vianna Moreira, Marcos Moreira	
HTLV-1 associated myelopathy treated with azathioprine: a case report.....	191
<i>Mielopatia associada a HTLV-1 tratada com azatioprina: um relato de caso</i>	
<i>Mielopatia asociada a HTLV-1 tratada con azatioprina: un relato de caso</i>	
Carlos Bernardo Tauil, Liana Chaul Sfair, Alexandra Lorde Saliba, Keydson Agustine Sousa Santos, Murilo Brito Luiz, Geanna Valentte de Medeiros Dias	
Encefalomielite disseminada aguda multifásica: relato de caso e revisão da literatura.....	194
<i>Multiphasic acute disseminated encephalomyelitis: case report and literature review</i>	
<i>Encefalomielitis diseminada aguda multifásica: reporte de caso y revisión de la literatura</i>	
Juvenal Rodrigo Padilha, Bianca Ribeiro Morais, Maciel Eduardo de Pontes	
Cochrane review summary.....	200
<i>Vitamina D e esclerose múltipla: o que diz a revisão sistemática?</i>	
<i>Vitamin D and multiple Sclerosis: what does the systematic review say?</i>	
<i>Vitamina D y esclerosis múltiple: lo que dice la revisión sistemática?</i>	
Tarso Adoni	

ANEXO F:

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

ScholarOne Manuscripts

27/06/14 13:23

ScholarOne Manuscripts™

Delson José Silva ▾ Instructions & Forms Help

 Movement Disorders

Main Menu / Author Dashboard / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Movement Disorders*.

Manuscript ID: MDS-14-0623

Title: Decreased toll-like receptor 2-induced cytokines in Parkinson's disease patients' blood cultures

Silva, Delson José
Borges, Arissa
Souza, Priscila
Souza, Patricia

Authors: Cardoso, Cristina
Dorta, Miriam
Oliveira, Milton
Teixeira, Antonio
Ribeiro-Dias, Fatima

Date Submitted: 27-Jun-2014

 Print  Return to Dashboard

SCHOLARONE™



© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

<http://mc.manuscriptcentral.com/mds>

Página 1 de 2

5/8/2014

Gmail - Movement Disorders - Paper submitted: MDS-14-0623



DELSON SILVA <delsonjsilva@gmail.com>

Movement Disorders - Paper submitted: MDS-14-0623

1 mensagem

julie@jjeditorial.com <julie@jjeditorial.com>
Para: delsonjsilva@gmail.com

30 de junho de 2014 16:23

30-Jun-2014

Dear Ms. Silva:

Your manuscript entitled "Decreased toll-like receptor 2-induced cytokines in Parkinson's disease patients' blood cultures" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Movement Disorders.

Your manuscript ID is MDS-14-0623. Please mention this manuscript ID in all future correspondence or when calling the Movement Disorders editorial office:

For submissions, direct questions to: Julie Nash, Managing Editor, Movement Disorders, email: julie@jjeditorial.com

Thank you for submitting your manuscript to Movement Disorders.

Sincerely,

Movement Disorders Editorial Office

https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=7d6cf65df3&view=pt&q=movement%20disorders&q_s=true&search=query&th=146ee3b7dd8c6d38&siml=146ee3... 1