



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

HERMÍNIO MAURÍCIO DA ROCHA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DE RECEPTORES SIMILARES A *TOLL* (TLRs) EM
MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON**

Goiânia
2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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

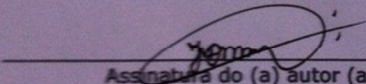
Nome completo do autor: **Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho**

Título do trabalho: **AValiação de receptores similares a TOLL (TLRs) em monócitos de pacientes com doença de Parkinson**

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 da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 19 / 06 / 2017.

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.

HERMÍNIO MAURÍCIO DA ROCHA SOBRINHO

**AVALIAÇÃO DE RECEPTORES SIMILARES A *TOLL* (TLRs) EM
MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON**

Tese de Doutorado
apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Medicina Tropical e
Saúde Pública da
Universidade Federal de
Goiás para obtenção do
título de Doutor em
Medicina Tropical e
Saúde Pública.

Orientadora: Dr^a Fátima Ribeiro Dias

Goiânia

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rocha Sobrinho, Hermínio Maurício da
AVALIAÇÃO DE RECEPTORES SIMILARES A TOLL (TLRs) EM
MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON
[manuscrito] / Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho. - 2017.
xix, 120 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2017.
Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Doença de Parkinson. 2. Monócitos. 3. Toll-like receptors . 4.
Citocinas. I. , Fátima Ribeiro Dias, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE HERMÍNIO MAURÍCIO DA ROCHA SOBRINHO - Aos dois dias do mês de junho do ano de 2017 (02/06/2017), às 8:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, DENISE SISTEROLLI DINIZ, MARCOS VINÍCIUS DA SILVA, RODRIGO SAAR GOMES e WILSON DE MELO CRUVINEL, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"AVALIAÇÃO DE RECEPTORES SIMILARES A TOLL (TLRS) EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON"** em nível de DOUTORADO, área de concentração em IMUNOLOGIA, de autoria de HERMÍNIO MAURÍCIO DA ROCHA SOBRINHO discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. FÁTIMA RIBEIRO DIAS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Dra. Fátima Ribeiro Dias
Dra. Denise Sisterolli Diniz
Dr. Marcos Vinícius da Silva
Dr. Rodrigo Saar Gomes
Dr. Wilson de Melo Cruvinel

Aprovado / Reprovado

Generado
Aprovado
APROVADO
Aprovado
Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Habilitado, (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em IMUNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11h 40 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Dra. Fátima Ribeiro Dias (IPTSP/UFG) Fátima Ribeiro Dias
Dra. Denise Sisterolli Diniz (HC/UFG) Denise Sisterolli Diniz
Dr. Marcos Vinícius da Silva (UFTM/MG) Marcos Vinícius da Silva
Dr. Rodrigo Saar Gomes (IPTSP/UFG) Rodrigo Saar Gomes
Dr. Wilson de Melo Cruvinel (PUC/GO) Wilson de Melo Cruvinel
Secretário da Pós-Graduação: Kariny Vieira Soares e Silva

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os professores de Imunologia do Brasil por buscarem a criatividade e sabedoria para facilitar o aprendizado desta bela ciência; aos Médicos Neurologistas que com muito amor e profissionalismo tratam dos pacientes portadores de doenças neurodegenerativas e aos pacientes portadores da doença de Parkinson que, voluntariamente, aceitaram participar deste estudo, sem os quais este trabalho não seria realizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Jesus Cristo, pela manutenção da minha vida, por me conceder paz, saúde, proteção e capacidade para a execução dos meus projetos, sonhos e atividades. A Ele seja toda honra, glória, louvor, poder, vitória e majestade pelos séculos dos séculos!!!

Aos meus pais, Hervínio Tomaz da Rocha, “*in memoriam*” e Vanderlita de Paula Rocha, pela oportunidade de estudar, inspiração, confiança, amor e apoio em tudo que faço, por serem uma grande referência para mim.

À minha amada e linda esposa, Valdenya Evanglista de Souza Rocha, pelo amor, incentivo, apoio, paciência nos momentos difíceis e lealdade.

À minha sogra, Valdeci Evangelista Nunes, pelo incentivo, apoio e carinho.

Ao meu querido irmão, Cristiano Saulo da Rocha, pela atenção, carinho, incentivo e apoio.

Este espaço é dedicado a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Não sendo possível citar a todos, há, no entanto, alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero:

À minha querida e ilustre amiga e orientadora Prof^a Dr^a Fátima Ribeiro-Dias, por me conceder a oportunidade do aprendizado da pesquisa em Imunologia, iniciado durante o estágio no Laboratório de Imunidade Natural do IPTSP-UFG, no Mestrado e agora na conclusão do Doutorado. Foram 7 anos intensos e prazerosos de muito aprendizado na minha vida pessoal e profissional. MUITÍSSIMO obrigado pelas oportunidades, pela minha formação como pessoa e profissional, por acreditar no meu potencial, nos meus sonhos, projetos e trabalho.

“Mulher virtuosa, quem a achará? O seu valor em muito ultrapassa o das mais finas jóias!” Provérbios 31:10

Ao meu prezado amigo Dr. Delson José da Silva, pela amizade, apoio e colaboração, por me acolher de forma especial e aceitar eu dar continuidade em sua pesquisa. “O olhar de amigo alegre e consola o coração, uma boa notícia revigora a alma” Provérbios 15:30

Ao meu prezado amigo e colega Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel, por ser um referencial para mim na docência e gestão, pela amizade, incentivo e apoio à pesquisa, por ter me apresentado à Profª Drª Fátima Ribeiro Dias assim que finalizei a graduação em Biomedicina.

À minha prezada amiga e colega de trabalho Profª MSc. Valéria B. Leite Quixabeira, pela amizade, apoio, por me ouvir e interceder por mim em momentos difíceis, pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo.

À Profª Drª Miriam Leandro Dorta pela amizade, apoio, ensinamentos e colaboração nos meus experimentos.

Ao Dr Rodrigo Saar Gomes pelo apoio, colaboração nos experimentos e amizade.

Ao Prof. Dr Milton Adriano Pelli de Oliveira pela amizade, apoio, ensinamentos e colaboração nos meus experimentos.

Aos professores do programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP-UFG pelo apoio e ensinamentos.

À Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso que de forma expressiva colaborou nos experimentos de dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA).

Às funcionárias do Instituto Integrado de Neurociências (IINEURO), Rosilene Ferreira da Silva pelo agendamento e orientação aos pacientes, à biomédica Pollyana Goularte Mesquita pela coleta sanguínea dos pacientes com doença de Parkinson.

Aos colegas do laboratório de Imunidade Inata do IPTSP-UFG: Iara Barreto, Larissa Gomides, Arissa Felipe, Natália Brandão, Lucas Lima, Muriel Vilela, Jéssica Cristina, Rodrigo Saar Gomes, Carolina, Grazielle Guimarães, pela amizade e colaboração nos meus experimentos.

À coordenação do Laboratório Clínico da PUC Goiás, Dr. Sérgio Henrique Nascente, pela colaboração na realização dos hemogramas e dosagens de proteína C-reativa nas amostras sanguíneas dos pacientes e indivíduos controles.

Aos professores que participaram da banca do exame de qualificação: Drª Simone Fonseca, Dr. Delson Silva e Dr. Wilson de Melo, pela disposição em colaborar com a qualidade deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do IPTSP-UFG, José Clementino de Oliveira Neto (Zezinho) e Kariny Soares, pela atenção, apoio e colaboração.

Aos funcionários do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da UFG pela colaboração com a doação de sangue para esta pesquisa.

Às pessoas da comunidade de Goiânia-GO, especialmente da minha igreja, que, voluntariamente, aceitaram participar deste estudo.

Aos pacientes portadores da doença de Parkinson atendidos no HINEURO, que, voluntariamente, aceitaram participar deste estudo.

Ao Comitê de Ética e Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG pela aprovação da pesquisa.

À FAPEG e ao CNPq pelo fomento da pesquisa.

Enfim, a todos os meus amigos que me incentivaram, apoiaram e trilharam juntamente comigo por este caminho...

Epígrafe

AMOR...

**“Pois de amor andamos todos precisados!
Em dose tal que nos alegre, nos reumanize, nos corrija,
nos dê paciência e esperança, força,
capacidade de entender, perdoar,
ir para a frente...”**

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

TABELAS E FIGURAS.....	xii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	1
1.1 Epidemiologia da doença de Parkinson	1
1.2 Etiopatogenia da doença de Parkinson	1
1.3 Neuroinflamação na doença de Parkinson	3
1.4 Monócitos e <i>Toll-like receptores</i> (TLRs) na doença de Parkinson	4
2.OBJETIVOS	8
3. MANUSCRITOS	
MANUSCRITO 1 - <i>TLR4 and TLR2 are differentially associated with age during Parkinson disease</i>	10
MANUSCRITO 2 - <i>High expression of TLR10 in patients with Parkinson's Disease regulates the activity of TLR2: possible contribution to decrease disease severity</i>	41
MANUSCRITO 3 - <i>Genetic polymorphisms of Toll-like receptors in Neurodegenerative Diseases</i>	67
5. DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÕES/PERSPECTIVAS.....	100
7. REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	116

TABELAS E FIGURAS

MANUSCRITO 1

Table 1. <i>Demographic and clinical characteristics of patients with Parkinson Disease (PD) and healthy controls</i>	31
Supplementary Figure 1. <i>Age is negatively associated with blood leukocyte and monocytes counts, and positively associated with serum C-reactive protein concentrations in healthy individuals and patients with Parkinson Disease (PD).....</i>	32
Figure 1. <i>Production of tumor necrosis factor alpha (TNFα) and interleukin10 (IL-10) is decreased in whole blood cultures from Parkinson Disease patients after activation with TLR2 agonist.</i>	33
Figure 2. <i>Production of tumor necrosis factor alpha (TNFα) and interleukin10 (IL-10) is decreased in whole blood cultures from Parkinson Disease patients after activation with TLR2 agonist.</i>	34
Supplementary Figure 2. <i>Production of tumor necrosis factor alpha (TNFα) decreases from 6 h to 24 h of incubation with LPS/TLR4 or Pam₃Cys/TLR2/1: intensification of the reduction of TLR4 response with age.....</i>	35
Figure 3. <i>TLR4- but not TLR2-induced tumor necrosis factor alpha (TNFα) levels are reversely associated with age in Parkinson Disease (PD) patients and controls.....</i>	36
Supplementary Figure 3. <i>Evaluation of interleukin 10 (IL-10) concentrations in whole blood cultures from Parkinson Disease (PD) patients and healthy controls according to age.....</i>	37
Figure 4. <i>Production of LPS-induced tumor necrosis factor alpha (TNFα) decreases as the duration of Parkinson Disease (PD) increases, but the response to TLR2/1 agonist seems to be not affected by duration of PD.....</i>	38
Supplementary Figure 4. <i>Reduction of TNFα production (24 h) is associated with disease duration in elderly Parkinson Disease (PD) patients.....</i>	39

Figure 5. *TLR4- and TLR2-induced interleukin 10 (IL-10) production is reversely associated with disease duration in elderly patients with Parkinson Disease (PD).* 40

MANUSCRITO 2

Tabela 1. *Características clínico-laboratoriais e demográficas de pacientes com doença de Parkinson e indivíduos controles.....* 51

Figura 1. *Elevada expressão de TLR10 em monócitos de pacientes com doença de Parkinson.....* 52

Figura 2. *Pacientes com doença de Parkinson apresentam maior frequência de monócitos intermediários expressando TLR10.....* 53

Figura 3. *Expressão de TLR10 em monócitos diminui com a idade.....* 54

Figura 4. *Correlação negativa entre a frequência de monócitos TLR10+ e a gravidade da doença de Parkinson.....* 55

Figura 5. *O bloqueio de TLR10 aumenta a secreção de TNF- α em cultura de CMN de pacientes portadores da doença de Parkinson, após a exposição a agonista de TLR2/1 (Pam₃Cys).....* 56

MANUSCRITO 3

Table 1 *Summary of TLR ligands and their different cellular expression in humans.....* 90

Table 2 *Summary identified DAMPs, cell distribution and associated TLR.....* 92

Table 3 *Major single nucleotide polymorphisms (SNP) of TLRs and their effects on human neurodegenerative diseases.....* 93

Figure 1. *Overview of the expression, assembly and cell activation through Toll-like receptors (TLR) in humans during the inflammatory response.....* 91

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs	do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CBA	do inglês <i>Cytometric bead array</i>
CD	do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
CerMovi	Centro de Referência em Transtorno do Movimento
COX	Cicloxygenase
CMN	Células Mononucleares
CpG DNA	Motivos guanosina-citosina não metilados do DNA
CSF	do inglês <i>Cerebrospinal fluid</i>
DA	Doença de Alzheimer
DAMP	do inglês <i>Damage - associated molecular pattern</i>
DC	do inglês <i>Dendritic cells</i>
ELISA	do inglês <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FSC	do inglês <i>Forward Scatter</i>
DP	Doença de Parkinson
6-HDA	6-Hidroxidopamina
FACS	do inglês <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
HC	Hospital das Clínicas
HIV	do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
H&Y	do inglês <i>Hoen & Yahar scale</i>
IINEURO	Instituto Integrado de Neurociências
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência
INGOH	Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia
IRAK	do inglês <i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	do inglês <i>Interferon regulatory factor</i>
iNOS	do inglês <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
Ly96	do inglês <i>Lymphocyte antigen 96</i>
LRRK	do inglês <i>Leucine-rich repeat kinase</i>

MAPK	do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	do inglês <i>Monocyte-colony stimulating factor</i>
MHC	do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPTP	do inglês <i>1- 38 methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>
MYD88	do inglês <i>Myeloid differentiation primary protein 88</i>
NF-κB	do inglês <i>Nuclear Factor kappaB</i>
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
Pam ₃ Cys	<i>N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine</i>
PAMP	do inglês <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	do inglês <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Proteína C reativa
PRR	do inglês <i>pattern recognition receptor</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered-saline</i>
SSC	do inglês <i>Side Scatter</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIR	do inglês <i>Interleukin-1receptor</i>
TIRF	do inglês <i>TIR domain-containing adaptor-inducing interferon</i>
TGFβ	do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
THP-1	Célula humana da linhagem monocítica
TLR	do inglês <i>Toll-like receptors</i>
TNFα	do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UPDRS	do inglês <i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
vs	<i>Versus</i>

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção do sistema nervoso central (SNC), a qual é expressa de forma crônica e progressiva. É resultante da morte dos neurônios produtores de dopamina cerebrais. Estudos genéticos e epidemiológicos têm destacado o papel da neuroinflamação na fisiopatologia da DP, ressaltando que o processo de neuroinflamação está associado à morte de neurônios dopaminérgicos. No sangue periférico ou nos tecidos, leucócitos ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e/ou a danos teciduais (DAMP), via receptores *Toll-like* (TLR), produzem mediadores pró e anti-inflamatórios, cujo desequilíbrio pode levar a um processo inflamatório crônico. Em condições fisiológicas são detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), os intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) e os não clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$), estas células apresentam diferenças fenotípicas e funcionais que podem influenciar nas características da resposta imune contra DAMPs ou PAMPs. O objetivo deste estudo foi comparar o potencial de leucócitos do sangue periférico de pacientes com DP ou indivíduos saudáveis na produção de citocinas (TNF α e IL-10) após estímulo celular com agonistas de TLR4 (LPS) ou TLR2/1(Pam₃Cys), avaliar o efeito da idade dos pacientes DP na produção de citocinas em hemoculturas, investigar o percentual de subpopulações de monócitos expressando TLR1, TLR2 e TLR10, avaliar a influência da expressão de TLR10 na atividade biológica de TLR2 ao seu agonista, em culturas de CMN. Foram avaliados dois grupos de pacientes com DP (≤ 55 anos e ≥ 65 anos), com idade compatível com os controles saudáveis ($n = 26$). A produção de TNF α em hemoculturas foi aumentada após a estimulação de TLR4 (6 h), principalmente em pacientes com DP adultos jovens, enquanto que os níveis de TNF- α e IL-10 induzidos por TLR2 diminuíram em pacientes com DP independentemente da idade ($p < 0,05$). Observou-se uma correlação inversa entre a produção de TNF α induzida pelo LPS e a idade em pacientes com DP e controles, mas o TNF α induzido pelo agonista de TLR2 não estava associado com a idade dos pacientes com DP ou dos controles. A produção de TNF α induzida por TLR4, mas não por TLR2 foi inversamente associada à idade de início e duração da DP. Não foram detectadas associações entre os escores da UPDRS e os níveis de citocinas. Foi observado um maior percentual da subpopulação de monócitos $CD14^{++}CD16^{+}$ no sangue dos pacientes com DP em relação aos controles saudáveis, assim como maior

percentual de monócitos de pacientes expressando o TLR10. A expressão de TLR2 e TLR10 em monócitos do sangue periférico de pacientes com DP estava aumentada em relação a dos controles sadios. Os resultados sugerem que a resposta de leucócitos do sangue periférico ao ligante de TLR2 é reduzida na DP e que a elevação da expressão de TLR10 em monócitos influencia inibindo a atividade biológica de TLR2 ao seu agonista, demonstrada no experimento de neutralização de TLR10. Verificou-se que o grupo de pacientes DP com maior gravidade da doença, avaliada pela escala UPDRS, apresentava menor percentual de monócitos expressando o TLR10, sugerindo a expressão deste receptor em leucócitos do sangue periférico como um possível marcador prognóstico para a DP. Estes achados, em conjunto, podem desempenhar um importante papel na imunopatologia da DP. O estudo da expressão celular de TLR em leucócitos periféricos e no SNC, das vias de sinalização intracelular e da produção de mediadores pró e anti-inflamatórios, é necessário a fim de melhor esclarecer o papel dos TLR na patogênese DP e talvez para a identificação de biomarcadores de prognóstico da doença no sangue dos pacientes.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Monócitos. Toll-like receptors. citocinas.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a condition of the central nervous system (CNS), chronic and progressive, resulting from the death of brain dopamine-producing neurons. Genetic and epidemiological studies have highlighted the role of neuroinflammation in the pathophysiology of PD, emphasizing that the process of neuroinflammation is associated with the death of dopaminergic neurons. In peripheral blood or tissues, leukocytes activated by pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and / or tissue damage (DAMP), via Toll-like receptors (TLR), produce pro and anti-inflammatory mediators whose imbalance can lead to a chronic inflammation. Under physiological conditions, three subpopulations of human peripheral blood monocytes are detected: the classical monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻), the intermediates (CD14⁺⁺CD16⁺⁺) and the non-classical (CD14⁺CD16⁺), these cells present phenotypic and functional differences that can influence the characteristics of the immune response against DAMPs or PAMPs. The aim of this study was to compare the peripheral blood leukocyte potential of patients with PD or healthy individuals in the production of cytokines (TNF α and IL-10) after stimulation of these cells with TLR4 (LPS) or TLR2 / 1 (Pam3Cys) agonists, to evaluate the effect of the age of DP patients on the production of cytokines in blood cultures, to investigate the percentage of monocyte subpopulations expressing TLR1, TLR2 and TLR10, to evaluate the influence of TLR10 expression on the biological activity of TLR2 to its agonist in PBMC cultures. Two groups of patients with PD were evaluated (≤ 55 years old and ≥ 65 years old), age-matched with healthy controls (n = 26). 6 h-TNF α production was increased after TLR4 stimulation, mainly in young PD patients, whereas TLR2-induced TNF α and IL-10 levels were decreased in PD patients independent of age (p < 0.05). A reverse correlation between LPS-induced TNF α production and age was observed in PD patients and controls, but TNF α induced by TLR2 agonist was not associated with age of PD patients or controls. TNF α production induced by TLR4 but not by TLR2 was reversely associated with the age at PD onset and disease duration. No associations between UPDRS scores and cytokine levels were detected. A higher percentage of CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subpopulation was observed in the blood of patients with PD compared to healthy controls, as well as a higher percentage of monocytes from patients expressing TLR10. The expression of TLR2 and TLR10 in peripheral blood monocytes from PD patients was increased relative to that of

healthy controls. The results suggest that the peripheral blood leukocyte response to the TLR2 ligand is reduced in PD and that the elevation of TLR10 expression in monocytes influences inhibiting the biological activity of TLR2 to its agonist as demonstrated in the neutralization experiment of TLR10. In this study, the group of DP patients with the highest severity of the disease, evaluated by the UPDRS scale, had a lower percentage of monocytes expressing TLR10, suggesting the expression of this receptor in peripheral blood leukocytes as a possible prognostic marker for DP. These findings, together, may play an important role in the immunopathology of PD. The study of TLR cell expression in peripheral leukocytes and CNS, intracellular signaling pathways and the production of pro and anti-inflammatory mediators is necessary in order to better clarify the role of TLR in the PD pathogenesis and perhaps for the identification of biomarkers of disease prognosis in the blood PD patients.

Key words: Parkinson's disease. Monocytes. Toll-like receptors. Cytokines.

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1.1 Epidemiologia da doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em seres humanos, sendo precedida apenas pela doença de Alzheimer (OMS, 2008). Esta afecção, segundo a OMS, atinge cerca de 2% dos indivíduos com idade superior a 65 anos, mas esta prevalência pode estar subestimada e de fato estaria entre 10 a 13% desta população (OMS, 2008; MUANGPAISAN *et al.*, 2011). Há uma maior incidência de DP em indivíduos do gênero masculino, sendo a idade avançada um fator de risco para as doenças neurodegenerativas (YOKEL, 2006). O envelhecimento da população mundial e o consequente aumento da incidência e prevalência de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, traz relevância aos estudos que visam conhecer os mecanismos etiopatogênicos destas doenças.

1.2 Etiopatogenia da doença de Parkinson

A DP é uma síndrome clínica heterogênea, progressiva e debilitante, de causa desconhecida, caracterizada pela degeneração e perda irreversível dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, causando deficiência de dopamina nas áreas de projeções estriatais (SCHAPIRA *et al.*, 2006; DE LAU e BRETELER, 2006). É caracterizada pela presença de sintomas evolutivos que podem levar à 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 típicos da DP. Sintomas não motores, tais como distúrbios cognitivos, psiquiátricos, sensitivos, sensoriais e outros, acompanham a doença (VERBAAN *et al.*, 2007; LEES, 2009). Quando os sinais e sintomas da DP são detectados, provavelmente já ocorreu a perda de aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos e o conteúdo de dopamina no estriado cerebral é cerca de 80% inferior ao normal (LEWIS & PROWLAND, 2007). Alterações imunes e inflamatórias descritas na DP podem não apenas exacerbar ou acelerar a progressão da DP, mas também explicar, pelo menos em parte, alguns dos sintomas clínicos experimentados pelos pacientes com DP (COLLINS *et al.*, 2012; LINDQVIST *et al.*, 2012).

A etiologia da DP ainda é obscura, contudo supõe-se a participação de vários mecanismos etiopatogênicos como: fatores genéticos, ambientais (mutações gênicas, neurotoxinas e agentes infecciosos), estresse oxidativo, anormalidades mitocondriais e excitotoxicidade (TEIVE, 2003; PRZEDBORSKI, 2007; HIRSCH et al., 2013). Evidências sugerem um papel importante da inflamação na patogênese da DP. Ressalta-se que uma série de genes (*LRRK2*, *Parkin*, *SNCA*, *PINK1* e *GAB*) podem colaborar para o desenvolvimento direto da DP ou contribuir como fatores de risco, podendo também estar implicados no processo inflamatório nesta doença (DELEIDI & GASSER, 2013; DZAMKO et al., 2014).

Uma vez que o processo neurodegenerativo foi iniciado pelos fatores causais, uma cascata de eventos secundários deletérios provoca as alterações neuroquímicas e neurológicas observadas nos pacientes com DP (MIZUNO et al., 2004; HIRSCH et al., 2013). 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 (HUNOT e HIRSCH, 2003; WARNER e SCHAPIRA, 2003; HIRSCH et al., 2013; WALES et al., 2013).

No contexto de uma predisposição genética para DP, ressalta-se que a forma familiar da doença é associada a mutações gênicas, mas a DP familiar é relativamente rara, pois a maioria dos casos (> 90%) é considerada doença de natureza esporádica (HUNOT & HIRSCH, 2003; HARDY et al., 2003). Ao contrário dos casos de DP familiar, que muitas vezes são caracterizadas por idade de início precoce, ocorrendo em indivíduos abaixo de 50 anos, a DP esporádica é um transtorno relacionado a um início mais tardio, entre 60 a 70 anos de idade, progredindo-se por um período variável de 10 a 20 anos (MIZUNO et al., 2004). Mutações de genes (*parkin* e α -sinucleína) têm sido identificadas em alguns casos de DP familiar, sugerindo que podem desempenhar um papel importante nesta doença (TEIVE, 2003; PRZEDBORSKI, 2007; SHIMOJI, et al. 2009; HIRSCH, et al. 2013). Polimorfismos podem ser considerados marcadores genéticos, já que são transmitidos juntamente com outros genes em ligação, localizados em regiões cromossômicas vizinhas, que podem, por sua vez, influenciar na suscetibilidade às doenças (SACHIDANANDAM et al., 2001). O polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) constitui uma variação gênica/mutação muito comum na população mundial, podendo interferir na

função gênica e expressão de seus produtos (SACHIDANANDAM et al., 2001). Os polimorfismos nos genes que codificam as moléculas pró-inflamatórias, assim como os polimorfismos de genes que codificam os TLR, têm sido associados a um maior risco de desenvolver DP (WAHNER et al., 2007; KALINDERI et al., 2013).

1.3 Neuroinflamação na doença de Parkinson

Estudos experimentais e *post-mortem* sugerem que a inflamação está presente tanto em lesões agudas do sistema nervoso central (SNC) quanto em doenças neurodegenerativas (MARCHETTI e ABBRACCHIO, 2005; GAO e HONG, 2008). Os astrócitos e as 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 (LIU e HONG, 2003; LONG-SMITH et al., 2009). 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, desde que cesse o estímulo (ORR et al., 2002). 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 pró-inflamatória, por meio da secreção de citocinas (ORR et al., 2002). Tem-se especulado, atualmente, que a ativação das micróglia na DP pode resultar em inflamação crônica na tentativa de depurar a α -sinucleína oligomérica extracelular, um DAMP gerado no SNC, liberada de células nervosas mortas no processo de neurodegeneração (WALES et al., 2013; DZAMKO et al., 2017).

Pesquisas com experimentação animal reforçam a ligação causal entre a perturbação da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) por fatores ambientais, o desenvolvimento da neuroinflamação e a degeneração de neurônios dopaminérgicos (CARVEY et al., 2005; WHITTON, 2007; RITE et al., 2007). O envelhecimento humano também parece alterar a estabilidade da BHE. Em modelos animais experimentais de doenças neurodegenerativas, foi observado uma diminuição do número de junções ocludentes, maior propensão ao dano e lentidão na recuperação da BHE (CARVEY et al., 2009). Estudos demonstraram que a neuroinflamação é capaz de

alterar a função da BHE, facilitando a infiltração de leucócitos sanguíneos no cérebro (CARVEY et al., 2005; WHITTON, 2007).

Sob condições inflamatórias, citocinas e quimiocinas favorecem a entrada de leucócitos do sangue periférico no cérebro, especialmente linfócitos, células dendríticas e monócitos (NEUMANN & WEKERLE, 1998; ZOZULYA et al., 2010). O desequilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios pode favorecer um processo inflamatório crônico, com continuada ativação da micróglia, que nestas condições, além de produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8), passa também a secretar reativos intermediários do oxigênio (ROI), óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, todos tóxicos para os neurônios dopaminérgicos da substância negra (DELEIDI & GASSER, 2013; DZAMKO et al., 2017). A neurodegeneração na DP pode, portanto, ser consequência da neuroinflamação mediada pela ativação da micróglia, o que vem sendo profundamente revisado por vários autores (ORR et al., 2002; HUNOT & HIRSCH, 2003; CHOI & SUK, 2007; LONG-SMITH et al., 2009; HENEKA et al., 2010; ETEMAD et al., 2012; SILVA et al. 2013). De fato, um aumento da expressão e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF α , já foi encontrado no fluido cerebrospinal (CSF), soro sanguíneo e no cérebro de pacientes com DP (MCGEER et al., 1988; MOGI et al., 1994; BLUN-DEGEN et al., 1995; BRODAKCI et al., 2008; CHEN et al., 2008; REALE et al., 2009; FUNK et al., 2013; GROZDANOV et al., 2014).

1.4 Monócitos e *Toll-like receptores* (TLRs) na doença de Parkinson

Os monócitos são um grupo heterogêneo de células sanguíneas que representam, aproximadamente, 10% do total dos leucócitos do sangue periférico humano. Os monócitos originam-se de um precursor mielóide da medula óssea vermelha e são fagócitos/Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) do sistema imune inato que circulam no sangue e migram para diversos tecidos, incluindo o SNC, diferenciando-se em macrófagos ou células dendríticas (DC), os quais colaboram com a resposta inflamatória contra distintos patógenos microbianos (MARTINEZ, 2009; ETEMAD et al., 2012). No SNC, o macrófago é denominado micróglia, a qual apresenta capacidade de se autorenovar neste microambiente, porém, sob condições inflamatórias, os monócitos podem ser precursores das micróglias, contribuindo para a reposição destas células no SNC (TACKE & RANDOLPH, 2006; MARTINEZ, 2009; ETEMAD et al.,

2012). Acredita-se que a migração de monócitos para os tecidos e a sua diferenciação em macrófagos possa ser determinada pelo ambiente inflamatório, isto é, presença ou expressão de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PRRs), tais como os Toll-like receptors (TLR) (TACKE et al., 2006; PERRY et al., 2009; GEISSMANN et al., 2010; CROS et al., 2010).

Alguns marcadores celulares como as moléculas CD14 e CD16 têm sido utilizados para diferenciar subpopulações de monócitos. A expressão diferencial de CD14 (parte do complexo receptor para o Lipopolissacarídeo, LPS) e de CD16 (também conhecido como receptor para a porção fragmento cristalizável (Fc) de imunoglobulina G III, Fc γ RIII) definem duas subpopulações principais de monócitos no sangue periférico: monócitos clássicos CD14⁺⁺CD16⁻ e os não clássicos CD14⁺CD16⁺ (GRAGE-GRIEBENOW et al. 1993; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2015; CROS et al. 2010). Segundo os estudos de Cros et al. (2010) e Ingersoll et al. (2010), a subpopulação de monócitos clássicos representa, aproximadamente 90% do total de monócitos do sangue periférico humano e são equivalentes aos monócitos Gr1⁺ de camundongos, enquanto que a subpopulação de monócitos não clássicos representa aproximadamente 5-15% dos monócitos. Estudos de transcrição genômica celular sugerem que as subpopulações de monócitos humanos originam-se de um mesmo precursor mielóide comum. Estas subpopulações de monócitos podem modificar sua expressão de marcadores fenotípicos celulares, e se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas, a partir do contato dos seus receptores de superfície celular com determinadas citocinas, quimiocinas e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), presentes no sangue ou em diversos tecidos durante uma resposta imune (SERBINA et al., 2006; FOGG et al., 2006; ANCUTA et al., 2009). Uma terceira subpopulação de monócitos tem sido descrita, a dos monócitos intermediários, os quais expressam elevadas quantidades de CD14 e CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2015). Dados oriundos de análises transcricionais reforçam a existência das três subpopulações monócitos, com os monócitos intermediários apresentando características fenotípicas/funcionais distintas daquelas dos monócitos não clássicos (ZAWADA et al., 2011). No entanto, há também evidências de que as três subpopulações representem um contínuo de maturação dos monócitos (WONG et al., 2011; WONG et al., 2012a). Independente de serem ou não três estágios terminais de subpopulações, por

apresentarem diferenças quanto à expressão de citocinas inflamatórias, à expressão de receptores para quimiocinas (controlando diferentes perfis migratórios) e de genes envolvidos na angiogênese e na apresentação de antígenos, as três subpopulações podem desempenhar diferentes funções na homeostasia e nas doenças (CROS et al., 2010; ZAWADA et al. 2011; WONG et al., 2011). Alterações fenotípicas, quantitativas e funcionais nas subpopulações de monócitos humanos podem colaborar para o processo de neuroinflamação/neurodegeneração e, conseqüentemente, para o desenvolvimento ou progressão da DP (GROZDANOV et al., 2014; DROUIN-OUELLET et al., 2015). Nas últimas décadas alguns estudos, principalmente em modelo animal experimental da DP, têm gerado evidências da participação dos monócitos/micróglia na patogênese ou na progressão da DP, destacando a ativação destas células, via TLRs, por PAMPs e/ou DAMPs, produzindo mediadores inflamatórios que colaboram para o processo de neuroinflamação/neurodegeneração na DP (PASHENKOV et al., 2001; IRIBARREN et al., 2002; DE VOS et al., 2002; LIU et al., 2003; KARMAN et al., 2004; MCMAHON et al., 2006; LANDE et al., 2008; DOUBLE et al., 2009; ZOZULYA et al., 2010; CAO et al., 2011; ZHANG et al., 2011; PANARO e CIANCIULLI, 2012; KOUTSILIERI et al., 2013; HIRSCH et al., 2013).

Algumas moléculas expressas nas membranas dos monócitos determinam suas funções, como os *toll-like receptors* (TLRs). Os TLRs são essenciais para o reconhecimento de moléculas associadas a patógenos (PAMPs), 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, além dos monócitos, os macrófagos, as células dendríticas e os polimorfonucleares. Os TLRs medeiam a sinalização para a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, bem como para a produção de óxido nítrico (FITZGERALD et al., 2004; KAWAI e AKIRA, 2010). Nos tecidos ou no sangue periférico, as células são ativadas por agonistas de TLRs, sendo estes agonistas endógenos ou exógenos, produzem citocinas pró- e anti-inflamatórias, cujo desequilíbrio pode levar a um processo inflamatório crônico (CROS et al., 2010; NOELKER et al., 2013). Avaliar a expressão e a função dos TLRs, especialmente nos monócitos, as principais células que rapidamente produzem citocinas no sangue, pode contribuir para a identificação de biomarcadores periféricos de ativação celular envolvidos na neuroinflamação, patogênese ou progressão da DP.

A DP é uma prevalente doença neurodegenerativa em idosos, sendo progressiva, incapacitante, compromete a qualidade de vida dos doentes, sendo geradora de altos custos para o sistema de saúde. É fundamental, portanto, conhecer melhor esta afecção neurodegenerativa que constitui um dos problemas de saúde pública do idoso; ressaltando-se que, no Brasil a expectativa de vida do brasileiro tem aumentado nos últimos anos (IDB, 2009) e como um dos fatores de risco para esta doença é a senescência, isto pode ser um indicativo de aumento da incidência da DP no país. Desta forma, com o propósito de aprofundar os conhecimentos sobre fatores etiopatogênicos da DP e a busca por biomarcadores da doença, iniciamos um estudo para avaliar a ativação de leucócitos do sangue periférico humano, preparando hemoculturas ativadas com diferentes agonistas de TLRs, onde foi detectada a hiporresponsividade de TLR2 ao seu agonista (Pam₃Cys), em monócitos de um grupo de pacientes portadores da DP em relação a indivíduos controles sadios pareados por sexo e idade (SILVA et al., 2016). Avançando nesta linha, o presente estudo propõe uma avaliação da ativação de leucócitos do sangue periférico induzida por agonistas de TLR4 ou de TLR2/1, investigando o efeito do fator idade dos pacientes com DP na produção de citocinas induzidas via estes receptores (Manuscrito 1); bem como a análise da expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 em monócitos de pacientes com DP e uma avaliação da influência da expressão do TLR10, em monócitos de pacientes com DP, na atividade biológica de TLR2 em resposta ao seu agonista (Manuscrito 2). Posteriormente, realizamos uma revisão da literatura abordando polimorfismos genéticos de TLRs nas doenças neurodegenerativas (Manuscrito 3).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a participação de receptores similares a *Toll* (TLR1, TLR2 e TLR10) em monócitos na doença de Parkinson.

2.2 Objetivos do Manuscrito 1

- Avaliar a produção das citocinas: Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α) e Interleucina-10 (IL-10) em hemoculturas, estimuladas com agonista de TLR4 ou de TLR2, em pacientes com doença de Parkinson.
- Verificar o efeito da idade na ativação de leucócitos do sangue periférico com agonistas de TLR (TLR4 e TLR2/1) e a produção de citocinas (TNF α e IL-10) em hemoculturas de pacientes com doença de Parkinson e indivíduos controles pareados por idade e sexo.

2.3 Objetivos do Manuscrito 2

- Quantificar o percentual das subpopulações de monócitos no sangue periférico e nas suspensões de células mononucleares (CMN), baseado na expressão de CD14 e CD16, de pacientes com DP;
- Avaliar a expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 em monócitos de pacientes com DP e de indivíduos controles sadios pareados por idade e sexo;
- Avaliar a influência da expressão de TLR10 em CMN (monócitos) do sangue periférico na responsividade do TLR2 ao seu agonista (Pam₃Cys) *in vitro*.

2.4 Objetivos do Manuscrito 3

- Abordar, por meio de uma revisão da literatura, a associação dos TLRs com a neuroinflamação/neurodegeneração e a provável relação dos polimorfismos genéticos (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) de TLR com a etiopatogenia das doenças neurodegenerativas.

Manuscrito 1

TLR4 and TLR2 are differentially associated with age during Parkinson disease

Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho^a, Delson José da Silva^b, Larissa Fonseca Gomides^a, Miriam Leandro Dorta^a, Milton Adriano Pelli de Oliveira^a, and Fátima Ribeiro-Dias^a

^aInstituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

^bHospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás and Instituto Integrado de Neurociências, Goiânia, Goiás, Brazil

Contact: Fátima Ribeiro-Dias, fatimardias@gmail.com, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil.

Manuscrito submetido à revista Immunological Investigations

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

ABSTRACT

Parkinson disease (PD) is an age-related neurodegenerative disease characterized by loss of dopaminergic neurons associated with neuroinflammation. Toll-like receptors (TLRs) are expressed in peripheral blood leukocytes and also in neurons and glial cells mediating inflammation. This study aimed to investigate the peripheral blood leukocyte response to TLR2 and TLR4 agonists in young and elderly PD patients. Two groups of patients with PD were evaluated (≤ 55 years old and ≥ 65 years old), age-matched with healthy controls ($n = 26$). Severity of PD was evaluated by Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS). Whole blood cultures were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), a TLR4 agonist or Pam₃Cys (Pam), a TLR2 agonist. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 10 (IL-10) were measured by immunoenzymatic assay. 6 h-TNF α production was increased after TLR4 stimulation, mainly in young PD patients, whereas TLR2-induced TNF α and IL-10 levels were decreased in PD patients independent of age ($p < 0.05$). A reverse correlation between LPS-induced TNF α production and age was observed in PD patients and controls, but TNF α induced by TLR2 agonist was not associated with age of PD patients or controls. TNF α production induced by TLR4 but not by TLR2 was reversely associated with the age at PD onset and disease duration. No associations between UPDRS scores and cytokine levels were detected. In conclusion, TLR4 and TLR2 responses seem to be differentially affected during PD. Data suggest that TLR2 deficiency in periphery is independent of age of the patients, age at PD onset or PD duration.

KEYWORDS: Whole Blood Cultures; Toll-like receptors; cytokines; aging; Parkinson's disease.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive neurodegenerative disease of unknown aetiology characterized by specific loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system. This loss of neurons leads to motor and non-motor disturbances that impair the quality of patients' life. Non-motor symptoms more common include sleepness/fatigue, cognition, attention and memory deficits (Lees, 2009; Bugalho et al., 2016). Neurodegeneration in PD has been associated with neuroinflammation mediated by activated microglia that releases inflammatory mediators and reactive species of oxygen (ROS) responsible for neuron damage. In addition, during peripheral inflammation activated blood leukocytes can migrate into Central Nervous System (CNS) contributing to neuroinflammation and neuronal loss (Collins et al., 2012). Yet, increase of pro-inflammatory cytokine levels in serum as well as in CNS have been reported during PD (Boka et al., 1994; Brodacki et al., 2008; Lindqvist et al., 2012; Collins et al., 2012).

Activation of innate cells in the CNS or in peripheral blood can occur after toll-like receptor (TLR) agonist exposure. These receptors are essential for recognition of microbial-associated molecular patterns (MAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Kawai and Akira, 2010). TLRs are associated with neuroinflammation in PD (Panaro et al., 2008; Kim et al., 2013; Dzamko et al., 2017) and they are expressed in microglia and also in blood leukocytes (Kawai and Akira 2010; Dzambko et al., 2017). An imbalance in the inflammatory response in periphery or CNS can contribute to neuroinflammation and, consequently, neurodegeneration (Collins et al., 2012; Kannarkat et al., 2013; Dzamko et al., 2014). However, some studies showed controversial alterations in the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF α), a potent pro-inflammatory cytokine, and interleukin 10 (IL-10), a regulatory and anti-inflammatory cytokine in blood or TLR-activated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures from patients with PD (Hasegawa et al., 2000; Brodacki et al., 2008; Reale et al., 2009; Rocha et al., 2017).

The risk of developing PD is increased with aging, which is a complex process leading to reduced homeostasis in tissues/organs. Besides biochemical alterations in the brain, aging also affects immune system. Whereas adaptive immune response seems to be reduced, innate immune cells maintain certain level of activation in elderly people (Michaud et al., 2013; Fulop et al., 2016; Bickford et al., 2017). Nevertheless, despite of

studies showing a low-grade inflammation during aging, suggesting that monocytes/macrophages can contribute for inflamm-aging (Feen et al., 2012; Michaud et al., 2013; Lee et al., 2013; Fulop et al., 2016), circulating pro-inflammatory cytokine levels can be reduced in patients with PD (Rocha et al. 2017). In addition, monocytes from PD patients can produce less amounts of TNF α than controls (Hasegawa et al., 2000). Yet, whole blood cultures from PD patients stimulated with TLR2 agonist produced less cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10) than healthy controls (Silva et al. 2016). There is little information about evaluation of cytokine production in PD patients considering the influence of age (Dobbs et al., 1999) and none information about TLR4 or TLR2 function in PD patients comparing young and elderly individuals. Thus, although PD is considered an age-related disease the association between production of cytokines induced by TLR activation and age must be investigated in this disease.

In the present study we aimed to investigate whether the decreased TLR2 response could be associated to age of PD patients and healthy controls. For this, we studied two groups of patients with PD, one with less than 55 years old and another with more than 65 years old age-matched with healthy controls. In addition, we evaluated the association between levels of TNF α and IL-10 induced by TLR2 and TLR4 agonists and the duration or severity of the disease. We chose these cytokines to represent one pro-inflammatory and one immunomodulatory cytokine.

Material and Methods

Patients and Controls

Patients with PD were recruited from the Hospital das Clínicas (Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brazil) 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) and healthy individuals from the local community. Patients (n = 26) and controls (n = 26) were matched by sex (20M/6F) and age, with ages ranging from 34 to 76 years. The participants in this study were subdivided in two groups according to age: ≤ 55 years of age (young adults) and ≥ 65 years of age (elderly adults). Healthy donors and healthy elderly individuals included in this study do not present hematological alterations evaluated by the blood count, absence of fever or other clinical signs of infection or systemic inflammation evaluated by laboratory determination of serine C-reactive protein. Diagnosis of PD followed the

UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria (Litvan et al., 2003), and patients were evaluated using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) providing scores of changes in mental activity and mood, daily activities and motor activities (Lang and Fahn, 1989) and the Hoehn and Yahr staging scale to evaluate of the general disability status of PD patients (Hoehn & Yahr, 1967). Patients and controls undertaking anti-inflammatory drugs and/or presenting inflammatory or infectious diseases were excluded from the study. All procedures were approved by the local ethics committee (Research Ethics Committee of Hospital das Clinicas, UFG, protocol n°. CAAE: 20032113.0.0000.5078) and participants gave their written informed consent.

Blood Samples and treatment of Whole Blood Cultures with TLR Agonists

Samples of venous blood from patients and controls were collected for culture (4.0 ml with heparin) and serum sampling (4.0 ml) (Vacutainer, Becton Dickinson, BD, EUA), between 9:00 and 11:00 a.m. After 1 h at room temperature (R.T.), the blood samples were centrifuged (500 g, 5 min, 4°C), and serum was collected and stored at – 20 °C until analysis. Blood serum was used for the determination of C-reactive Protein performed by immunoturbidimetry (automated analyzer Selectra XL, The Netherlands). Leukocyte count was performed using automated hematology analyzer Sysmex XED-2100 (Roche, Switzerland), and results were expressed as leukocytes/mm³. 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 µg/ml streptomycin (all reagents were 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, Calif., USA), in a final volume of 0.6 ml. Whole blood cultures were incubated in the absence or presence of lipopolysaccharide (LPS), a TLR4 agonist (*E. coli*, serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich); Pam₃Cys SKKKK (Pam), a synthetic triacyl-lipopeptide, which is a TLR2/1 agonist (EMC Microcollections, Tübingen, Germany). LPS was added to the cultures at the concentration of 100 ng/ml and Pam at the concentration of 1.0 µg/mL, as standardized in previous experiments. Tubes were closed and kept under shaking at 37 °C, for 6 h and 24 h (Mixing Block MB-101; Bioer, Hangzhou, China). After incubation, cells were centrifuged (200 g, 5 min) for collecting supernatants, which were stored at -20 °C until analysis.

Determination of TNF α and IL-10 by enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA)

The concentrations of cytokines TNF α and IL-10 were determined in blood culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All hybridomas were provided by Dr. Giorgio Trinchieri (National Cancer Institute, Center for Cancer Research, Laboratory of Experimental Immunology, Bethesda, Maryland, USA). ELISA microplates (Corning Costar, High Binding, NY, USA) were sensitized with the capture anti-TNF α monoclonal antibody (clone B154.9, 2.5 μ g/ml, 12 h, 4°C) or anti-IL-10 (Clone JES907, 5.0 μ g/ml, 14 h, 4°C). After incubation, plates were washed with PBS containing 0.04% tween 20 and blocked (PBS 3% of FBS, 60 min, R.T.). After washing, samples and reference standards (recombinant TNF α and IL-10, R&D System, Minneapolis, MN, USA) were added. After incubation (about 18 h, 4 °C) and washings, the biotin-conjugated antibody (Clone B154.7 anti-TNF α , 1.0 μ g/ml; Clone B27 anti-IL-10, 2.6 μ g/ml) was added. After 1 hr and washings, the streptoavidin-peroxidase conjugate (Sigma, 1:1000) was added, the plates were incubated for 30 min (R.T.). After washings, the substrate solution OPD (orthophenylenediamine 5 mg/mL and hydrogen peroxide 30 volumes 1:1000 in citrate-phosphate buffer pH 5.0) was added and the reaction was quenched with 2N H₂SO₄ solution. Optical density was obtained in a microplate reader (Multiskam, ThermoLabsystems, Taunton, MA, USA) with filters of 492 nm and reference 620 nm. The concentration of TNF α or IL-10 was determined according to the standard curves prepared with the recombinant cytokines, the detection limit being 50 pg/ml for TNF α and 15 pg/ml for IL-10.

Statistical Analyses

Data were presented as medians (minimum and maximum). Mann-Whitney U test was used to compare unpaired samples (patients vs. controls) and a Wilcoxon test was used for paired samples (medium vs. TLR agonists). Spearman's test was used for correlation analysis. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Characteristics of Parkinson disease patients and controls

The characteristics of PD patients and healthy controls are presented in Table 1. Patients and controls were matched by age and the table shows the data of the whole group and subgroups according to age (≤ 55 years old and ≥ 65 years old). Comparing clinical and laboratorial data of PD patients and controls (total group or subgroups) no differences were found between them for age, blood leukocyte or monocyte counts and C-reactive protein levels in the serum.

Between the subgroups of patients differences were found when comparing age (≤ 55 and ≥ 65 years old; $p < 0.05$), age at PD onset (< 45 vs > 45 years old; $p < 0.05$), disease duration (5 to 16 vs 12 to 20 years, young vs elderly adults, $p < 0.05$) and disease severity according to UPDRS (19 to 32 vs 21 to 46, young vs elderly adults) but not H&Y scale. Within the UPDRS scale, changes in mental activity and mood of PD patients were evaluated, varying from 1.0 to 8.0, alterations in daily life activities with scores from 2.0 to 14.0, and motor alterations of the DP patients with scores varying from 11.0 to 32.0, all representing mild to moderate changes (Table 1). The H&Y scale was used to assess the state of general disability according to the severity of PD, indicating mild to moderate disability of PD patients. For blood leukocyte or monocyte counts and C-reactive protein levels in the serum no differences were found between subgroups of patients with PD.

As the main focus of this study was to evaluate the effects of age on cytokine production after TLR2 and TLR4 activation in whole blood cultures, we first evaluate the associations between age and blood leukocyte and monocyte counts as well as serum C-reactive protein levels in PD patients and controls. As it is shown in Supplementary Figure 1, blood leukocyte and monocyte counts are reversely associated with age in PD patients as well as in controls (Supplementary Figure 1A – D, $p < 0.05$) whereas serum levels of C-reactive protein are positively associated with age in both groups (Supplementary Figure 1E, F). Thus, during aging there is a decrease in leukocyte/monocyte blood counts and an increase of serum C-reactive protein levels similarly in controls and PD patients.

TLR4 and TLR2 responses in patients with Parkinson Disease are differentially affected depending on the age of patients

First, we stimulated whole blood cultures with LPS (TLR4 agonist) or Pam₃Cys (TLR2 agonist) and measured the TNF α concentrations in culture supernatants after 6 h or 24 h of incubation as well as IL-10 after 24 h, using ELISA. As it is shown in Figure 1, 6 h-TNF α production was increased after LPS/TLR4 stimulation in whole blood cultures from PD patients whereas the response to TLR2 agonist was decreased in these patients (Figure 1A). After 24 h, no differences could be detected in LPS-induced TNF α concentrations, but the response to TLR2 agonist continued to be reduced in PD patients in comparison to control individuals (Figure 1B). In addition, production of IL-10 was similar in LPS-stimulated cultures from PD patients and controls, but after TLR2 stimulation PD patients produced less IL-10 than controls (Figure 1C).

Further, we evaluated the TNF α and IL-10 production in the subgroups separated according to age. We observed that the higher production of LPS-induced TNF α production in PD patients (Figure 1A) was mainly detected in the subgroup of PD patients ≤ 55 years old (Figure. 2A, $p < 0.05$). The production of TNF α was not significantly altered in whole blood cultures from control individuals after stimulation with LPS (6 h) when comparing young vs elderly individuals. However, it was lower in LPS-treated cultures from elderly than young PD patients ($p < 0.05$). Nevertheless, after 24 h of incubation, LPS-induced TNF α production was similarly decreased in both cultures from elderly PD patients and controls in comparison to young individuals (Figure 2B, $p < 0.05$). No significant differences were found between PD patients and controls independent of age (Figure 2B). The LPS-induced IL-10 production seems to be not significantly affected by age both in PD patients or controls (Figure 2C).

Considering the response to TLR2 agonist, independent of the age PD patients presented lower TNF α production than controls (Figure 2A, 2B). Similar 6 h-TLR2 responses were detected in PD patients or in controls when comparing young and elderly individuals (Figure 2A, 2B). But after 24 h of incubation, elderly individuals (patients or controls) presented lower levels of TNF α concentrations in the cultures than young individuals (Fig. 2B). The TLR2-induced IL-10 production was reduced in PD patients in comparison to controls independent of age (Figure 2C). Pam-treated cultures from young and elderly individuals (PD patients or controls) produced similar amounts of IL-10 (Figure 2C).

As we were expecting that LPS-induced TNF α production decreased along the culture, we compared the levels of TNF α after 6 h to 24 h of incubation in the young and elderly PD patients and controls. We observed that the production of TNF α after stimulation with TLR4 agonist (Supplementary Figure 2A – D) presented higher reduction from 6 h to 24 h than after TLR2 agonist treatment (Supplementary Figure 2E – H), both in cultures from PD patients and controls. This reduction was especially observed in individuals with ≥ 65 years old with or without PD (~40% - 50% of reduction in TNF α concentrations).

According to these results, age seems to be associated with alterations in TLR4 but not TLR2 responses in patients with PD. In fact, we observed a reverse correlation between LPS-induced TNF α production and age in patients with PD as well as in controls, especially after 24 h of culture incubation (Figure 3 A-D). Nevertheless, concentrations of TNF α induced by TLR2 agonist were not associated with age of PD patients or controls (Figure 3 E-H). For IL-10, no associations were detected after TLR4 or TLR2 activation of cultures from PD patients or controls (Supplementary Figure 3A-D).

Cytokine production decreases with disease duration in Parkinson Disease patients

We evaluated the cytokine production induced by TLR4 and TLR2 agonists in relation to clinical data. As it is shown in Figure 4 TNF α production induced by TLR4 was reversely associated with the disease duration (Figure 4A, B). This was especially observed in elderly patients when analyzing TNF α production after 24 h of LPS activation (Supplementary Figure 4). Considering TNF α induced by Pam₃Cys, no significant association was observed with disease duration (Figure 4 C, D; Supplementary Figure 4 E-H). When analyzing the production of IL-10 in whole group of PD patients, no significant association between TLR2- or TLR4-induced IL-10 concentrations and disease duration was found (Figure 4 E, F). However, IL-10 is negatively associated with disease duration in elderly group of PD patients (Figure 5 B, D).

In addition, correlations between cytokine levels (TNF α and IL-10) in whole blood cultures from patients with PD and age at PD onset and UPDRS scores were also evaluated. As showed in Table 2, a significant negative correlation was observed between LPS-induced TNF α production in whole blood cultures from patients with PD

and age at PD onset (24 h, $p < 0.05$; 6 h, $p = 0.071$). Pam-induced TNF α production seems to be not associated with age at PD onset (6 h), although there is a tendency a negative correlation when the TNF α concentrations were evaluated at 24 h of culture ($p = 0.079$). The production of IL-10 was not associated with age at PD onset, independent of the stimuli used in whole blood cultures (Table 2). The severity of PD, evaluated by the UPDRS scale, is not associated with LPS- or Pam-TNF α or -IL-10 production in whole blood cultures (Table 2). The correlations evaluated with the whole group of PD patients and controls are summarized in Table 2.

Discussion

In this study we evaluated the response of leukocytes in whole blood cultures to TLR2 and TLR4 agonists in two groups of patients with PD. To our knowledge this is the first study to evaluate the association between TLR responses and age in PD patients. To evaluate the effect of the age in the patient responses, we assessed TLR-induced cytokine production in PD patients ≤ 55 years old and ≥ 65 years old. The results showed that the young adult PD patients produced higher levels of TNF α after TLR4 stimulation than the controls. In addition, they produced more TNF α than elderly PD patients. As in health controls there were no differences between young and elderly groups and there is no difference between elderly PD patients and matched controls, the data suggest that TLR4 response is higher in patients with PD that have ≤ 55 years old and early onset of the disease. In contrast, the response to TLR2 agonist was lower in PD patients than in controls independent of the age. Between young and elderly controls or young and elderly patients no differences were detected after 6 h of incubation, but the TLR2-induced TNF α was reduced in elderly individuals after 24 h of incubation. Thus, whereas TLR4 response is increased in the group of young PD patients, TLR2 is similarly reduced in young and elderly PD patients, suggesting that the age of the patients does not influence the reduced TLR2 response in PD. We have previously showed that the response to TLR2 is diminished in patients with PD, evaluating another group of patients showing a large range of age (Silva et al., 2016). Here, we confirmed these results in other group of PD patients and demonstrated that this reduced TLR2 response is independent of age or onset of the disease.

The response to TLR4 agonist has been evaluated in PD patients mainly in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) showing no consensus on the results.

Higher or lower levels of TLR4-induced TNF α have been found in PBMC cultures from patients than from controls (Bessler et al., 1999; Hasegawa et al., 2000; Reale et al., 2009). In whole blood cultures, previously we showed no differences between PD patients and controls when comparing TNF α concentrations in cultures stimulated with LPS (Silva et al., 2016). In these studies the age of patients was heterogeneous around 50 to 76 years. In the present study using a large range of age (34 to 76 years) we showed that the response to LPS/6 h is elevated only in patients with age $\leq$ 55 years old. Most importantly, in the previous studies TNF α concentrations were measured after 24 h of incubation not after early time points. We and others observed that the TNF α concentration reaches a peak around 6 h of cell stimulation and is declined at 24 h (Waal Malefyt et al., 1991; van Furth et al., 1994; Schildberger et al., 2013). Here, the LPS-induced TNF α production decreased from 6 h to 24 h mainly in elderly individuals (PD patients and controls), suggesting that old people have difficulty to maintain elevated levels of TNF α after LPS stimulation than young individuals. Thus, it is important to keep in mind the relevance of time point to evaluate differences between TNF α concentrations in *ex vivo* cultures. Our data suggest that early TLR4-induced TNF α production in whole blood cultures is increased in PD patients with $\leq$ 55 years old and seems to be not related to aging in PD. Results suggest an intrinsic high TLR4 response in PD patients when they are young that can be lost in old patients. Alternatively the PD in young or elderly people can present different mechanisms accounting for the TLR4 responses. The mechanisms to explain these differences must be further investigated. IL-10 induced by TLR4 stimulation was similar between PD patients and controls and it seems to be not affected by age. In accordance, similar results comparing LPS-stimulated IL-10 production in PBMC cultures from PD patients and controls were previously obtained (Hasegawa et al., 2000).

In PD, TLR2 plays a role as an important receptor to oligomeric α -synuclein released from neurons to activate microglia and increases the neuroinflammation (Kim et al., 2013; Daniele et al., 2015; Kim et al., 2016). However, the role of TLR2 in periphery during PD has been poorly evaluated. To our knowledge only our group has evaluated leukocyte response to TLR2/1 agonist showing a reduced production of TNF α and IL-10 in PD patients (Silva et al., 2010). These results were confirmed in the present study and we did not find an association between the blood leukocyte TLR2-decreased response and age of PD patients. As a similar reduced TLR2 response was detected in young and elderly PD patients, the results suggest that the decreased

response of peripheral blood leukocytes to TLR2/1 agonist is early detected in PD and is maintained during aging in these patients. Although it is known that aging is the main risk to neurodegenerative diseases (Bickford et al., 2017) and PD is considered an age-related disease, according to our results altered peripheral TLR2 response in PD maybe is not linked to aging.

Although in this study similar production of TNF α (6 h) and IL-10 (24 h) was found when comparing young and elderly healthy individuals after TLR4 stimulation of peripheral blood leukocytes, a tendency for negative correlation between TNF α concentrations and age was found ($r = -0.36$, $p = 0.06$, $n = 26$) and none correlation was detected for IL-10 levels. Similar results were obtained with PD patients. However, in controls or PD patients no correlations between TNF α or IL-10 concentrations and age of individuals was detected when cultures were stimulated with Pam₃Cys. These results indicate that in healthy subjects ≥ 65 years old the response to TLR4 tends to decrease but TLR2 response is preserved, but in PD patients TLR2 response is decreased independent of age. Previous studies showed a similar (van Duin et al., 2007) or a decreased (Bruunsgaard et al., 1999; van der Kleij et al., 2004) response to LPS in PBMC and whole blood cultures, respectively, from elderly healthy subjects in comparison with young ones. In addition, different results were obtained from PBMC and whole blood cultures in a same study comparing LPS-induced cytokine production in elderly and young individuals (Gabriel et al., 2002). Thus, controversial results have been published about the leukocyte TLR4 response in elderly subjects. Concerning TLR2 response, one study about aging influence on the function of this receptor showed a decreased TNF α and IL-6 production in Pam₃Cys-stimulated PBMC cultures from elderly subjects in comparison with young controls. This decreased response was ascribed to a lower expression of TLR1 in monocytes from elderly subjects (van Duin et al., 2007). A reduced TLR2/1- or TLR2/6-induced cytokine production was also reported in human dendritic cells from older than young individuals (Panda et al., 2010). Thus, these results are in contrast to ours that indicate a preserved TLR2 response in old healthy individuals. In general, a consensus about the effects of aging on TLR or innate immune response is missing due to a reduced number of studies, heterogeneity of age ranges and assay conditions.

The alterations in TLR4- and TLR2-induced cytokines in young or elderly PD patients could be also associated with PD duration. We observed that whereas TNF α concentrations induced by TLR4 engagement is reversely associated with disease

duration TLR2 response is independent of this. In addition, the LPS- or Pam₃Cys-induced IL-10 levels decreased as disease duration increased in elderly patients. Results suggest that both pro and anti-inflammatory TLR4-induced cytokines decrease as PD progresses. TLR2-induced IL-10 levels were also negatively correlated with PD duration in elderly patients. Collectively, these results showed that TLR2 deficient response in PD patients is present in young PD patients as well as in elderly patients, but only anti-inflammatory IL-10 levels can be associated with the PD duration. In attempt to clarify whether these results could be explained by severity of PD, we evaluated correlations between cytokine levels and UPDRS scores. In accordance with our previous report (Silva et al., 2016) no association between levels of cytokines in TLR2- or TLR4-stimulated cultures and UPDRS scores was found. Reale et al. (2009) found a weak positive correlation between LPS-induced cytokine (TNF α , IL-1 β) levels in PBMC cultures and UPDRS III scores. On the otherwise, Hasegawa et al. (2000) showed a negative correlation between cytokine levels in PBMC cultures stimulated with LPS and H&Y disability scores of the patients. The patients of the present study present mild PD according to UPDRS and HY scores what can explain controversial results obtained in the previous studies. Thus, although our results indicate that TLR4 and TLR2 altered responses in PD seem to be not explained by the severity of PD, it is not possible to rule out the possibility that TLR4 and TLR2 play a role in immunopathogenesis of PD in periphery and in CNS.

The present study has as strong points the additional information about peripheral TLR2 response in PD evaluated in two groups of patients with PD that differs according to age, age at onset of the disease, PD duration and UPDRS scores. The criteria for exclusion, inclusion and matching of patients and controls were rigorous. We used whole blood cultures that represent the most physiological condition to evaluate peripheral leukocyte responses. We first performed the analysis of the total leukocyte/monocytes counts and the determination of serum levels of CRP in PD patient groups and controls. The results showed no differences between PD patients and controls, but a negative correlation between leukocytes/monocytes counts and age was detected in both PD patients and controls (Supplemental Figure 1). In opposite, the levels of CRP increased as age progress similarly in PD patients and controls. In accordance with our results, Lindqvist et al. (2012) found similar levels of CRP in the blood of PD patients in comparison with controls. In addition, similar number of monocytes has been found in PD patients and controls (Funk et al., 2013; Grozdanov et

al., 2014). Monocytes are the main cell population that produces TNF α in whole blood cultures, especially after short periods of incubation (Fokema et al., 2003; Damsgaard et al., 2009). In fact, we observed a moderate positive correlation between LPS- or Pam₃Cys-induced TNF α concentrations and monocyte counts (Table 2). Thus, altered TLR4 and TLR2 leukocyte responses in PD patients can be ascribed to monocytes. In our previous report (Silva et al., 2016) the expression of TLR2 or TLR4 in monocytes from PD patients was not deficient. Thus we need to investigate the mechanisms of altered TLR2 and TLR4 leukocyte responses in PD patients other than receptor expression.

In conclusion, the present study showed that TLR4 and TLR2 are differentially affected during PD. Peripheral TLR4 response is increased in young PD patients whereas TLR2 response is decreased in both young and elderly patients. The results suggest that TLR2 deficiency in periphery is independent of age of the patients and PD duration. Then, although PD is an age-related disease, some immunological alterations can occur independent of age such as the response of TLR2. The mechanisms responsible for this decreased response are under investigation by our group.

Acknowledgements

Authors thanks Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) for financial support. F.R.-D. and M.A.P.o. are research fellows of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). L.F.G. is a fellow of CNPq (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC).

References

- Akil E, Bulut A, Kaplan I, Ozdemir HH, Arslan D and Aluclu MU. The increase of carcinoembryonic antigen (CEA), highsensitivity C-reactive protein, and neutrophil/lymphocyte ratio in Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2015; 36:423-428.
- Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, et al. 2012. Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function. *J Leukoc Biol*, 91(5), 829–838.
- Baune BT, Ponath G, Golledge J, et al. 2008. Association between IL-8 cytokine and cognitive performance in an elderly general population—the MEMO-Study. *Neurobiol Aging*, 29(6), 937–944.
- Bessler H, Djaldetti R, Salman H, et al. 1999. IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*, 53, 141-145.
- Bickford PC, Flowers A and Grimmig B. 2017. Aging leads to altered microglial function that reduces brain resiliency increasing vulnerability to neurodegenerative diseases. *Exp Gerontol*, S0531-5565(17), 30098-0.
- Blieberhaeuser C, Grozdanov V, Speidel A, et al. 2016. Age-dependent defects of alpha-synuclein oligomer uptake in microglia and monocytes. *Acta Neuropathol*, 131(3), 379-91.
- Boka G, Anglade P, Wallach D, et al. 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172(1-2), 151-4.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, et al. 2008. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett*, 441, 158–162.

Bruunsgaard H. 2006. The clinical impact of systemic low-level inflammation in elderly populations. With special reference to cardiovascular disease, dementia and mortality. *Dan Med Bull*, 53(3), 285-309.

Bugalho P, Lampreia T, Miguel R, et al. 2016. Non-Motor symptoms in Portuguese Parkinson's Disease patients: correlation and impact on Quality of Life and Activities of Daily Living. *Sci Rep*, 6, 32267.

Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, et al. 2012. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 62(7), 2154-68.

Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, et al. 2009. 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*, 340(2), 95-101.

Daniele SG, Béraud D, Davenport C, et al. 2015. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal*, 8(376), ra45.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, et al. 1991. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 191, 174(5), 1209-20.

Djukic M, Mildner A, Schmidt H, et al. 2009. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*, 129, 2394–403.

Dobbs RJ, Charlett A, Purkiss AG, et al. Association of circulating TNF- α and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol Scand*, 100(1), 34-41.

Dzamko N, Geczy CL and Halliday GM. 2014. Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience*, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.028

Dzamko N, Gysbers A, Perera G, et al. 2017. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol*, 133(2), 303-319.

Etemad S, Zamin RM, Ruitenberg et al. 2012. A novel in vitro human microglia model: Characterization of human monocyte-derived microglia. *J Neurosci Methods*, 209(1), 79-89.

Fokkema SJ, Loos BG, de Slegte C, et al 2003. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 30(12), 1091-6.

Fulop T, Dupuis G, Baehl S, et al. 2016. From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology*, 17(1), 147-57.

Funk N, Wieghofer P, Grimm S, et al. 2013. Characterization of Peripheral Hematopoietic Stem Cells and Monocytes in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 28(3), 392-395.

Gabriel P, Cakman I and Rink L. 2002. Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp Gerontol*, 37(2-3), 235-47.

Gilleron M, J. Nigou D, Nicolle V, et al. 2006. The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through Toll-like receptor 2. *Chem Biol*, 13, 39-47.

Grozdanov V, Bliederaeuser C, Ruf WP, et al. 2014. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol*, 128(5), 651-63.

Hasegawa Y, Inagaki T, Sawada M, et al. 2000. Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and monocytes/macrophages in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 101, 159-164.

Kannarkat GT, Boss JM and Tansey MG. 2013. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinson's Dis*, 3, 493–514.

Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 373–384.

Kim C, Lee HJ, Masliah E, et al. 2016. Non-cell-autonomous Neurotoxicity of α -synuclein Through Microglial Toll-like Receptor 2. *Exp Neurobiol*, 25(3), 113–9.

Kim CH, Suk DH, You S, et al. 2013. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*, 4, 1562.

Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, et al. 2009. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol*, 30, 319–324.

Lang AE, Fahn S. (1989). Assessment of Parkinson's disease; in Munsat TL (ed): *Quantification of Neurological Deficit*. Boston, Butterworths, pp 285–309.

Lees AJ. 2009. The Parkinson chimera. *Neurology*, 72(7) (supl), 2–11.

Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, et al. 2012. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One*, 7(10), e47387

Massari PA, Visintin J, Gunawardana K, et al. 2006. Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling. *J Immunol*, 176, 2373–2380.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285–1291.

Menza M, Dobkin RD, Marin H, et al. 2010. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics*, 51(6), 474-479.

Michaud M, Balardy L, Moulis G, et al. 2013. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc*, 14, 877–882.

Moll L, El-Ami T, Cohen E. 2014. Selective manipulation of aging: a novel strategy for the treatment of neurodegenerative disorders. *Swiss Med. Wkly*, 144, w13917.

Niccoli T, Partridge L. 2012. Ageing as a risk factor for disease. *Curr. Biol*, 22, R741–R752.

Panaro, M.A., Lofrumento, D.D., Saponaro, et al. 2008. Expression of TLR4 and CD14 in the central nervous system (CNS) in a MPTP mouse model of Parkinson's-like disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 30, 729–740.

Panda A, Arjona A, Sapey E, et al. 2009. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol*, 30, 325–333.

Panda A, Qian F, Mohanty S, et al. 2010. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol*, 184, 2518–2527.

Parkinson J. 2002. An essay on the shaking palsy 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2), 223-236.

Reale M, Iarlori C, Thomas A, et al. 2009. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*, 23, 55–63.

Rocha NP, Assis F, Scalzo PL, Vieira ÉL, Barbosa IG, et al. (2017). Reduced Activated T Lymphocytes (CD4+CD25+) and Plasma Levels of Cytokines in Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2017 Feb 7. doi: 10.1007/s12035-017-0404-y.

Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, et al. 2011. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 108, 6632–6637.

Rota E, Bellone G, Rocca P, et al. 2006. Increased intrathecal TGF- β 1, but not IL-12, IFN- γ and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci*, 27(1), 33-39.

Rütten S, Schusser GF, Abraham G, et al. 2016. Release kinetics of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 receptor antagonist in the equine whole blood. *BMC Vet Res*, 12(1), 117.

Schildberger A, Rossmanith E, Eichhorn T, et al. 2013. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm*, 2013, 697972.

Shaw AC, Panda A, Joshi SR, et al. 2011. Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev*, 10, 346–353.

Silva DJ, Alcântara-Silva TR, Rocha Sobrinho, HM, et al. 2013. Neuroinflamação na Doença de Parkinson. *LAMSJ*, 2(4), 178-86.

Silva DJ, Borges AF, Souza PO, et al. 2016. Decreased Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 7/8-Induced Cytokines in Parkinson's Disease Patients. *Neuroimmunomodulation*, 23(1), 58-66.

Smedman C, Ernemar T, Gudmundsdotter L, et al. 2011. FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine secreting subpopulations. *Scand J Immunol*, 75, 249–258.

van der Geest KS, Abdulahad WH, Tete SM, et al. (2014). Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4+ T cells. *Exp Gerontol*, 60, 190–196.

van der Kleij D, van den Biggelaar AH, Kruize YC, et al. 2004. Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. *J Infect Dis*, 189(6), 1044-51.

Van Duin D, Mohanty S, Thomas V, et al. 2007. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J Immunol*, 178, 970–975.

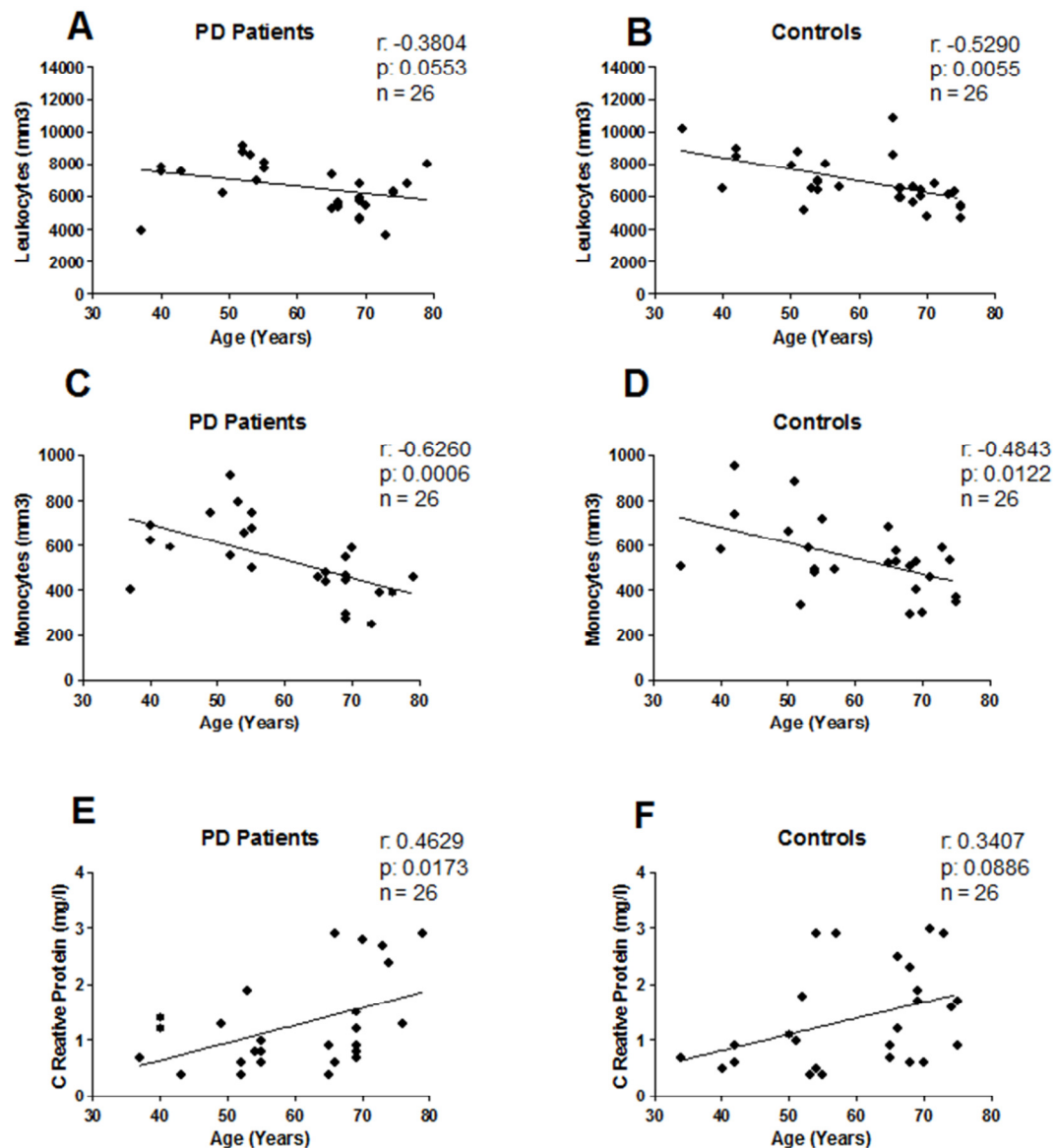
van Furth R, van Zwet TL, Buisman AM, et al. 1994. Anti-tumor necrosis factor antibodies inhibit the influx of granulocytes and monocytes into an inflammatory exudate and enhance the growth of *Listeria monocytogenes* in various organs. *J Infect Dis*, 170(1), 234-7.

Williams-Gray CH, Wijeyekoon R, Yarnall AJ, et al. 2016. ICICLE-PD study group. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). *Mov Disord*, 31(7), 995-1003.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients with Parkinson Disease (PD) and healthy controls

Characteristic	PD Patients	Controls	p
Total group	n = 26	n = 26	
Age (years)	66 (35 - 76)	65 (34 - 75)	0.97
Age at PD onset (years)	45 (32 - 60)	-	
Disease duration (years)	13 (5 - 20)	-	
UPDRS	20 (19 - 46)	-	
Mental activity and mood	2.0 (1.0 - 8.0)	-	
Daily activities	4.0 (2.0 - 14.0)	-	
Motor activities	20 (11.0 - 32.0)	-	
H&Y	2.0 (2.0 - 3.0)	-	
Blood leukocytes (mm ³)	6,745 (3,630 - 9,100)	6,510 (4,650 - 10,860)	0.57
Monocytes (%)	8.1 (5.8 - 11.0)	7.5 (4.8 - 11.2)	0.45
C-reactive protein (mg/L)	1.0 (0.4 - 2.7)	1.0 (0.4 - 2.9)	0.52
Male/Female	20 M / 6 F	20 M / 6 F	
Young adult individuals ≤ 55 years old	n = 12	n = 12	
Age (years)	50 (35 - 55)*	51 (34 - 55)	0.99
Age at PD early onset (years)	37 (32 - 43)*	-	
Disease duration (years)	11 (5 - 16)*	-	
UPDRS	22 (19 - 32)*	-	
Mental activity and mood	1.0 (1.0 - 2.0)	-	
Daily activities	2.0 (2.0 - 6.0)	-	
Motor activities	19 (11.0 - 29.0)	-	
H&Y	2.0 (2.0 - 3.0)	-	
Blood leukocytes (mm ³)	7,530 (3,330 - 9,100)	7,440 (5,120 - 10,200)	0.96
Monocytes (%)	8.0 (5.8 - 12.0)	7.50 (4.7 - 11.2)	0.71
C-reactive protein (mg/L)	0.90 (0.4 - 1.9)	1.10 (0.4 - 2.9)	0.28
Male/Female	9 M / 3 F	9 M / 3 F	
Elderly adult individuals ≥ 65 years old	n = 14	n = 14	
Age (years)	69 (65 - 76)	69 (65 - 75)	0.95
Age PD late onset (years)	54 (46 - 59)	-	
Disease duration (years)	16 (12 - 20)	-	
UPDRS	30 (21 - 46)	-	
Mental activity and mood	2.0 (1.0 - 8.0)	-	
Daily activities	4.0 (2.0 - 14.0)	-	
Motor activities	27.0 (15.0 - 32.0)	-	
H&Y	2.0 (2.0 - 3.0)	-	
Blood leukocytes (mm ³)	6,230 (4,580 - 8,120)	6,350 (4,650 - 10,860)	0.53
Monocytes (%)	8.0 (5.8 - 10.4)	7.4 (5.2 - 10.1)	0.44
C-reactive protein (mg/L)	1.1 (0.4 - 2.7)	1.1 (0.5 - 2.9)	0.56
Male/Female	11 M / 3 F	11 M / 3 F	

Patients with Parkinson's disease (PD) and control subjects were matched by sex and age. UPDRS: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*; H&Y: *Hoehn & Yahr scale*. The data represent the medians (minimum and maximum values); *p < 0.05 (Young vs elderly PD patients; Mann Whitney test).



Supplementary Figure 1. Age is negatively associated with blood leukocyte and monocytes counts, and positively associated with serum C-reactive protein concentrations in healthy individuals and patients with Parkinson Disease (PD). Correlation between blood leukocyte count and age of PD patients (A) and healthy control subjects (B). Correlation between blood monocytes counts and the age of PD patients (C) and healthy controls (D). Correlation between serum C-reactive protein concentrations and age of PD patients (E) and healthy controls (F). The data represent the individual values evaluated by Spearman's Correlation test.

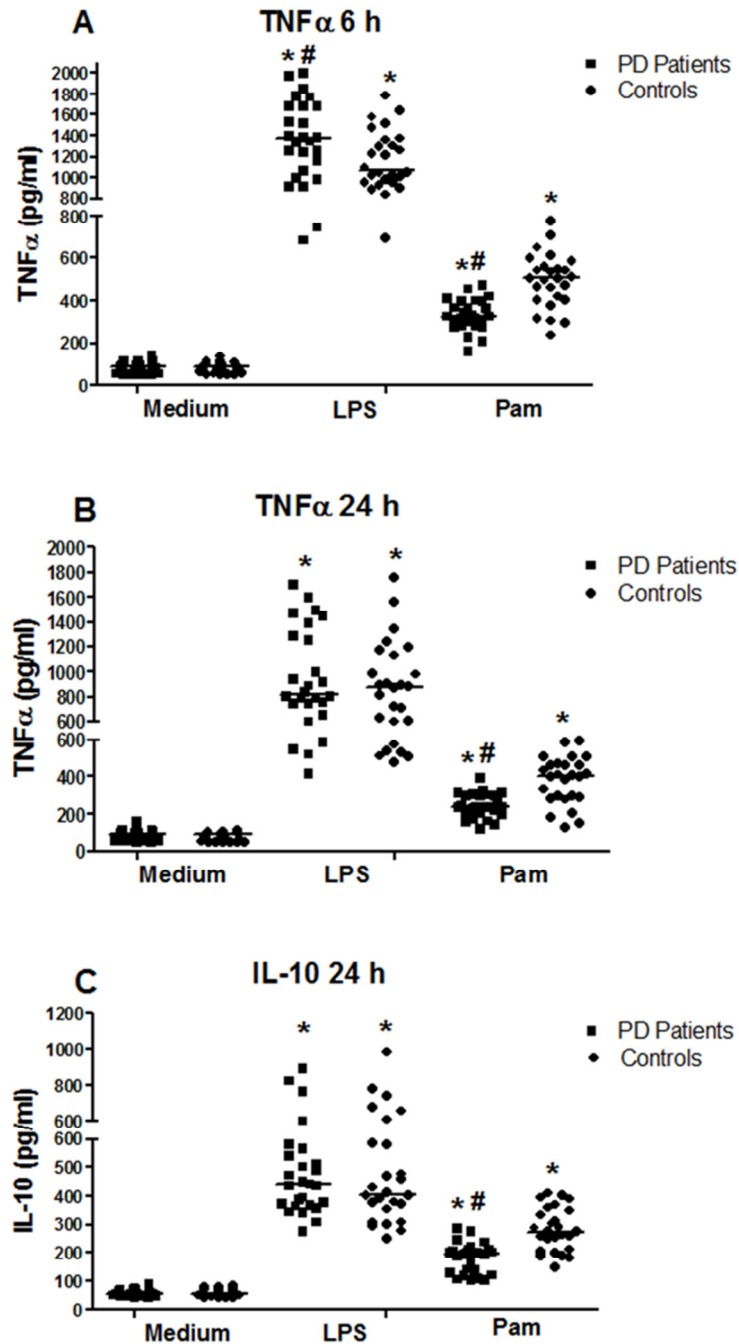


Figure 1. Production of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin10 (IL-10) is decreased in whole blood cultures from Parkinson Disease patients after activation with TLR2 agonist. Whole blood cultures from PD patients and healthy control were treated with either 100 ng/ml LPS (TLR4 agonist) or 1.0 μ g/ml Pam₃Cys (Pam, TLR2/1 agonist), for 6 h or 24 h. After, the supernatants were harvested for evaluation of TNF α or IL-10 concentration by ELISA. TNF α concentrations after 6 h (A) or 24 h (B) of stimulation with TLR4 or TLR2/1 agonists. Concentrations of IL-10 after 24 h of stimulation with TLR4 or TLR2/1 agonists (C). The data represent the individual and median values (n = 26 patients; 26 controls matched by sex and age), * p < 0.05 (medium vs LPS, medium vs Pam, Wilcoxon paired test); # P < 0.05 (patients vs controls, Mann Whitney U test).

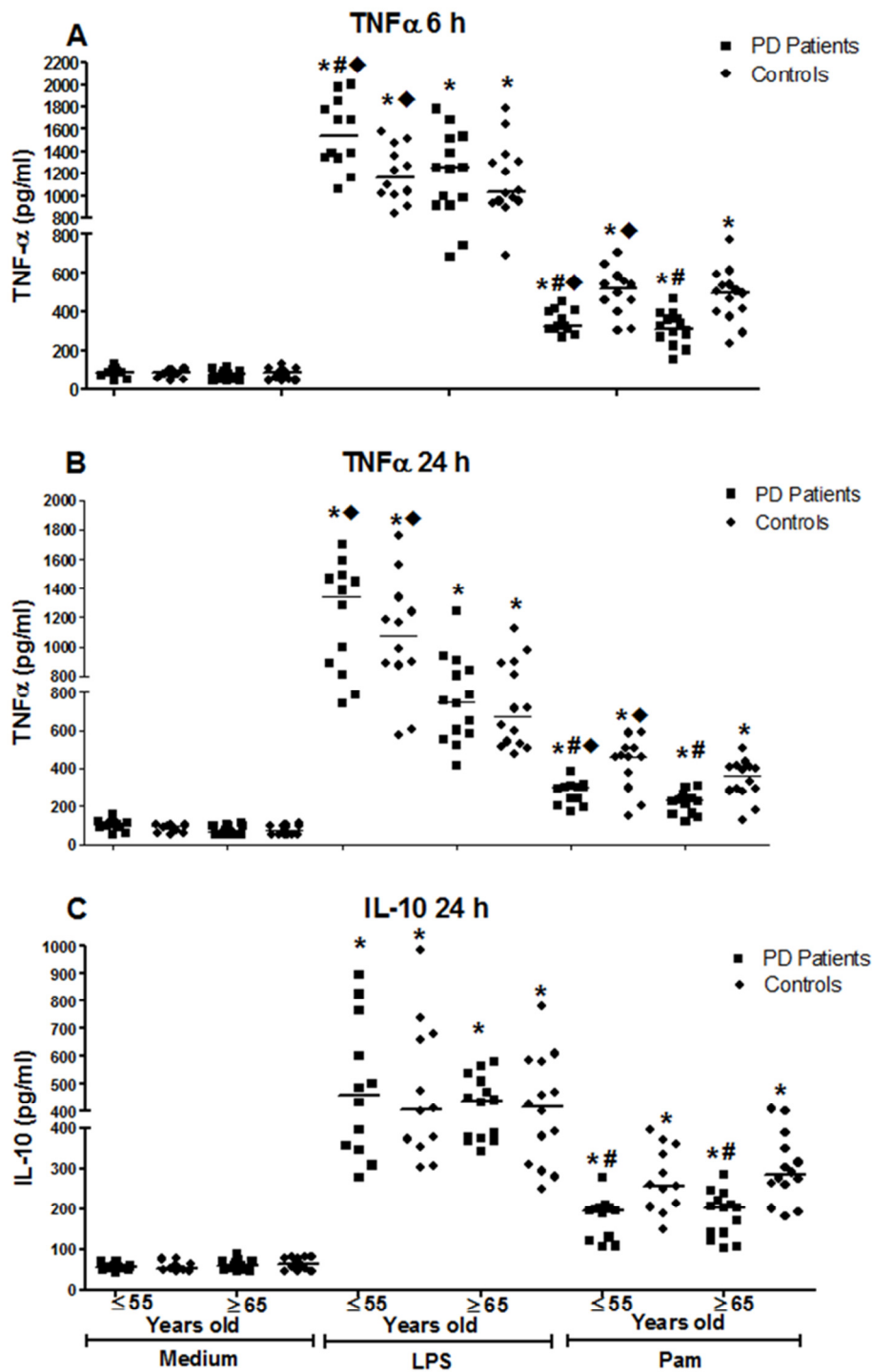
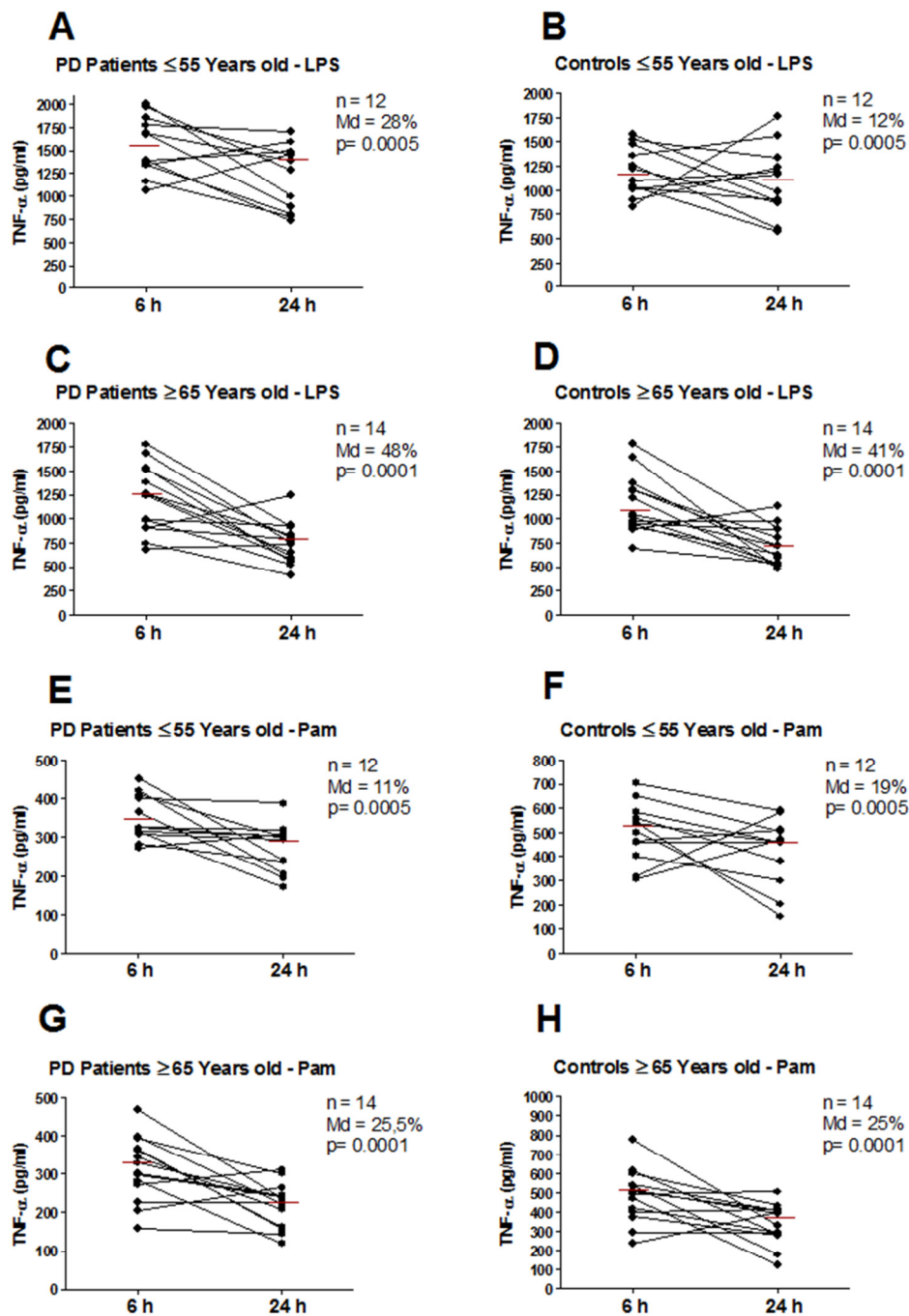


Figure 2. TLR2-induced tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 10 (IL-10) production is decreased in PD Patients independent of age. Patients (n = 26) and healthy control subjects (n = 26) were subdivided into two groups according to their age: ≤ 55 years and ≥ 65 years of age. Whole blood cultures from PD patients and healthy controls were treated with 100 ng/ml of LPS (TLR4 agonist) or 1.0 μ g/ml of Pam₃Cys (Pam, TLR2/1 agonist). Supernatants were harvested for evaluation of TNF α (6 h, A, B) or IL-10 (24 h, C) concentrations by ELISA. Data represent individual values and median, * p < 0.05 (Medium vs LPS, Medium vs Pam, Wilcoxon paired test); # P < 0.05 (patients vs controls, Mann Whitney U test). ♦ p < 0.05 Pacientes DP ≤ 55 anos vs Pacientes DP ≥ 65 anos e Controles saudáveis ≤ 55 anos vs Controles saudáveis ≥ 65 anos (teste de Mann Whitney).



Supplementary Figure 2. Production of tumor necrosis factor alpha (TNF α) decreases from 6 h to 24 h of incubation with LPS/TLR4 or Pam₃Cys/TLR2/1: intensification of the reduction of TLR4 response with age. Whole blood cultures from PD patients and healthy controls were incubated with LPS (100 ng/ml) or Pam₃Cys (Pam, 1.0 μ g/ml) for 6 h or 24 h. TNF α concentration was assessed by ELISA in culture supernatants. TNF α concentrations in cultures incubated with LPS from PD patients (A) or controls (B) $\leq$ 55 years old; TNF α concentrations in cultures incubated with LPS from PD patients (C) or controls (D) $\geq$ 65 years old; TNF α concentrations in cultures incubated with Pam from PD patients (E) or controls (F) $\leq$ 55 years old; TNF α concentrations in cultures incubated with Pam from PD patients (G) or controls (H) $\geq$ 65 years old. The data represent individual values evaluated by Wilcoxon paired test, and Md = Median of % of reduction from 6 h to 24 h.

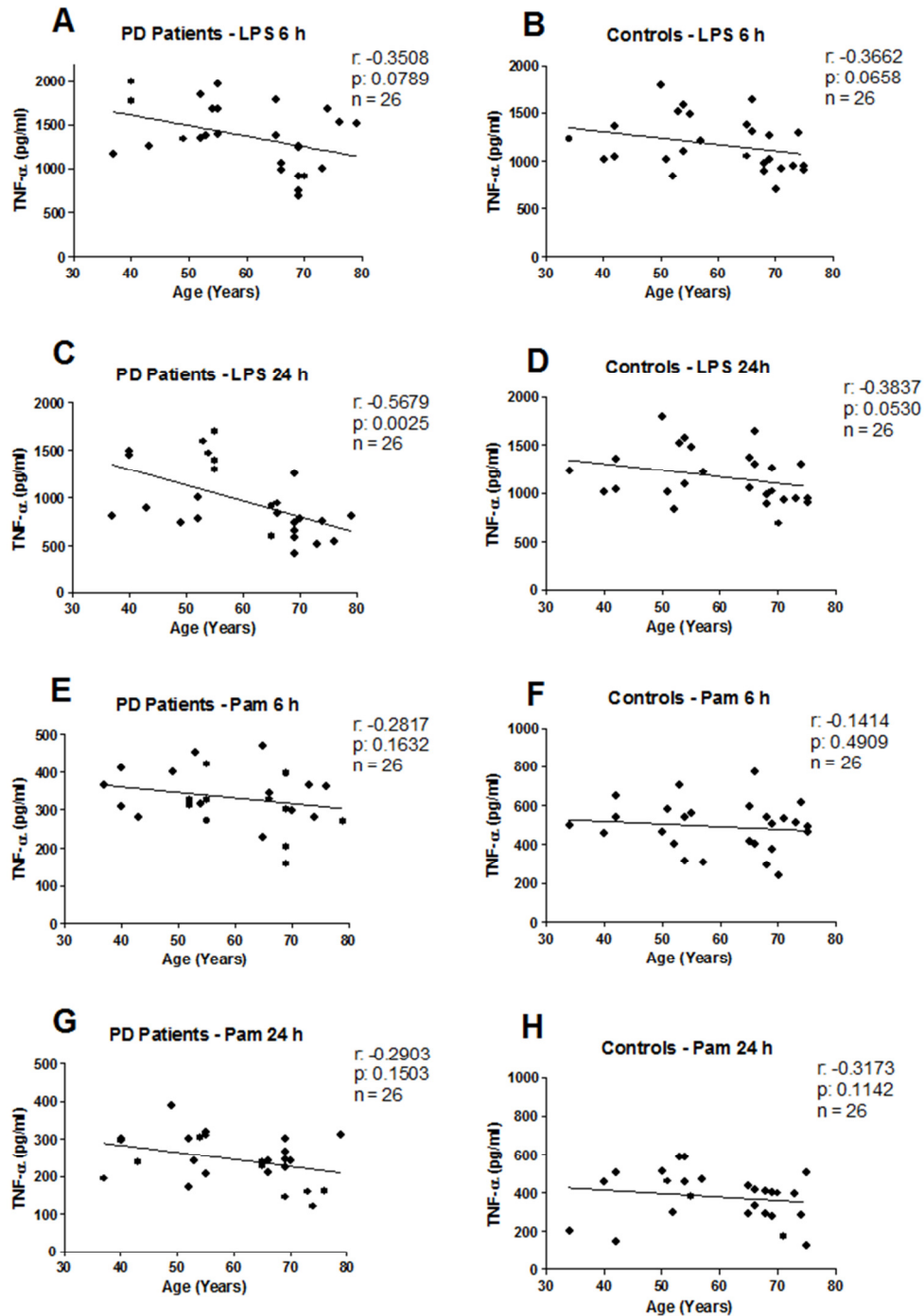
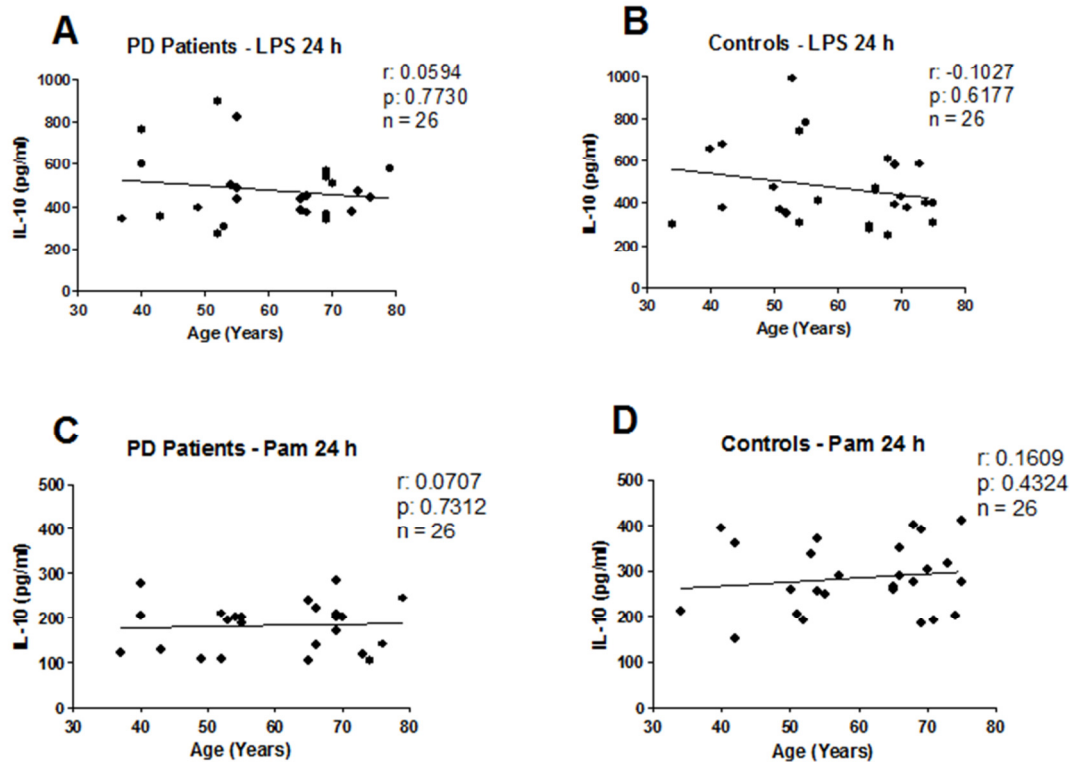


Figure 3. TLR4- but not TLR2-induced tumor necrosis factor alpha (TNF α) levels are reversely associated with age in Parkinson Disease (PD) patients and controls. Whole blood cultures from PD patients and controls were treated with 100 ng/ml of LPS (TLR4 agonist) or 1.0 μ g/ml of Pam₃Cys (Pam, TLR2/1 agonist). Supernatants were collected for evaluation of TNF α concentrations by ELISA. TNF α concentrations after 6 h (PD Patients (A) or Controls (B)) or 24 h (PD Patients (C) or Controls (D)) of stimulation with LPS. TNF α concentration after 6 h (PD Patients (E) or Controls (F)) or 24 h (PD Patients (G) or Controls (H)) of stimulation with Pam. The data represent the individual values evaluated by Spearman's Correlation test.



Supplementary Figure 3. Evaluation of interleukin 10 (IL-10) concentrations in whole blood cultures from Parkinson Disease (PD) patients and healthy controls according to age. Whole blood cultures from PD patients and controls were treated with 100 ng/ml of LPS (TLR4 agonist) or 1.0 µg/ml of Pam₃Cys (Pam, TLR2/1 agonist). Supernatants were harvested for evaluation of IL-10 concentration by ELISA. IL-10 concentrations after 24 h of stimulation with LPS (PD Patients (A) or Controls (B)) or with Pam₃Cys (PD Patients (C) or Controls (D)). The data represent the individual values evaluated by Spearman's Correlation test.

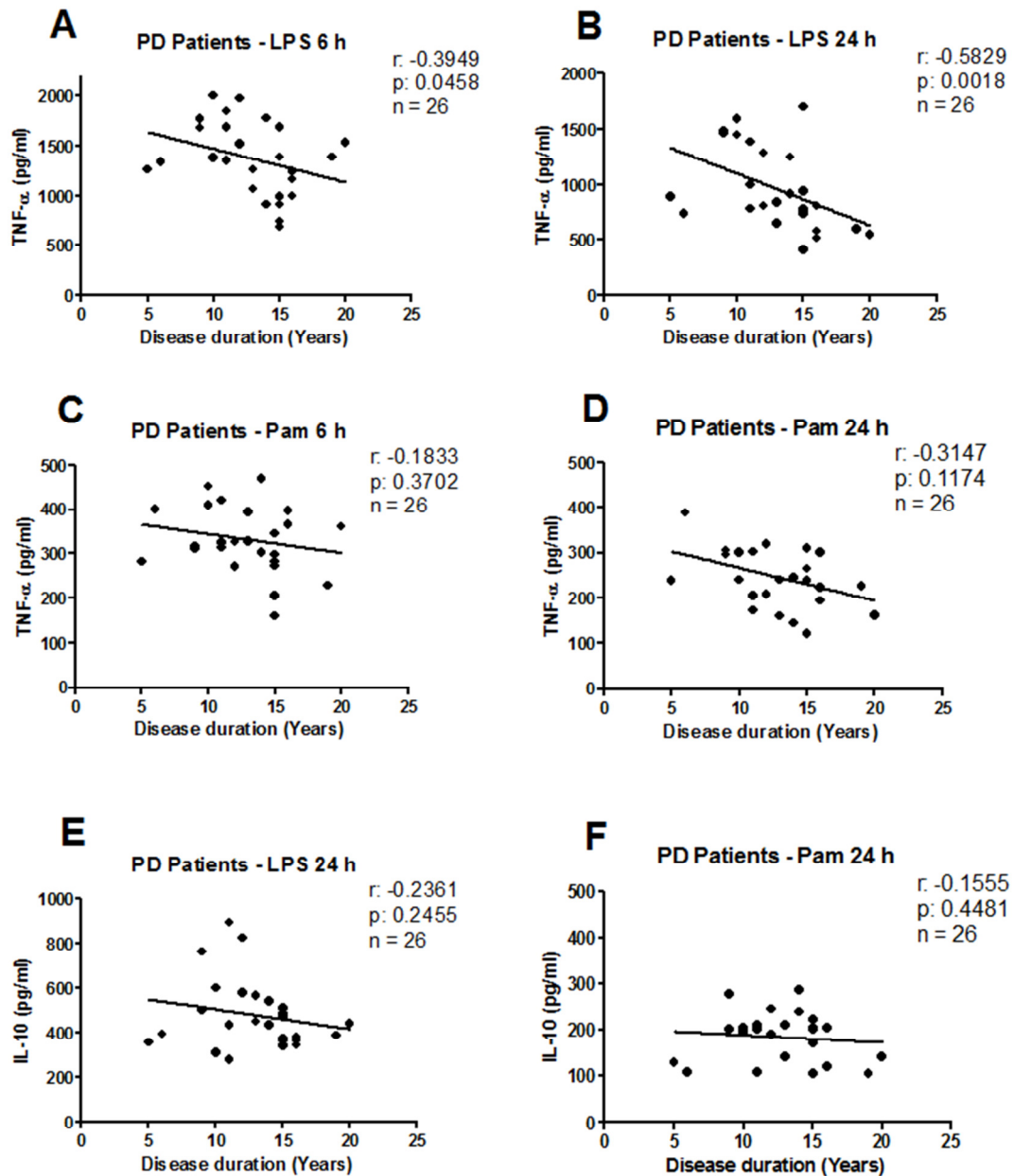
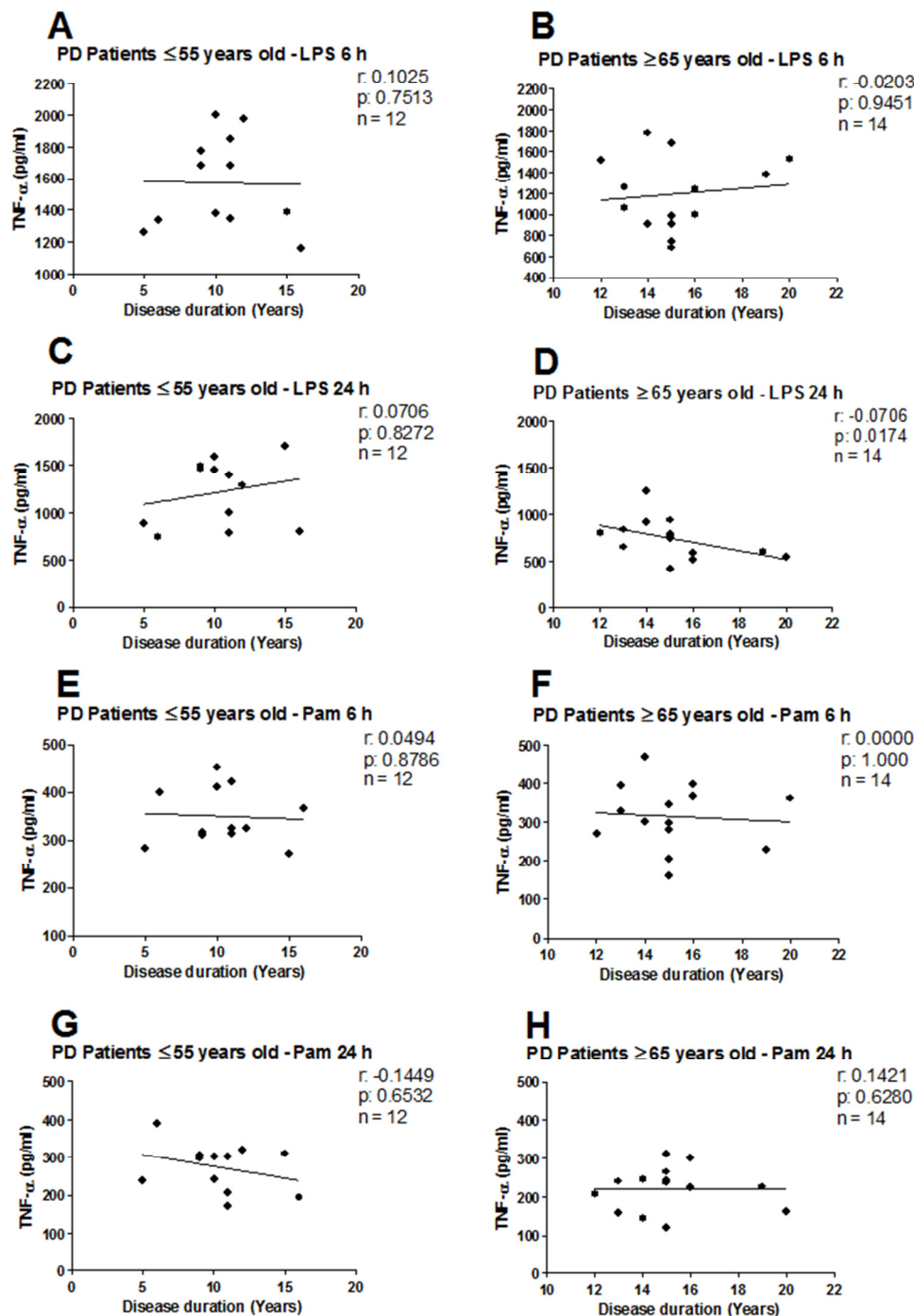


Figure 4. Production of LPS-induced tumor necrosis factor alpha (TNF α) decreases as the duration of Parkinson Disease (PD) increases, but the response to TLR2/1 agonist seems to be not affected by duration of PD. Whole blood cultures from patients and controls were incubated with LPS (100 ng/ml) or Pam₃Cys (Pam, 1.0 μ g/ml). Culture supernatants were evaluated for TNF α and IL-10 concentrations by ELISA. Correlation between TNF α concentrations and disease duration after 6 h (A) or 24 h (B) of incubation with LPS. Correlation between TNF α concentrations and duration of disease after 6 h (C) or 24 h (D) of incubation with Pam₃Cys. Correlation between IL-10 concentrations and duration of disease after 24 h (E) of incubation with LPS or with Pam (F). The data represent the individual values evaluated by Spearman's Correlation test.



Supplementary Figure 4. Reduction of TNF α production (24 h) is associated with disease duration in elderly Parkinson Disease (PD) patients. PD patients were subdivided into two groups according to their age (≤ 55 years and ≥ 65 years old). Whole blood cultures were incubated with LPS (100 ng/ml) or Pam₃Cys (Pam, 1.0 μ g/ml). Culture supernatants were evaluated for TNF α concentrations by ELISA. Correlation between TNF α concentrations and disease duration, after 6 h of incubation with LPS: (A) PD patients ≤ 55 years old and (B) PD patients ≥ 65 years of age. Correlation between TNF α concentrations and duration of disease after 24 h incubation with LPS: (C) PD patients ≤ 55 years old and (D) PD patients ≥ 65 years of age. Correlations between TNF α concentrations after stimulation with Pam for 6 h (E, PD patients ≤ 55 years old; F, PD patients ≥ 65 years old) or 24 h (G, PD patients ≤ 55 years old; H, PD patients ≥ 65 years old). The data represent the individual values evaluated by Spearman's Correlation test ($p < 0.05$).

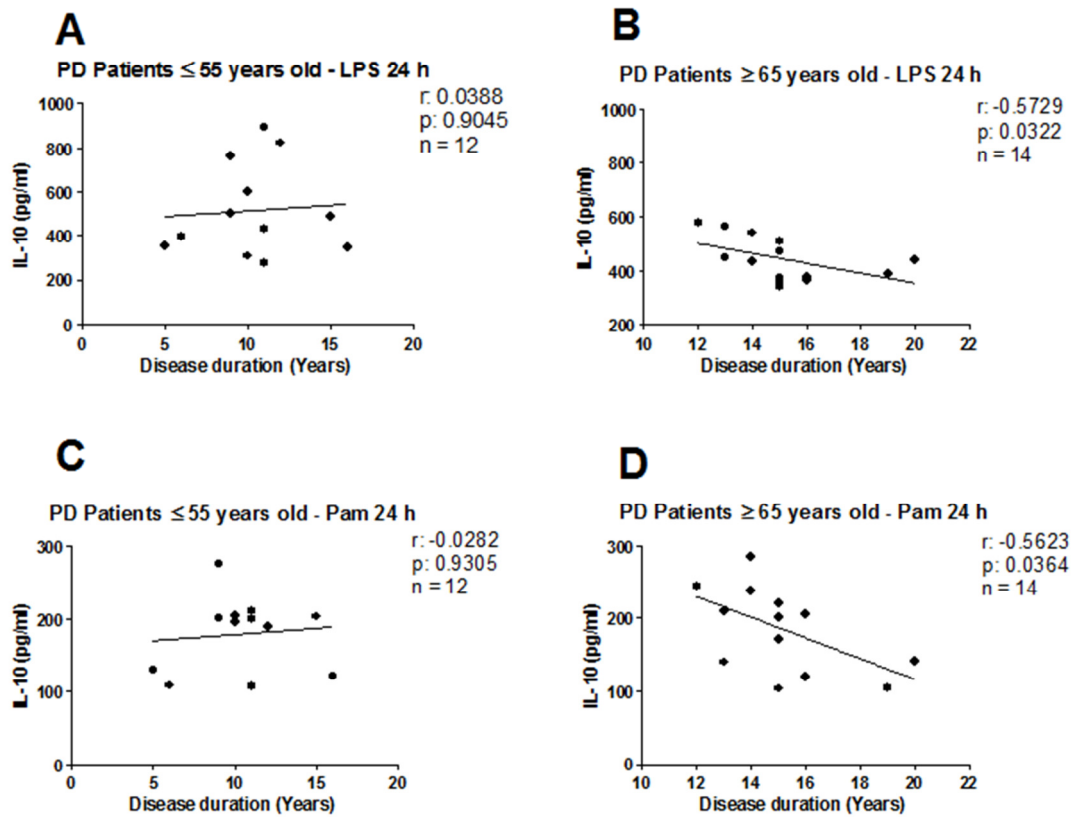


Figure 5. TLR4- and TLR2-induced interleukin 10 (IL-10) production is reversely associated with disease duration in elderly patients with Parkinson Disease (PD). Whole blood cultures from PD patients subdivided into two groups according to their age (≤ 55 years and ≥ 65 years old), were incubated with LPS (100 ng/ml) or Pam₃Cys (Pam, 1.0 μ g/ml). Culture supernatants were evaluated for IL-10 concentrations by ELISA after 24 h of incubation. Correlation was evaluated for LPS-induced IL-10 concentrations and disease duration: (A) PD patients ≤ 55 years and (B) PD patients ≥ 65 years old; correlation between Pam-induced IL-10 concentrations and duration of disease: (C) PD patients ≤ 55 years and (D) PD patients ≥ 65 years old. The data represent the individual values evaluated by Spearman's Correlation test ($p < 0.05$).

Manuscrito 2

A elevada expressão de TLR10 em monócitos humanos de pacientes com Doença de Parkinson regula a atividade de TLR2: possível contribuição para diminuir a gravidade da doença

High expression of TLR10 in patients with Parkinson's Disease regulates the activity of TLR2: possible contribution to decrease disease severity

Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho^{1,5}, Delson José da Silva², Valéria Bernadete Leite Quixabeira³, Cristina Ribeiro de Barros Cardoso⁴, Fátima Ribeiro-Dias^{5*}

1. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás). Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia-GO, Brasil.

2. Núcleo de Neurociências do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-UFG, Instituto Integrado de Neurociências, Goiânia-GO, Brasil.

3. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), Goiânia-GO, Brasil.

4. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP, Universidade de São Paulo-SP, Brasil

5. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia-GO, Brasil.

*Corresponding author - Address: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone: +55 62 3209 6116, Fax: +55 62 3209 6363. E-mail address: fatimardias@gmail.com

Manuscrito a ser submetido ao periódico Movement Disorders

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disease characterized by the progressive and irreversible loss of dopaminergic neurons. Inflammatory mechanisms have been associated with the pathophysiology of this disease. Toll-like receptors (TLR) are expressed in different immune cells and recognize a wide variety of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), leading to the release of inflammatory and toxic molecules, which may contribute for neuroinflammation in PD. The objective of this study was to compare the peripheral blood leukocyte potential of patients with PD or healthy individuals in the production of TNF α or IL-10 after exposure of these cells to TLR agonists and to investigate the expression of TLR1, TLR2 and TLR10 in monocyte subpopulations. Patients' peripheral blood leukocytes produced lower levels of TNF α and IL-10 in response to the TLR2 agonist than control subjects' blood leukocytes. A higher percentage of the subpopulation of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes in the peripheral blood of patients with PD compared to healthy controls was observed, as well as a higher percentage of monocytes from PD patients expressing TLR10. The results demonstrate that the peripheral blood leukocyte response to TLR2 ligand is reduced in PD and that the expression of TLR10 in monocytes plays an inhibitory role in the activity of TLR2 on its agonist, confirmed by the neutralization assay of TLR10 with monoclonal antibody. DP patients with greater disease severity had lower expression of TLR10 in monocytes, and TLR10 expression in peripheral blood leukocytes from patients could be suggested as a possible prognostic biomarker for PD.

Key words: Parkinson's disease. Toll-like receptors. Monocytes. Cytokines.

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade neurodegenerativa complexa caracterizada pela perda progressiva e irreversível de neurônios dopaminérgicos. Mecanismos inflamatórios têm sido associados com a fisiopatologia desta doença. Os receptores similares a *Toll* (TLR) são expressos em diferentes células imunológicas e reconhecem uma ampla variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e moléculas derivadas de danos teciduais (DAMPs), levando à liberação de moléculas inflamatórias e tóxicas, que podem contribuir para a neuroinflamação associada à DP. O objetivo deste estudo foi comparar o potencial de leucócitos do sangue periférico de pacientes com DP ou indivíduos saudáveis na produção de TNF α ou IL-10 após a exposição destas células a agonistas de TLR e investigar a expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 em subpopulações de monócitos. Os leucócitos do sangue periférico dos pacientes produziram níveis reduzidos de TNF α e IL-10 em resposta ao agonista de TLR2 do que os leucócitos dos indivíduos controles. Foi observado um maior percentual da subpopulação de monócitos CD14⁺⁺CD16⁺ no sangue periférico dos pacientes com DP em relação aos controles, assim como maior percentual de monócitos de pacientes expressando o TLR10. Os resultados demonstram que a resposta de leucócitos do sangue periférico ao ligante de TLR2 é reduzida na DP e que a expressão de TLR10 em monócitos exerce um papel inibitório na atividade de TLR2 ao seu agonista, confirmado pelo ensaio de neutralização de TLR10 com anticorpo monoclonal. Pacientes DP com maior gravidade da doença apresentaram menor expressão de TLR10 nos monócitos, podendo-se sugerir a expressão de TLR10 em leucócitos do sangue periférico dos pacientes como um possível biomarcador prognóstico para a DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Receptores Toll-like. Monócitos. Citocinas

1. Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma afecção neurodegenerativa de etiologia ainda desconhecida, que atinge os gânglios da base cerebrais, provocando a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, na substância negra (*pars compacta*) no mesencéfalo. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e pode provocar sintomas motores e não motores, podendo levar à incapacidade funcional e ao comprometimento da qualidade de vida (Verbaan et al., 2007; Lees, 2009). A causa da neurodegeneração na DP não é completamente compreendida, mas evidências demonstram que alterações inflamatórias/imunes podem estar envolvidas na fisiopatologia da doença (Collins et al., 2012; Dzamko et al., 2014). A fisiopatologia da DP envolve aspectos da resposta imune evidenciados por alterações no sangue periférico e no sistema nervoso central (SNC) que, geralmente, aumentam com a duração da doença (Croisier et al., 2005). A reatividade da micróglia contra estímulos exógenos e/ou endógenos, no cérebro de pacientes com DP, gerando neuroinflamação, tem sido reconhecida como o mecanismo imunológico primordial na patogênese desta doença, correlacionada também com a gravidade das deficiências motoras (McGeer e McGeer, 2004, Ouchi et al., 2005; Dzamko et al., 2017).

Estudos têm evidenciado o possível envolvimento dos receptores similares a Toll (Toll-like receptors – TLRs) na patogenia da DP (Panaro et al., 2008; Ros-Bernal et al., 2011; Kim et al., 2013; Silva et al., 2016; Dzamko et al., 2017). Os TLRs são expressos, basicamente, em células do sistema imune inato, que desempenham um importante papel na resposta imune contra microrganismos e também em processos de lesão tecidual por agentes não microbianos, reconhecendo os padrões moleculares associados a danos teciduais (Damage-associated molecular pattern – DAMPs) (Kawai e Akira, 2010). Estímulos inflamatórios podem produzir efeitos benéficos, tais como fagocitose de restos celulares e de células apoptóticas e iniciar um processo de reparo tecidual, porém a inflamação não adequadamente controlada pode resultar na produção de fatores neurotóxicos capazes de desencadear ou exacerbar a patologia das afecções neurodegenerativas (Esiri, 2007; Nolan et al., 2013).

Alguns estudos têm demonstrado a co-existência de neuroinflamação e neurodegeneração na DP (Esiri, 2007; Klegeris et al., 2007), mas pouco se sabe sobre a participação de células periféricas nestes processos, sendo ressaltado que o processo de neuroinflamação não regulado colabora para a morte de neurônios dopaminérgicos. No

sangue circulante, dentre as células da imunidade natural, os monócitos têm acesso ao cérebro, especialmente durante processos inflamatórios (Getts et al., 2008; Drevets et al., 2010; Kannarkat et al., 2013; Grozdanov et al., 2014). Estas células expressam vários TLRs e, após interação com PAMPs (do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*) e/ou DAMPs, produzem citocinas, tanto pró- quanto anti-inflamatórias, podendo participar ativamente da neuroinflamação. Ainda, o monócito pode se diferenciar em micróglia durante um processo inflamatório (Djukic et al., 2009; Etemad et al., 2012).

Distintas subpopulações de monócitos podem ser observadas no sangue periférico. Os monócitos clássicos expressam a molécula CD14 em grande intensidade ($CD14^{++}$) e não expressam CD16 ($CD16^{-}$), compreendendo cerca de 90% dos monócitos do sangue (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Além destes, cerca de 10% dos monócitos expressam o CD14 e o CD16, identificando duas subpopulações, a $CD14^{++}CD16^{+}$, denominados monócitos intermediários, e a $CD14^{+}CD16^{+}$ ou monócitos não clássicos (Cros et al., 2010; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Acredita-se que alterações das subpopulações de monócitos, da expressão de TLRs nestas subpopulações e do perfil de citocinas produzidas por estas células possam estar envolvidos na patogenia da DP (Drouin-Ouellet et al., 2014; Grozdanov et al., 2014). Os monócitos expressam TLR2, que reconhece a α -sinucleína, que é um DAMP produzido no cérebro durante a DP (Codolo et al., 2013). Recentemente, nosso grupo mostrou que, em hemoculturas de pacientes com DP, há uma reduzida produção de citocinas inflamatórias após ativação celular com agonista de TLR2 (Silva et al., 2016).

O TLR2 é um receptor que pode atuar em conjunto com TLR1, TLR6 ou TLR10 (Hasan et al., 2005; Jin et al., 2007; Kang et al., 2009), formando heterodímeros que potencializam o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, especialmente, por células do sistema imune inato, como os monócitos/macrófagos. O TLR10 pode formar homodímeros entre si ou heterodímeros com TLR1, TLR2 ou TLR6 (Hasan et al., 2005; Guan et al., 2010; Godfroy et al., 2012), mas o seu ligante não é conhecido até o momento. A expressão de TLR10 tem sido observada em diversos leucócitos, tais como: linfócitos B, células dendríticas, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (Hasan et al., 2005; Hornung et al., 2002; Berma et al., 2013; Nagase et al., 2003; Mansson et al., 2006). Estudos sugerem que TLR10 seja um receptor de reconhecimento de padrões incomum, com funções principalmente inibidoras sobre respostas imunes dirigidas por

TLR2 (Guan et al., 2010; Laayouni et al., 2014; Mikacenic et al., 2013; Oosting et al., 2014).

Como em nosso estudo prévio (Silva et al. 2016) a resposta via TLR2 estava diminuída em pacientes com DP, nós hipotetizamos que isto possa ser devido a uma ação de TLR10 sobre o TLR2. Assim, no presente estudo foi avaliada a expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 nas subpopulações de monócitos, a produção de citocinas em culturas de células mononucleares (CMN) do sangue periférico, após estimulação com agonista de TLR2 e o impacto da neutralização de TLR10 na ativação de TLR2, em pacientes com DP.

2. Material e Métodos

2.1. Desenho do estudo, pacientes com DP e controles

Trata-se de um estudo prospectivo que incluiu pacientes com DP, assistidos no Núcleo de Neurociências do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), no Instituto Integrado de Neurociências – IINEURO e no Centro de Referência em Transtornos do Movimento – CerMovi do Núcleo de Neurociências do Hospital das Clínicas da UFG, Goiânia, Goiás, Brasil. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da UFG (protocolo CAAE: 20032113.0.0000.5078). Pacientes com DP e indivíduos controles saudáveis que aceitaram o convite para participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram incluídos e pareados, por sexo e idade, 26 novos pacientes com DP e 26 indivíduos controles saudáveis, de ambos os sexos (20 M / 6 F), com idades de 34 a 76 anos. Os indivíduos controles foram doadores de sangue do Banco de Sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH), do Banco de sangue do HC-UFG e indivíduos saudáveis da comunidade. O diagnóstico da DP foi realizado de acordo com os critérios do Banco de Cérebro de Londres (Litvan et al., 2003), sendo os pacientes avaliados pelas escalas: Unificada da Doença de Parkinson (UPDRS); Hoehn & Yahr (Hoehn & Yahr, 1967) e Schawb & England (Horta, 2003). Foram excluídos os pacientes que apresentaram parkinsonismo secundário e/ou atípico; pacientes e indivíduos controles em uso de medicamentos imunossupressores, corticosteróides e/ou anti-inflamatórios não esteróides há pelo menos três meses; pacientes e controles febris, indivíduos portadores de doenças cardiovasculares, diabéticos e aqueles participantes

que apresentaram alterações sugestivas de infecção e/ou inflamação, avaliados pelo hemograma e dosagem da proteína C-reativa.

2.2. Obtenção das amostras de sangue

O sangue periférico dos pacientes com DP e indivíduos controles sadios foi obtido por meio de punção venosa periférica, em tubos à vácuo (Vacuette, GreinerBio-one, Americana, SP, Brasil). Foram colhidos 10 mL de sangue em tubos contendo o anticoagulante EDTA-K3 (Vacutainer, Becton Dickinson, BD, EUA), para a realização do hemograma, citometria de fluxo e separação de células mononucleares (CMN). Foram obtidos 5 mL de sangue em tubos sem anticoagulante (Vacutainer, BD) para obtenção de soro e dosagem da proteína C reativa (PCR). Após coagulação e retração do coágulo (1 h, temperatura ambiente, T.a.), o soro foi obtido após centrifugação a 500 g, 5 min, 4°C. Todas as amostras sanguíneas foram processadas, no máximo, 3 h após a colheita, no período das 9:00 às 11:00 da manhã, para não comprometer a sua viabilidade ou ativação celular.

2.3. Leucometria e dosagem da proteína C reativa (PCR)

Uma alíquota de 500 µL de sangue venoso periférico dos pacientes e de controles foi utilizada para a realização do hemograma em analisador hematológico automatizado Sysmex XED-2100 (Roche, Suíça). Os resultados da contagem absoluta e percentual dos leucócitos e monócitos foram apresentados como leucócitos ou monócitos/mm³ e %, respectivamente.

A determinação quantitativa da PCR foi realizada por imunoturbidimetria (analisador automatizado Selectra XL, Holanda), usando partículas de látex revestidas com anticorpos anti-PCR. O limite de detecção da reação foi de 0,05 mg/L de PCR, sendo os valores menores do que 3,0 mg/L considerados normais (Kit SPINREACT, Ref. 43134, Santa Coloma, Espanha).

2.4 Obtenção de Células Mononucleares (CMN) do Sangue Periférico, cultura e tratamentos com agonistas de TLR

As CMN do sangue periférico dos pacientes e indivíduos controles foram separadas pela técnica de centrifugação em gradiente de densidade, utilizando-se a solução LymphoprepTM (Stemcell Technologies, WA, EUA, densidade = 1,077 g/mL). O sangue total, colhido com EDTA, foi diluído v/v em solução salina tamponada com fosfatos (PBS)-EDTA (0,01 mM, pH 7,3) e aplicado sobre o Lymphoprep. Após centrifugação a 1400 g, por 30 min., à 21 °C, o anel de CMN foi colhido e as células foram lavadas duas vezes com PBS, a 800 g, 10 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as CMN foram ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI 1640, suplementado com Hepes 10 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/L, 11 mM de bicarbonato de sódio e 2 mM de L-glutamina (todos os reagentes Sigma), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Invitrogen, São Paulo, Brasil). A viabilidade celular foi avaliada com azul tripan 0,01% em PBS, sendo as células usadas somente quando a viabilidade foi maior do que 90%. As CMN foram quantificadas em hematocítmetro, um total de $1,0 \times 10^6$ CMN/ml foi utilizado para marcação celular de monócitos com anticorpos monoclonais e análise por citometria de fluxo. As CMN da suspensão celular foram acertadas para $4,0 \times 10^5$ células/200 µL e cultivadas em microplacas de poliestireno, fundo em U, de 96 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), na ausência ou na presença de Pam₃Cys SKKKK (EMC-Biochemicals, Tübingen, Alemanha) na concentração de 1,0 µg/mL, por 24 horas, a 37 °C, 5% de CO₂. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram colhidos, aliquotados e congelados (-20°C), para posterior dosagem de citocinas.

2.5 Análises das subpopulações de monócitos e da expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 por citometria de fluxo

Para a imunofenotipagem dos monócitos, o sangue periférico e a suspensão celular de CMN ($1,0 \times 10^6$ /mL) dos pacientes e seus respectivos controles, foram incubados na ausência ou presença de anticorpos monoclonais, previamente titulados, anti-CD14 (APC, clone M5E2, BioLegend, San Diego, CA, EUA) e anti-CD16 (PerCP, clone 3G8, Exbio, Vestec, Czech Republic) e seus respectivos isótipos controles, por 30

minutos. Os anticorpos anti-CD16 foram do clone 3G8, os neutrófilos CD16⁺ foram excluídos das análises (Heimbecket al., 2010). Após a incubação com os anticorpos, os eritrócitos foram lisados com 2 mL de solução de lise (BD, Pharmingen), durante 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas (500 g, 7 min, 4°C) e, posteriormente, fixadas com solução de paraformaldeído a 1% em PBS. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson, FACScalibur), sendo adquiridos 30.000 eventos totais, baseados nos parâmetros de tamanho celular (ForwardScatter - FSC) e complexidade citoplasmática (SideScatter - SSC), e 5.000 eventos na janela das células CD14⁺. As análises das subpopulações dos monócitos foram realizadas de acordo com Cros et al. (2010) e Heimbeck et al. (2010). Os dados adquiridos foram avaliados com a utilização do programa Flow Cytometry Software (FCS) versão 4 (DNS, Los Angeles, CA, EUA). Os dados são apresentados como porcentagens de células positivas (%) e intensidade média de fluorescência (IMF).

A avaliação da expressão celular dos TLRs nos monócitos foi realizada apenas na suspensão de CMN. Assim, as CMN do sangue periférico foram incubadas com anticorpos anti-TLR1 (PE, clone GD2.F4, eBioscience, San Diego, CA, EUA), TLR2 (FITC, clone TL2.1, eBioscience) ou TLR10 (PE, clone 3C10C5, eBioscience), em paralelo aos tratamentos com anti-CD14 e anti-CD16, como acima descritos. Após a adição de todos os anticorpos, as CMN foram incubadas, T.a. protegidas da luz, durante 30 min, sendo processadas e analisadas como descrito acima.

2.6 Avaliação do efeito do bloqueio de TLR10 na resposta via TLR2

As CMN ($4,0 \times 10^5$ células/200µL) obtidas do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Parkinson (n = 6) e de indivíduos controles saudáveis (n = 6) foram cultivadas em duplicatas em microplacas (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), fundo em U, de 96 poços, contendo meio RPMI 1640 suplementado como descrito acima, na ausência ou presença de Pam₃Cys SKKKK (EMC-Biochemicals, Tübingen, Alemanha) na concentração de 1,0 µg/mL, por 6 h e 24 horas, a 37 °C, 5% de CO₂.

Para o bloqueio do TLR10, as CMN foram pré-incubadas durante 1 h com 10 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-TLR10 (Isótipo IgG1 Kappa murino, Clone 3C10C5, Novus Biological, Cambridge, Reino Unido) ou IgG murino controle antes da exposição ao Pam₃Cys SKKKK.

2.7 Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados como valores individuais, medianas (mínimo e máximo), sendo comparados por meio do teste de Mann Whitney para amostras independentes e teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Para análises de correlação, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Foi utilizado o GraphPad PRISM software versão 5.0 (San Diego, CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Características dos pacientes com DP e indivíduos controles

As principais características demográficas e clínico-laboratoriais dos 26 pacientes e 26 indivíduos controles sadios incluídos neste estudo estão resumidas na tabela 1. Os participantes do estudo foram pareados por sexo (20M/6F) e idade (34 – 76 anos). O grupo total de pacientes apresentou tempo de duração da doença bastante variável (5 – 20 anos) e a gravidade da doença, de acordo com a escala de UPDRS, variou de escores de 19 a 46 pontos, indicando, portanto, um grupo de pacientes com doença leve a moderada. Dentro da escala UPDRS foram avaliadas alterações da atividade mental e do humor dos pacientes DP com variação de escores de 1.0 a 8.0, representando alterações leves, alterações para a realização de atividades de vida diária com variação de escores de 2.0 a 14.0, representando alterações leves a moderadas, também foram avaliadas alterações motoras dos pacientes DP, com variação de escores de 11.0 a 32.0, representando alterações leves a moderadas. A escala de Hoen & Yahr foi utilizada para a avaliação do estado de incapacidade geral de acordo com a gravidade da DP, que variou dos escores de 2.0 a 3.0, indicando incapacidade leve a moderada dos pacientes DP.

O número de leucócitos sanguíneos circulantes, a contagem diferencial de monócitos e a dosagem sérica da proteína C-reativa foi semelhante entre pacientes DP e indivíduos controles sadios.

Tabela 1. Características clínico-laboratoriais e demográficas de pacientes com doença de Parkinson e indivíduos controles

Variáveis	Pacientes DP	Controles	p
Grupo total	N = 26	N = 26	
Idade (anos)	66 (35 - 76)	65 (34 - 75)	0.97
Idade de início da DP (anos)	45 (32 - 60)	-	
Duração da doença (anos)	13 (5 - 20)	-	
UPDRS	20 (19 - 46)	-	
H&Y	2,0 (2,0 - 3,0)	-	
Leucócitos (mm ³)	6.745 (3.630 - 9.100)	6.510 (4.650 - 10.860)	0.57
Monócitos (% sangue)	8,1 (5,8 - 11,0)	7,5 (4,8 - 11,2)	0.45
Proteína C-reativa (mg/L)	1,0 (0,4 - 2,7)	1,0 (0,4 - 2,9)	0.52
Sexo M/F	20 M / 6 F	20 M / 6 F	

Pacientes com doença de Parkinson e indivíduos controles foram pareados por sexo e idade. UPDRS: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*; H&Y: *Hoen & Yahar scale*. Os dados representam valores individuais e medianas (mínimo e máximo), comparados por meio do teste de Mann Whitney para amostras independentes. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3.2. Pacientes com doença de Parkinson apresentam maior expressão de TLR10 em monócitos intermediários.

Para avaliar se os pacientes com doença de Parkinson apresentavam maior expressão dos TLRs 1, 2 e 10, monócitos foram analisados, primeiramente, de acordo com o tamanho celular e a granulosidade citoplasmática (FSC x SSC). A expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 foi avaliada nas células CD14⁺. A estratégia de análise das citometrias está resumida na Figura 1A.

Não observamos diferenças na porcentagem de células positivas para TLR1 e TLR2 entre controles e pacientes com DP. Por outro lado, a porcentagem de monócitos TLR10⁺ estava aumentada nos pacientes com DP comparados ao grupo controle (Figura 1B). As médias de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR2 e TLR10 estavam aumentadas em pacientes com DP, em comparação com o controle, enquanto nenhuma alteração foi observada na MFI de TLR1 (Figura 1C).

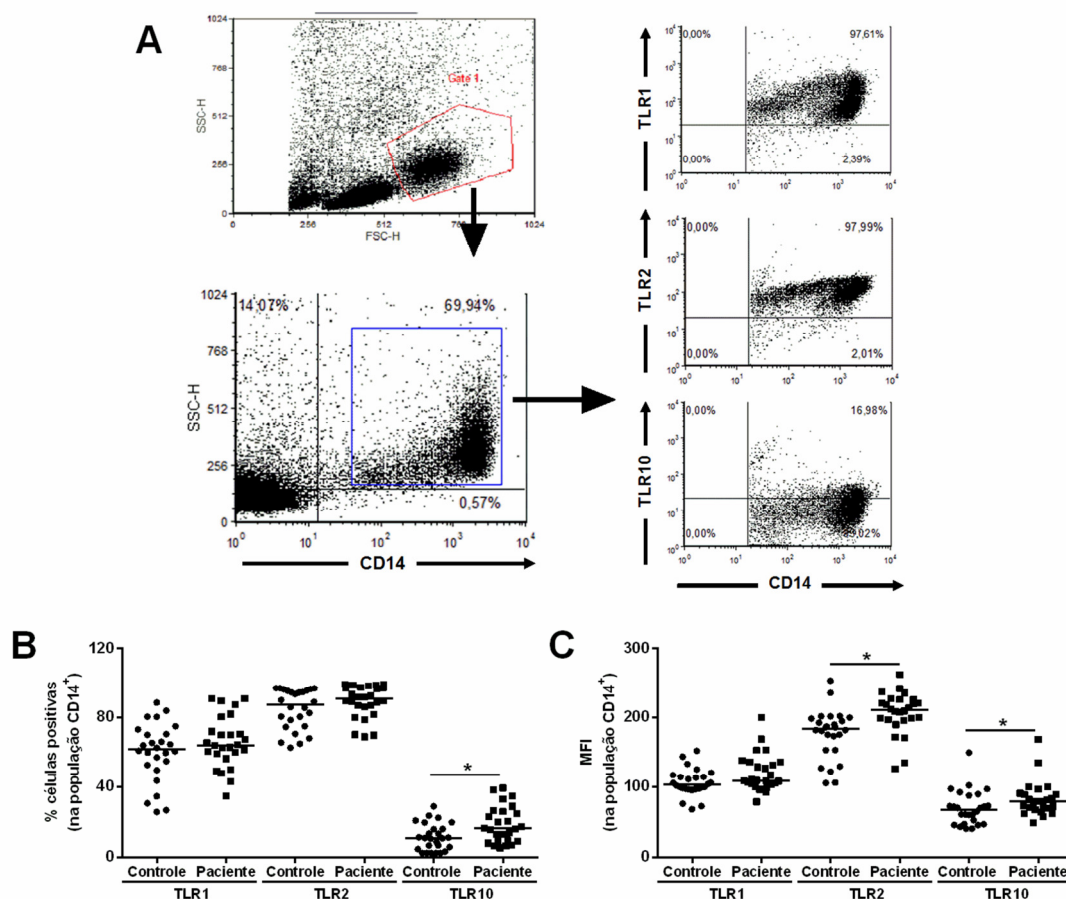


Figura 1. Elevada expressão de TLR10 em monócitos de pacientes com doença de Parkinson. Monócitos foram identificados com anticorpos anti-CD14 em CMN do sangue periférico e a expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 foi avaliada por citometria de fluxo. **(A)** Estratégia de análise da expressão de TLRs em monócitos CD14⁺. **(B)** Porcentagem de células expressando TLR1, TLR2 e TLR10 em controles saudáveis e pacientes com DP. **(C)** Média da intensidade de fluorescência (MFI) para TLR1, TLR2 e TLR10 em controles saudáveis e pacientes com DP. Pacientes DP (n = 26) e indivíduos controles saudáveis (n = 26) foram pareados por sexo e idade. Os dados representam valores individuais e as medianas. *p < 0,05 (pacientes vs controles, teste U de Mann Whitney).

Para avaliar se a expressão de TLR10 é associada com alguma subpopulação de monócitos, analisamos, inicialmente, se haviam diferenças na frequência dessas subpopulações entre controles e pacientes com DP. A estratégia de análise das subpopulações de monócitos está resumida na Figura 2A. Não encontramos diferenças nas porcentagens de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) entre pacientes e controles. Por outro lado, observamos que pacientes com DP apresentam maior frequência de monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) do que os controles saudáveis (Figura 2B). Observamos, ainda, que a expressão de TLR1 é

similar entre pacientes e controles em todas as subpopulações de monócitos (Figura 2C). A frequência de monócitos clássicos e intermediários expressando TLR2, entretanto, estava aumentada em pacientes com DP em relação aos controles (Figura 2D). Finalmente, observamos que a elevada expressão de TLR10 em pacientes com DP se restringe aos monócitos intermediários (Figura 2E).

Nossos dados indicam que há um aumento da porcentagem de monócitos intermediários expressando TLR10 em pacientes com doença de Parkinson.

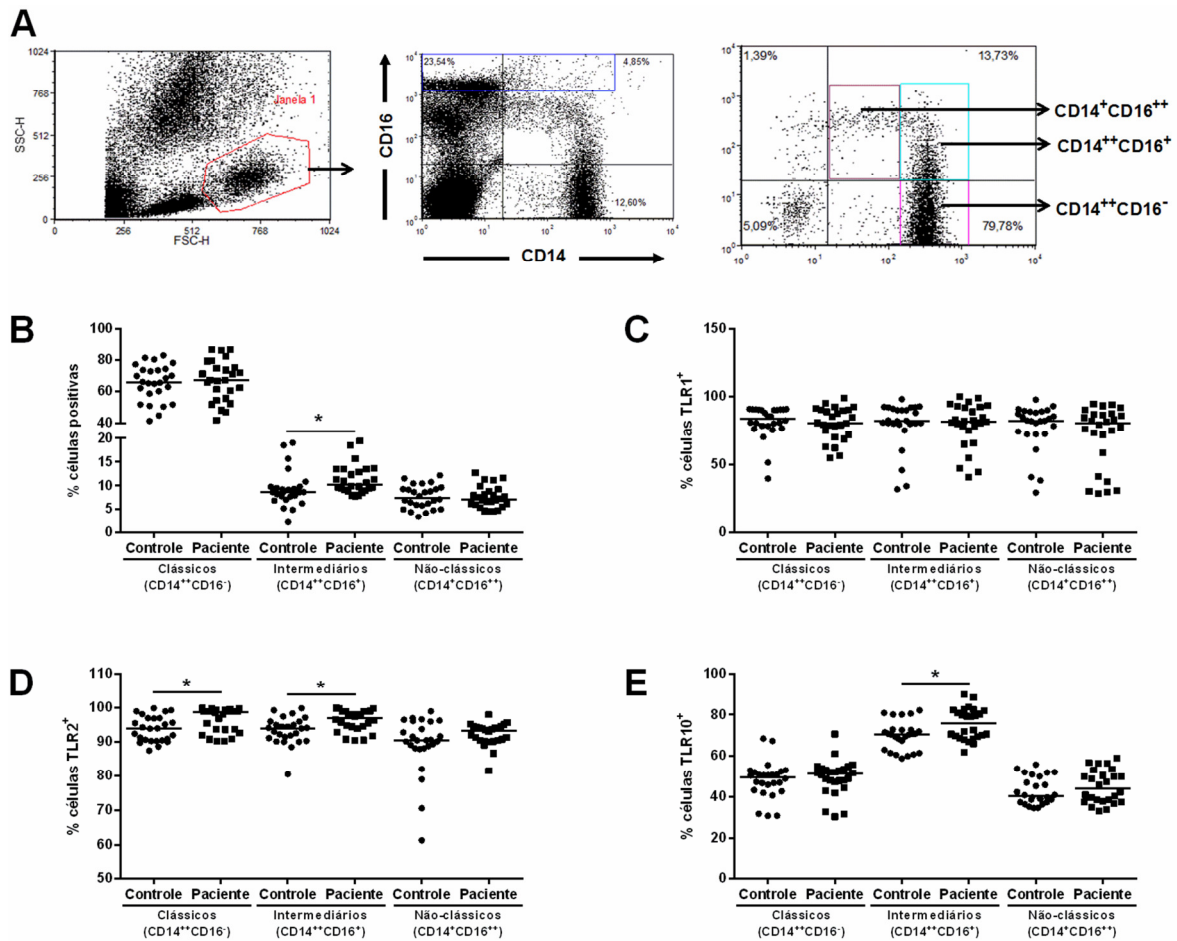


Figura 2. Pacientes com doença de Parkinson apresentam maior frequência de monócitos intermediários expressando TLR10. As subpopulações de monócitos do sangue periférico foram separadas de acordo com a expressão das moléculas CD14 e/ou CD16, para avaliação da expressão de TLRs em diferentes subpopulações. **(A)** Estratégia de análise das diferentes subpopulações de monócitos. **(B)** Frequência das subpopulações de monócitos em controles e pacientes com DP. **(C)** Frequência de células positivas para TLR1 em cada subpopulação de monócitos. **(D)** Frequência de células positivas para TLR2 em cada subpopulação de monócitos. **(E)** Frequência de células positivas para TLR10 em cada subpopulação de monócito. Pacientes DP (n = 26) e indivíduos controles saudáveis (n = 26) foram pareados por sexo e idade. Os dados representam valores individuais e as medianas. *p < 0,05 (pacientes vs controles, teste U de Mann Whitney).

3.4. *A expressão de TLR10 em monócitos é reduzida em indivíduos idosos, independente da doença de Parkinson.*

Para avaliar se a idade compromete a expressão de TLR10 correlacionamos a idade e a expressão de TLR10 por monócitos de controles sadios e pacientes com DP. As análises de correlação demonstraram, claramente, que a idade influencia, negativamente, a expressão de TLR10, tanto em indivíduos sadios (Figura 3A), quanto em pacientes com DP (Figura 3B).

Nossos dados indicam que a expressão de TLR10 em monócitos é reduzida com a idade, independente da doença de Parkinson.

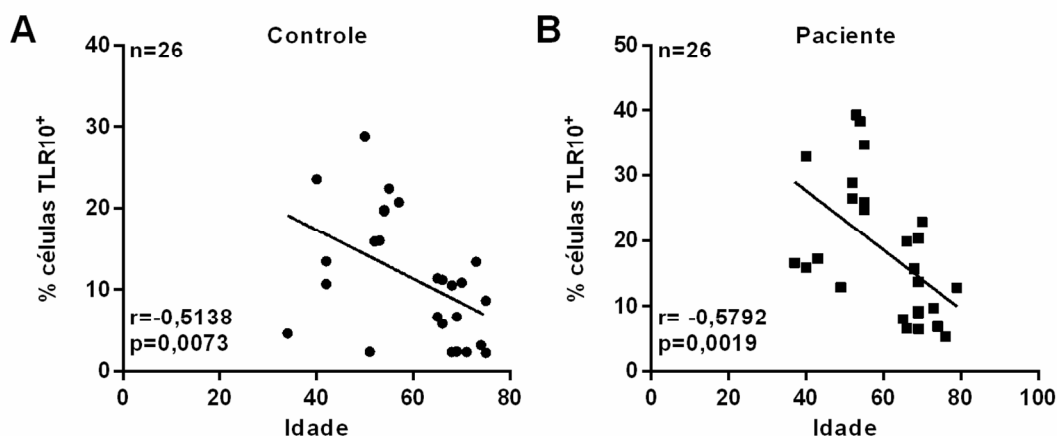


Figura 3. Expressão de TLR10 em monócitos diminui com a idade. (A) Correlação entre a idade e a frequência de monócitos expressando TLR10 em controles sadios. (B) Correlação entre a idade e a frequência de monócitos expressando TLR10 em pacientes com DP. Pacientes DP (n = 26) e indivíduos controles sadios (n = 26) foram pareados por sexo e idade. Os dados representam valores individuais e a curva de regressão linear. Os valores de r e p foram obtidos pelo teste de correlação de Spearman.

3.5. *A expressão de TLR10 correlaciona-se negativamente com a gravidade da doença de Parkinson.*

Para investigar se a expressão de TLR10 em monócitos influencia a patogenia da doença de Parkinson, correlacionamos a frequência de monócitos expressando TLR10 e a gravidade da doença, segundo a escala UPDRS. Nós observamos uma forte correlação negativa entre a frequência de monócitos expressando TLR10 e a gravidade da doença, avaliada pela escala UPDRS (Figura 4).

Esses dados sugerem que monócitos expressando TLR10 são importantes no controle da gravidade da doença de Parkinson.

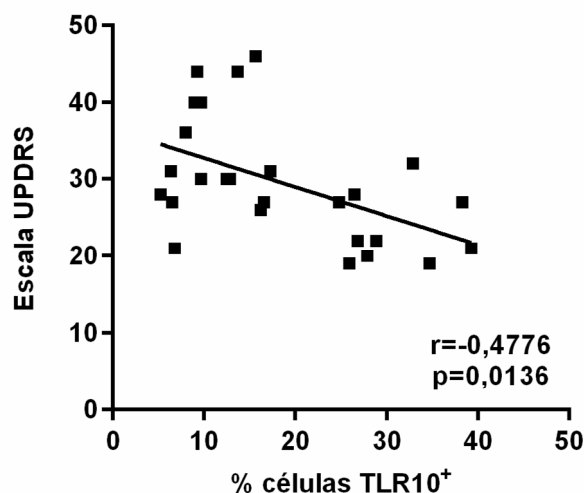


Figura 4. Correlação negativa entre a frequência de monócitos TLR10+ e a gravidade da doença de Parkinson. Correlação entre a frequência de monócitos expressando TLR10 e a gravidade da DP pela escala UPDRS. Os dados representam valores individuais e a curva de regressão linear. Os valores de r e p foram obtidos pelo teste de correlação de Spearman.

3.5. Expressão de TLR10 é importante para a redução da ativação de TLR2 em pacientes com doença de Parkinson.

Uma vez que demonstramos que leucócitos do sangue periférico (hemoculturas) de pacientes com DP respondem menos à ativação com agonista de TLR2/1 do que os indivíduos controles saudáveis (Silva et al., 2016) e que esses pacientes apresentam maior percentual de monócitos expressando TLR10 do que os controles saudáveis, nós investigamos se a expressão de TLR10 seria importante na redução da resposta imune frente a ativação de TLR2. Para isso, CMNs de controles e pacientes com DP foram estimuladas com agonista de TLR2/1 (Pam₃Cys) na ausência ou presença de anticorpo neutralizante anti-TLR10. Nós observamos que a neutralização do TLR10 com anti-TLR10 reverteu completamente a baixa produção de TNF- α após a ativação do TLR2 com Pam₃Cys observada em pacientes com DP comparados aos controles saudáveis. IgG normal de rato foi usado com controle de isotipo e não teve efeito sob a produção de TNF- α pelas células tanto de controles saudáveis, quanto de pacientes (Figura 5).

Nossos dados sugerem que a expressão de TLR10 em monócitos é importante para reduzir a produção de TNF- α por essas células após a ativação do TLR2/1.

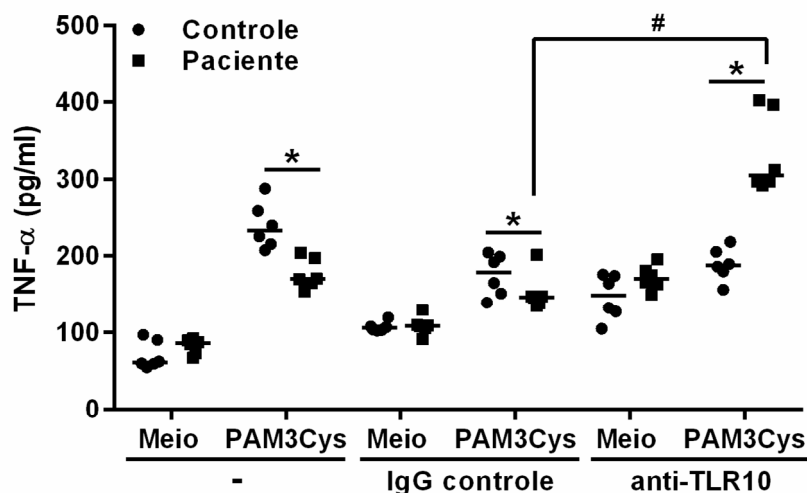


Figura 5. O bloqueio de TLR10 aumenta a secreção de TNF- α em cultura de CMN de pacientes portadores da doença de Parkinson, após a exposição a agonista de TLR2/1 (Pam₃Cys). As CMNs ($4,0 \times 10^5/200\mu\text{L}$) foram pré-incubadas durante uma hora com anticorpo monoclonal neutralizante de TLR10 (10 $\mu\text{g/mL}$) ou com anticorpo IgG controle, seguido de incubação durante 6 h com Pam₃Cys (1,0 $\mu\text{g/mL}$). A secreção de TNF- α foi determinada nos sobrenadantes da cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados representam os valores individuais e a mediana, * $p<0,05$ (teste U de Mann Whitney). # $p<0,05$ (teste de Wilcoxon).

4. Discussão

Nós demonstramos, neste trabalho, que o percentual de monócitos intermediários expressando TLR10 é maior em pacientes com DP em relação aos indivíduos controles saudáveis, enquanto os percentuais de monócitos expressando TLR1 e TLR2 foram semelhantes entre os grupos, ainda que a intensidade de fluorescência de TLR2 foi maior em monócitos de pacientes com DP. Interessantemente, foi demonstrado que apesar dos monócitos de pacientes com DP expressarem maiores quantidades de TLR2, corroborando achados anteriores (Drouin-Oullet et al., 2015; Silva et al., 2016), a responsividade do TLR2 ao seu agonista foi reduzida nos pacientes DP, comparado aos indivíduos controles (Silva et al., 2016).

Estudos têm evidenciado a ação inibitória da expressão de TLR10 sobre a responsividade do TLR2 (Hasan et al., 2005; Guan et al., 2010; Godfroy et al., 2012; Stapers et al., 2015). De fato, o bloqueio do TLR10 por anticorpos monoclonais

neutralizantes aumenta produção de citocinas pró-inflamatórias após a exposição a ligantes de TLR2 e indivíduos com polimorfismo disfuncional no gene para o TLR10 são mais responsivos ao ligante de TLR2 (Oosting et al., 2014; Hess et al., 2017). Por outro lado, camundongos transgênicos para o gene da TLR10 são menos responsivos ao desafio com agonista de TLR2 (Oosting et al., 2014), indicando claramente o papel supressor desse receptor sob o TLR2. Inicialmente, acreditava-se que a sinalização intracelular do TLR10 estava associada com a via MyD88 (Hasan et al., 2005), entretanto, observou-se uma falha na ativação típica de TLR por esta via, sendo, atualmente, verificado que a sinalização ocorre via NF- κ B (Guan et al., 2010) e/ou ativação de citocinas anti-inflamatórias mediada por PI3K/Akt (Oosting et al., 2014). Nossos dados corroboram com trabalhos anteriores ao demonstrarem que o bloqueio de TLR10, com anticorpo monoclonal neutralizante, modula a ativação celular induzida pela estimulação de TLR2/1 com Pam₃Cys em culturas de CMN (monócitos) de pacientes com DP.

Embora grande parte dos estudos descrevessem que o TLR10 possui um papel supressor da resposta pró-inflamatória, alguns estudos sugeriram que esse receptor atua como um receptor estimulador da resposta imune inata relacionada com o reconhecimento de *Lysteria monocytogenes* e *Influenza vírus* (Regan et al., 2013; Lee et al., 2014). A variação genética no gene de TLR10 pode modular o equilíbrio entre respostas imunes pró e anti-inflamatórias e, conseqüentemente, explicar a influência genética do ser humano à suscetibilidade a doenças (Stevens et al., 2008; Morgan et al., 2012).

Nossos resultados mostram, ainda, que a expressão de TLR10 está associada com menor gravidade da doença de Parkinson, avaliada pela escala UPDRS. Acreditamos que o complexo TLR2/10 possa estar envolvido no reconhecimento e resposta imune a DAMPs no SNC. A α -sinucleína é um DAMP produzido por células do SNC e está relacionada com a fisiopatologia da DP, sendo reconhecida via TLR2 por monócitos/micróglia (Codolo et al., 2013). Acreditamos que possa haver participação do TLR10 no reconhecimento de α -sinucleína, ou de outros DAMPs, no SNC e que o TLR10 possa modular a neuroinflamação gerada pela ativação de TLR2 durante a DP, reduzindo, assim, a neurodegeneração e a gravidade da doença.

O aumento da expressão de TLR10 em pacientes com DP parece estar restrito aos monócitos intermediários. Nós observamos que essa subpopulação de monócito foi a única aumentada em pacientes com DP em relação aos controles saudáveis. Monócitos

clássicos e não clássicos não foram alterados, corroborando com estudos anteriores (Funk et al., 2013; Silva et al., 2016). Por outro lado, os estudos de Grozdanov e colaboradores (2014) e de Speidal e colaboradores (2016) demonstraram um maior percentual da subpopulação de monócitos clássicos e menor percentual de monócitos não clássicos no sangue periférico de pacientes com DP. Embora haja diferenças genéticas e diferentes métodos para separação de monócitos das amostras sanguíneas, as razões para essas discrepâncias permanecem desconhecidas.

Os monócitos intermediários são considerados monócitos pró-inflamatórios, uma vez que eles produzem elevados níveis de TNF α e baixos níveis da citocina reguladora IL-10 em resposta a agonistas de TLR, especialmente, a agonistas de TLR2 e de TLR4 (Belge et al., 2002; Mizuno et al., 2005). Entretanto, uma vez que pacientes com DP são menos responsivos ao agonista de TLR2, hipotetizamos que a expressão de TLR10 por esses monócitos regule a resposta pró-inflamatória advinda da ativação de TLR2/1.

É interessante notar que a expressão de TLR10 foi negativamente correlacionada com a idade, independente do estado clínico do indivíduo. Sabe-se que envelhecimento é o fator de risco mais significativo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Phinney et al., 2006; Sawada et al., 2007; Bliederhaeuser et al., 2016). Por outro lado, a concentração de α -sinucleína plasmática não se correlaciona com o envelhecimento (Fjorback et al., 2007). Existe, portanto, a possibilidade de que a redução da expressão de TLR10 com a idade possa estar associada à severidade do processo de neuroinflamação/neurodegeneração e, conseqüentemente, à maior gravidade da DP em pacientes mais idosos.

Nossos dados demonstram que, durante a doença de Parkinson, há um aumento do percentual de monócitos intermediários expressando TLR10 e que a expressão de TLR10 é fundamental para hiporresponsividade ao agonista de TLR2/1 observado nas células desses pacientes. Estudos adicionais são necessários para decifrar o mecanismo exato pelo qual o TLR10 induz seu efeito inibitório e para elucidar o potencial de polimorfismos genéticos de TLR10 na avaliação de risco, prognóstico e tratamento de doenças neurodegenerativas.

Referências

1. Verbaan D, Marinus J, Visser M, Van Rooden, SM, Stiggilbout AM, et al. 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. Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM .Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacol* 2012;62:2154–2168.
4. Dzamko N, Geczy CL, Halliday GM. Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience* 2014;doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.028
5. Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation* 2005;2,14-19.
6. McGeer PL, McGeer EG. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2004;10 Suppl 1, S3-7.
7. Ouchi Y, Yoshikawa ES, Futatsubashi Y, Kanno M, Ogosu T, Torizuka T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol* 2005;57, 168–175.
8. Dzamko N, Gysbers A, Perera G, Bahar A, Shankar A, et al. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. *Acta Neuropathol* 2017;133(2):303-319.
9. Panaro MA, Lofrumento DD, Saponaro C, De Nuccio F, Cianciulli A, et al. 2008. Expression of TLR4 and CD14 in the central nervous system (CNS) in a MPTP mouse model of Parkinson's-like disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008;30,729–740.

10. Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero, MT, Parnadeau S, Corvol JC, et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108, 6632–6637.
11. Kim CH, DH Suk, JE 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.
12. Silva DJ, Borges, AF, Souza PO, Reis de Souza, P, Ribeiro de Barros C, et al. Decreased Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 7/8-Induced Cytokines in Parkinson's Disease Patients. *Neuroimmunomodulation* 2016;23(1), 58-66.
13. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 2010;11, 373-384.
14. Esiri MM. The interplay between inflammation and neurodegeneration in CNS disease. *J Neuroimmunol* 2007;184, 4–16.
15. Nolan YM, Sullivan AM, Toulouse A. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol. Med* 2013;9, 187–96.
16. Klegeris A, McGeer EG, McGeer PL. Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol* 2007;20:351–357.
17. 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.
18. 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.

19. Kannarkat GT, Boss JM, Tansey MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J Parkinson's Dis* 2013;3:493–514.
20. Grozdanov V, Bliederhaeuser C, Ruf WP, Roth V, Fundel-Clemens K, et al. 2014. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.* 2014;128 (5), 651-63.
21. 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, 2394–403.
22. Etemad S, Zamin RM, Ruitenberg MJ, Filgueira L. A novel in vitro human microglia model: Characterization of human monocyte-derived microglia. *J. Neurosci. Methods.* 2012; 209(1):79-89.
23. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, et al. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116 (16), e74-80.
24. Drouin-Ouellet J, St-Amour I, Saint-Pierre M, Lamontagne-Proulx J, Kriz J, et al., 2014. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol* 2014;18 (6), 1-11.
25. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, et al. Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One.* 2013;8 (1), e55375.
26. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E. et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* 2005;174, 2942–2950.

27. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007;130,1071–1082.
28. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn S-J, Ryu YH, et al. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* 2009;31, 873–884.
29. Guan Y, Ranao DR, Jiang S, et al. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 2010;184:5094-103.
30. Godfroy JI, 3rd, Roostan M, Moroz YS, Korendovych IV, Yin H. Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. *PLoS One* 2012; 7:e48875.
31. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, et al., 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 2002;168(9), 4531-7.
32. Verma R, Jung JH, Kim JY. 1,25-Dihydroxyvitamin D up-regulates TLR10 while down-regulating TLR2, 4, and 5 in human monocyte THP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 141C:1-6.
33. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 2003;171:3977-82.
34. Mansson A, Adner M, Hockerfelt U, Cardell LO. A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* 2006; 118:539-48.

35. Laayouni H, Oosting M, Luisi P, et al. Convergent evolution in European and Roma populations reveals pressure exerted by plague on Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:2668-73.
36. 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* 2013; 14:52-7.
37. Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, et al. Human TLR10 is an antiinflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:E4478-84.
38. Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, et al. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord* 2003;18(5):467-86.
39. Hoehn MM, Yahr MD, 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 17 (5), 427-42, 1967.
40. Horta W. Escalas Clínicas para Avaliação de Pacientes com Doença de Parkinson. In MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. DPI. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.
41. Heimbeck I, Hofer TPJ, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A. Standardized single platform assay for human monocyte subpopulations: lower CD14+CD16++ monocytes in females. *Cytometry* 2010;77A, 823–830.
42. Cros J, Cagnard, N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010;33, 375–386.
43. Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, et al. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One*, 2012;7(10), e47387.

44. Bessler H, Djaldetti R, Salman H, Bergman M, Djaldetti M. IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother* 1999;53, 141–145.
45. 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.
46. Reale M, Iarlori C, Thomas A, et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav. Immun* 2009;23,55–63.
47. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1209-20.
48. van Furth R, van Zwet TL, Buisman AM, et al. Anti-tumor necrosis factor antibodies inhibit the influx of granulocytes and monocytes into an inflammatory exudate and enhance the growth of *Listeria monocytogenes* in various organs. *J Infect Dis*, 1994;170(1), 234-7.
49. 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* 2013,697972.
50. Silva DJ, Alcântara-Silva TR, Rocha Sobrinho HM, Oliveira MAP, Ribeiro-Dias F. Neuroinflamação na Doença de Parkinson. *LAMSJ*. 2013;2(4),178-86.
51. Fokkema SJ, Loos BG, de Slegte C, et al. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2003;30(12), 1091-6.
52. Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TMR, Frokiaer 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.
53. Stappers MH, Oosting M, Ioana M, Reimnitz P, Mouton JW, et al. Genetic Variation in TLR10, an Inhibitory Toll-Like Receptor, Influences Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J Infect Dis* 2015;212(9), 1491-9.
54. Hess NJ, Felicelli C, Grage J, Tapping RI. TLR10 suppresses the activation and differentiation of monocytes with effects on DC-mediated adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* 2017;101(5):1245-1252.
55. Regan T, Nally K, Carmody R, et al. Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 2013;191:6084-92.
56. Lee SM, Kok KH, Jaume M, et al. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:3793-8.
57. Stevens VL, Hsing AW, Talbot JT, et al. Genetic variation in the toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) and prostate cancer risk. *Int J Cancer* 2008; 123:2644-50.
58. Morgan AR, Lam WJ, Han DY, Fraser AG, Ferguson LR. Genetic variation within TLR10 is associated with Crohn's disease in a New Zealand population. *Hum Immunol* 2012;73:416-20.
59. 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.

60. Speidel A, Felk S, Reinhardt P, Sternecker J, Gillardon F. Leucine-rich repeat kinase 2 influences fate decision of human monocytes differentiated from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2016;11:e0165949.
61. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedler M, Frankenberger M, et al. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol* 2002;168, 3536–42.
62. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, et al. Selective expression of CD16^{high}CCR2[–] subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 2005;142, 461–70.
63. Phinney AL, Andringa G, Bol JG, Wolters E, van Muiswinkel FL, et al. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging. *Parkinsonism Relat. Disord* 2006;12, 228–238.
64. Sawada H, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, et al. Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurosci. Res.* 2007;85,1752–1761.
65. Bliederhaeuser C, Grozdanov V, Speidel A, Zondler L, Ruf WP, et al. Age-dependent defects of alpha-synuclein oligomer uptake in microglia and monocytes. *Acta Neuropathol* 2016;131(3), 379-91.
66. Fjorback AW, Varming K, Jensen PH. Determination of alpha-synuclein concentration in human plasma using ELISA. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 2007;67, 431–435.

Manuscrito 3

Toll-like receptors and their genetic polymorphisms in neurodegenerative diseases

Receptores similares a *Toll* e seus polimorfismos genéticos em doenças neurodegenerativas

Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho¹, Delson José da Silva², Fátima Ribeiro-Dias³

1. Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), Goiânia, Goiás, Brasil.

2. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG). Instituto Integrado de Neurociências. Goiânia, Goiás, Brasil.

3. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

Correspondence: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235 S/N – Setor Universitário, 74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil. Phone: +55 62 3209 6116, Fax: +55 62 3209 6363. E-mail address: fatimardias@gmail.com.

Conflict of interest: There is no conflict of interest to declare.

Support:

*Manuscrito submetido à Revista *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*

Abstract

Toll-like receptors (TLR) are a large group of proteins that recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs). Cellular expression of these receptors in blood peripheral cells and tissues is critical to the proper functioning of the immune system. Activation of TLR leads to inflammation, which is essential for innate defense mechanisms. However, unbalanced inflammatory process can contribute to tissue lesions resulting in chronic inflammatory diseases. The TLR plays important roles in neuroinflammation and has been associated with neurodegenerative diseases. Genetic polymorphism of TLRs has been seen in a number of diseases linked to susceptibility or resistance. Some polymorphisms can affect the biological functions of TLR and exacerbate or reduce the inflammatory process. This review summarizes the main TLR properties and genetic polymorphisms that have been evaluated in neurodegenerative diseases while highlighting their roles in susceptibility or resistance to development of these diseases.

Key words: Toll-like receptors, genetic polymorphism; neuroinflammation; neurodegenerative diseases

Resumo

Os receptores similares a *Toll* (TLRs) compreendem um grupo de proteínas que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos teciduais (DAMPs). A expressão destes receptores em células imunológicas é fundamental para a atividade do sistema imune. A ativação de TLRs leva à inflamação, que é essencial para mecanismos de defesa inatos. Entretanto, a inflamação desregulada pode contribuir para lesões teciduais, resultando em doenças inflamatórias crônicas. Os TLRs desempenham papéis importantes na neuroinflamação, a qual tem sido associada a doenças neurodegenerativas. Polimorfismos genéticos dos TLRs têm sido relatados em várias doenças, sendo relacionados à suscetibilidade ou resistência. Alguns polimorfismos podem afetar as funções biológicas dos TLRs, o que pode contribuir para a exacerbação ou redução da inflamação. Esta revisão sintetiza as principais propriedades dos TLRs e seus polimorfismos genéticos que foram avaliados em doenças neurodegenerativas, destacando seus papéis na suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento dessas doenças.

Palavras-chave: Receptores similares a *Toll* (TLR); polimorfismo genético; neuroinflamação; doenças neurodegenerativas

Introduction

As life expectancy has increased, many individuals reach old age where neurodegenerative diseases are more frequent. Some of these diseases cause dementia including Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). These are major public health problems^{1,2}. These neurodegenerative diseases are progressive, heterogeneous, and present several pathophysiological changes of unknown etiology. The destruction of neurons is observed in the central nervous system (CNS) of the patients, and this may result in motor or non motor symptoms including sensory, cognitive, psychiatric, and other alterations, which can lead to functional impairment^{3,4}.

Data has shown that CNS surveillance by innate immune cells such as resident microglia and newly recruited bone-marrow derived cells occurs in both physiological and pathological conditions⁵. Consequently, even in the presence of an intact blood-brain barrier (BBB), inflammation can take place in the CNS following tissue damage or infections. The association between genetic and environmental factors (infectious agents and neurotoxins) may be involved in the etiology of neurodegenerative diseases either as a causative agent or as risk factors³. While there have been considerable advances in the knowledge of the pathophysiology of these diseases over the last decade, the etiopathogenic mechanisms underlying the neurodegeneration process remains unclear. Molecular biology studies have identified mutations and genetic polymorphisms in patients with different neurodegenerative diseases. This strengthens the hypothesis that the causes of neuropathological changes are polygenic and multifactorial^{3,6,7}.

Neurodegeneration is associated with neuroinflammation followed by neuronal death. The exposure of individuals (or experimental models of neurodegenerative diseases) to infectious organisms and environmental toxins may induce the development of inflammatory processes and production of neurotoxic factors^{8,9}. The toll-like receptor (TLR) family of innate immune receptors has an important role in driving the activation and inhibition of pathogenic pathways involved in neurodegenerative diseases¹⁰. Activation of microglia, a resident macrophage in CNS, with TLR agonists such as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) as well as damage-associated molecular patterns (DAMPs) induces inflammatory responses involved in neuronal death^{8,10,11,12}.

The TLR can also be neuroprotective¹⁰. The TLRs may present genetic polymorphisms that are characterized by variations or mutations in the sequence of nucleotides in the DNA that can lead to changes in the function or expression of the protein receptor and, consequently, in the induction of genes related to inflammation¹³. This may result in an unbalanced inflammatory response that can cause tissue damage and contribute to the etiopathogenesis of neurodegenerative diseases. The imbalance between pro-and anti-inflammatory signals may favor a chronic inflammatory process with prolonged activation of peripheral blood leukocytes or cells in CNS. This produces pro-inflammatory cytokines and also releases reactive oxygen intermediates (ROI), nitric oxide (NO) and prostaglandins all of these are toxic to neurons^{8,12}. Therefore, understanding the association between the TLR polymorphisms and neurodegenerative diseases can help explain the pathogenesis of these diseases. We have studied TLR in PD¹⁴, and we revised the role of TLRs in neuroinflammation in PD¹⁵. In this review we describe the TLRs and their participation in the neuroinflammation during neurodegenerative diseases. Furthermore, this review presents data about TLR genetic polymorphisms associated with neurodegenerative diseases.

Toll-like receptors and neurodegenerative diseases

TLRs are type I transmembrane glycoproteins coded by germ line genes and expressed on the cytoplasmic membrane or intracellular vesicle membranes of immune and non-immune cells. These receptors recognize a wide variety of antigens produced by microorganisms (PAMPs) as well as endogenous molecules from tissue damage (DAMPs). There are 13 TLRs in mammals, but only 10 are functional in human beings TLR1 to TLR10. The TLRs have characteristic motifs rich in cysteine in the extracellular domain, and these interact with the ligand. A transmembrane domain and an intracellular toll-interleukin 1 (IL-1) receptor (TIR) domain is essential for signal transduction. These receptors activate immune cells with subsequent production and release of molecules participating in the inflammatory response (Figure 1). According to their cellular location, the TLRs can be divided into two groups. The first is composed of TLR2, TLR4, TLR1, TLR5, TLR6 and TLR10, which are expressed on the cell surface and recognize microbial molecular compounds as lipids, lipoproteins, proteins, or DAMPs^{16,17} (Figure 1).

The TLR can form homodimers or heterodimers to recognize a wide range of exogenous or endogenous molecules. Although most TLR are homodimers, TLR2 forms heterodimers with TLR1, TLR6, or TLR10 as well as with CD36 receptor (a scavenger receptor). These complexes recognize oxidized phospholipids, lipoproteins, long chain lipids, collagen, trombospondin, etc.^{16,17}. The TLR10 forms homodimers with high affinity, but it can also be associated with TLR1 or TLR2¹⁸.

Govindaraj et al. (2010)¹⁹ used homology modeling and molecular dynamic stimulations to construct a three-dimensional structure of TLR10 and predicted the interactions between TLR10/TLR10, TLR10/TLR1, TLR10/TLR2 and possible lipopeptide ligands. TLR3 and TLR4 act as homodimers, and the latter still requires two accessory molecules: MD-2 (Lymphocytic antigen 96, Ly96) and CD14 (human leukocyte differentiation Antigen 14)^{16,19}. Table 1 summarizes the different TLRs and their ligands (PAMPs) in the major cell types expressing these receptors.

The endogenous ligands of TLR are usually produced during tissue lesions. These include fragments of hyaluronic acid, fibrinogen, fibronectin, high-mobility group B1 (HMGB1), heat shock proteins (HSP), eosinophil-derived neurotoxins, A and D surfactants, and heparin sulfate proteoglycans (Table 2)^{20,21}. These DAMPs activate innate immune cells leading to inflammatory responses that are the basis of the immunopathogenesis of autoinflammatory, autoimmune, or chronic inflammatory diseases²⁰. Several DAMPs are produced in the CNS, and they mediate inflammation in aging-related diseases such as PD, AD, and multiple sclerosis (MS). They act on TLRs expressed in CNS cells²².

The recognition of PAMPs or DAMPs by TLR activates intracellular signaling pathways with recruitment of adapter proteins to the TIR domain as well as the nuclear transcription factors that induce the expression of inflammatory genes. There are two pathways of TLR signaling one is dependent on myeloid differentiation 88 (MyD88), and the other is dependent on TIR domain-containing adaptor-inducing interferon (TRIF) (Figure 1). The MyD88-dependent pathway is responsible for inflammatory reactions because it leads to the activation of transcription nuclear factor Kappa B (NFkB) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs). This produces inflammatory molecules such as cytokines, chemokines and lipid mediators¹⁶. The TRIF-dependent pathway is involved in the activation of both NFkB and interferon regulatory factors (IRF3) resulting in the production of type 1 interferons (IFN), which have pivotal role in anti-viral responses^{23,24}. Thus, the recognition of microbial ligands by TLR contributes

to inflammation and maximizes the immune response against harmful agents. Figure 1 illustrates the cellular expression of TLR and recognition of PAMPs and DAMPs by these receptors. This induces inflammatory responses during tissue injury.

TLR are expressed in immune cells such as monocytes/macrophages, dendritic cells, and polymorphonuclear leukocytes. They are also expressed in other cells including CNS cells like astrocytes, neurons, oligodendrocytes, and microglia resident innate cell in the CNS^{10,23,25}. TLR2 and TLR3 are constitutively expressed in all three types of human glial cells, and microglia express other TLRs (TLR1-9)^{25,26,27}. Expression of TLR3 has been described in human neurons and neural progenitor cells where it is important to control neurogenesis and anti-viral responses^{27,28}. Besides microglia, astrocytes, oligodendrocytes and neurons express TLR4^{12,26,27}. Other TLRs, including TLR5, TLR6, TLR8 and TLR9 are also expressed in CNS cells^{25,26,27}. TLRs are important to the development and homeostasis of CNS as well as to recognize PAMPs and DAMPs leading to anti-microbial responses in the brain and neuroinflammation^{10,20,23,28}.

Signaling pathways after TLR activation in CNS cells are similar to those of innate immune cells but with minor differences. In dendritic cells and microglia, the TLR4 pathways similarly recruit MyD88 and TRIF adaptor molecules to induce pro-inflammatory cytokines, chemokines, and type I IFNs^{23,24}. However, in astrocytes, TLR4 used only MyD88 to transduce signal activation and both TLR2 and TLR4 activate NFkB²³. Although NFkB is activated in neurons, the connection between this pathway and TLR4 was not determined. Cultured neurons with agonists of TLR2 or TLR4 do not show NFkB activation. In addition, TLR8 activation in rat neurons is independent of NFkB activation²³. Thus, glial cells and neurons can be activated via TLR triggering to produce pro-inflammatory mediators such as cytokines, chemokines and prostaglandins. This establishes and controls inflammatory responses in CNS^{23,25}.

Altered expression of TLR in CNS has been reported in neurodegenerative diseases. In patients with MS, TLR3 and TLR4 are increased in active lesions in the brain and spinal cord²⁶. In addition, TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR8, and TLR9 are increased in different parts of CNS of patients with multiple system atrophy²⁹. In AD patients, TLR2 and CD14 molecule expression is increased in the brain³⁰. Moreover, TLR4 is expressed in the brains of AD patients in association with amyloid β -peptides (A β) plaque deposition¹¹; TLR2 is differentially expressed in the microglia present in

substantia nigra and hippocampus of patients with incidental Lewy body disease and PD³¹.

Several studies have shown the functional role of TLR expressed in CNS during neurodegenerative diseases. The recognition of endogenous proteins in CNS by TLR can lead to chronic inflammatory disease and can trigger neurodegeneration. DAMPs released in CNS can initiate and perpetuate the neuroinflammation and neurodegeneration²². Of these endogenous proteins, α -synuclein - a small (14 KDa) presynaptic protein of undefined function - can be misfolded/aggregated, released from neurons under pathological conditions, contributing to Lewy body formation. Lewy bodies are cytoplasmic protein-insoluble inclusions that cause neuronal death and induce inflammatory response in microglial cells^{7,15}. These inclusions are characteristics of neurodegenerative diseases such as PD, diffuse Lewy body disease, and multiple system atrophy. These are synucleinopathies²⁹.

Misfolded and aggregated α -synuclein released from neurons acts as a DAMP recognized by TLR2 in microglia^{32,33}. The activation of microglia by α -synuclein alters the expression of TLR³⁴ and induces release of inflammatory mediators such as TNF α , IL-1 β , ROS, and nitric oxide (NO). This causes neuroinflammation^{32,33,35}. Thus, the cross-talk between neurons and microglial cells is mediated by neuron-released α -synuclein to perpetuate neuroinflammation and contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

TLR2 might play a role in neuroinflammation in PD by activation of microglia in CNS. This activation might be responsible for neurotoxicity and progression of the disease^{31,32,33}. In PD, the loss of dopaminergic neurons is responsible by clinical symptoms^{4,7,15}. In addition to these data about TLR2 in neuroinflammation, our group has shown that blood leukocytes from PD patients present lower response to TLR2 and TLR7/8 agonists than cells from healthy controls¹⁴. These results suggested that continuous peripheral release of α -synuclein or another DAMP from CNS can lead to TLR2 or TLR7/8 tolerance. This avoids excessive peripheral leukocyte activation. Moreover, evaluation of TLR activation in peripheral cells can be a biomarker of neuroinflammation.

Besides the involvement in PD, TLR2 has been suggested to be an important receptor in the pathology of AD, dementia with Lewy bodies, and amyotrophic lateral sclerosis³⁰ suggesting that the activation of TLR2 is part of a non-specific effector mechanisms involved in neuroinflammation in different neurodegenerative diseases. In

fact, TLR2 activation in microglia produces pro-inflammatory cytokines and chemokines that drive the traffic of blood leukocytes (especially T lymphocytes) into the brain. In addition, activation of TLR2 causes microglial proliferation³⁶.

Insoluble or fibrillar amyloid β -peptides ($A\beta$) are DAMPs that are components of extracellular senile plaques seen in AD. These senile plaques are foci of inflammation in the brain of AD patients. In these foci, microglia can be activated by $A\beta$ causing inflammation and neurotoxicity. $A\beta$ is recognized by formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) a chemotactic receptor expressed in human microglia and in monocytes/macrophages that mediates chemotaxis and reactive oxygen species production³⁷. The $A\beta$ /FPRL1 complex is internalized and can lead to destruction of $A\beta$; if there is persistent presence of $A\beta$ then it can culminate in the formation of fibrils³⁸. When TLR2 is activated in mouse microglia, the expression of the human homologous chemotactic receptor (formyl peptide receptor-2, FPR2) is increased as well as microglial chemotactic response and the uptake of $A\beta$ ³⁹. Similar effects were seen when microglia was activated by a TLR4 agonist⁴⁰. Moreover, the TLR4 is increased in neurons exposed to $A\beta$ that increase the $A\beta$ -induced apoptosis of these cells⁴¹. The lower expression of TLR4 in brain specimens (inferior parietal cortex) of AD patients compared to healthy controls suggests that TLR4-expressing neurons are deleted by apoptosis after exposure to $A\beta$ ⁴¹. In addition, TLR4 mediates the activation of mouse microglia by $A\beta$ leading to $TNF\alpha$, IL-6 and NO release, which cause neurotoxicity.

The deposits of $A\beta$ are associated with increased expression of TLR4 in AD mouse models and in the brains of AD patients¹¹. Reed-Geaghan et al. (2009)⁴² showed that response of microglia to $A\beta$ is dependent on CD14, TLR2, and TLR4 to induce production of ROS and increase phagocytosis. In addition, $A\beta$ activates macrophages to produce $TNF\alpha$ by triggering TLR2 or TLR4⁴³. Thus, the TLR2 and TLR4 can promote inflammation and neurodegeneration in AD. However, TLR2 has a beneficial role in AD murine models because this receptor increases the uptake and clearance of $A\beta$. This decreases cognitive decline⁴⁴. Moreover, activation of TLR2, TLR4, or TLR9 contributes to $A\beta$ clearance by microglia to reduce brain plaque formation⁴⁵. The activation of TLR9 is also protective in a murine model of AD. It reduces the $A\beta$ accumulation in cortical and vascular compartments of the CNS and is associated with cognitive improvement⁴⁶.

In MS, increased TLR expression has been described in patients with active/chronic lesions, and a mechanism for a TLR2 role in failure of remyelination has

been proposed^{26,47}. TLR2 are highly expressed on oligodendrocytes and their precursors. During disease, hyaluronan oligomers are generated, which trigger TLR2/MyD88 on oligodendrocyte precursor cells to inhibit its maturation and remyelination⁴⁷. The failure of remyelination is responsible for sustained neurological symptoms in MS, which is an autoimmune disease that causes destruction of CNS myelin⁴⁸. Animal models of MS including experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by CD4+ T lymphocytes have been developed to study the pathological mechanisms of MS^{48,49}. TLR1-9 expression is increased in spinal cord tissue of mice with EAE⁴⁸. Moreover, TLR9 and MyD88 are needed for EAE development. This suggests that endogenous ligands of TLR9 activate CNS-resident innate cells and contribute to the disease pathogenesis⁴⁸.

Activation of TLR3 by synthetic RNA (a viral-like model of neuroinflammation) in the rat brain increases the susceptibility of dopaminergic neurons to neurotoxic triggers suggesting that TLR3 can be involved in neurodegeneration during PD⁵⁰. Besides microglia, TLR3 expressing human neurons produce cytokines and chemokines leading to neuroinflammation and an anti-viral response⁵¹. Thus, TLR3 activation can lead to detrimental effects in PD. The microtubule regulator stathmin is present in CNS and acts as an endogenous ligand for TLR3 in astrocytes and microglia to induce cytokines and chemokine release. In chronic active MS lesions, the TLR3 is found inside microglia and on the astrocyte surface co-localized with stathmin. These results suggest that stathmin can act as a DAMP during neuroinflammation, but stathmin-activated TLR3 in astrocytes also induces factors important to neuroprotection and repair in CNS⁵¹. Furthermore, in a MS murine model, TLR3 is protective because it induces IFN β that suppress demyelination⁵².

TLR activation leads to differential and unique effects in different neurodegenerative diseases. Thus, it is necessary to investigate the mechanisms of TLR activation in each disease individually to understand the disease pathology. Table 2 presents the main DAMPs whose TLRs have been identified including those involved in neurodegenerative diseases. Several endogenous molecules are DAMPs in the CNS and mediate innate immune responses by engaging pattern recognition receptors (PRRs) on local CNS cells. These include high mobility HMGB1, HSPs, uric acid, chromatin, adenosine and ATP, galectins, thioredoxin, surfactant proteins A and D, hyaluronan, fibrinogen and aggregated, modified or misfolded proteins such as β -amyloid, alpha

synuclein (α -synuclein), and microtubule associated protein-tau, mutant huntingtin, and mutant superoxide dismutase (SOD1) (see Table 2)²².

The genetic polymorphism of toll-like receptors and their association with neurodegenerative diseases

Activation of TLRs triggers a signaling cascade that results in expression of several inflammatory genes. Variation in this immune response is under genetic control^{13,53}. Genetic changes in the nucleotides of DNA are substitution, addition, and deletion. Many single nucleotide polymorphisms (SNPs) do not have effects on cellular function, but some especially those that affect the functional gene region may predispose individuals to diseases⁵³. When the polymorphisms are located in coding regions of the genome, the nucleotide change can lead to a variation in one amino acid. In some cases, changes in a single amino acid can modify the protein making it more or less active or even completely abolishing its biological function. This non-synonymous SNPs can alter the protein sequence and are particularly important. They are target of several disease studies⁵³. SNPs are the most common form of genetic variants in the human genome⁵⁴. Some of them can influence the susceptibility to microbial pathogens and toxic substances as well as the response to self-proteins. Studies of candidate and sequenced genes with known biological action suggest that it is possible to select genetic polymorphisms involved in the immune response of the host associating the allele and/or genotypic differences found in the population with the susceptibility to a disease or to specific features of disease¹³. The SNPs in receptors for PAMPs/DAMPs as the TLRs can alter the immune responses and increase or decrease the risk of developing human diseases^{13,55,56}.

Relative few studies have been conducted to evaluate the genetic polymorphism of TLR in neurodegenerative diseases. TLRs are involved in MS pathogenesis^{26,47}. In 2003, Reindlet al.⁵⁷ evaluated a SNP in TLR4 in patients with MS. The TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile mutations (co-segregating variants) were found in similar frequencies in Austrian MS patients and matched controls. The presence of these SNPs did not affect the production of soluble adhesion molecules, and it seems that it does not influence the incidence or progression of the disease. The TLR4 Asp299Gly SNP was first demonstrated to be associated with hyporesponsiveness to lipopolysaccharide (LPS), and this SNP alters the extracellular domain of the receptor⁵⁸. Further studies

have shown that this SNP cannot be relevant for cytokine production after TLR4 stimulation, but can decrease lymphoproliferation in PBMC cultures^{59,60}. In LPS-treated whole blood cultures from patients with *TLR4*Asp299Gly SNP reduced the production of lipid mediators of inflammation⁶¹.

In a large cohort of German MS patients (n = 890), *TLR4* Asp299Gly (+896A/G) SNP was investigated but no association between different genotypes and susceptibility, clinical presentation, or severity of MS was detected⁶⁰. In addition, analysis of 12 SNPs of the *TLR4* gene in Spanish MS patients suggests that TLR4 is not relevant for predisposition or susceptibility to MS⁶². Considering that TLR9 is needed for EAE development in mice⁴⁸, one study was performed to analyze the role of T-1237C SNP TLR9 in Portuguese MS patients. The results showed that the allele or genotype distribution of this SNP in patients and matched controls were similar⁶³.

Some early studies showed no relevant frequencies of TLR4 and TLR9 SNPs in MS. Then, Enevold et al. (2009)⁶ selected 30 SNPs in genes encoding TLR1-10 including three polymorphisms in TLR1, three in TLR2, one in TLR3, two in TLR4, five in TLR5, two in TLR6, four in TLR7, three in TLR8, two in TLR9, and five in TLR10. These were evaluated in a group of 963 patients with MS and 960 healthy controls in Denmark. These authors observed significant associations between the frequencies of the TLR4 rs7873784 (3' UTR, on chromosome 9) and TLR9 rs187084 (promoter region, chromosome 3) polymorphisms with the clinical course of MS. The frequency of homozygote carriers of the TLR4 SNP was higher (2x) in patients with secondary progressive MS and in patients with primary progressive MS (6x) than in relapsing-remitting MS patients. The TLR9 SNP was more frequent in primary progressive MS patients than in the other clinical forms of MS. Despite this, the authors concluded that these findings are uncertain due to the results of the previous studies about TLR4 and TLR9 SNPs. However, they have shown that a *TLR6* Ser249Pro SNP is associated with production of antibodies to IFN β after 24 months of treatment in male MS patients⁶. Thus, to date, only a few studies have evaluated the role of TLR polymorphisms in MS. The results suggest that TLR SNPs cannot modify the disease. Nevertheless, additional studies are needed before excluding the involvement of TLR mutations in MS pathology.

In AD, the *TLR4* Asp299Gly (+896 A/G) SNP was also investigated in a group of Italian patients. The 299Gly allele is associated with resistance of Late-onset Alzheimer Disease (LOAD) development⁵⁵ whereas the allele Asp299 is associated with

disease susceptibility⁶⁴. These results suggest the link between inflammatory profile (allele Asp299) and increased risk to AD strengthening a role of TLR4 in physiopathology of AD.

The G11367C is a SNP present in the 3'untranslated region (3'UTR) of the *TLR4* gene that attenuates the TLR4 function and decreases the response to LPS⁶⁵. The TLR4/11367 polymorphism is a common *TLR4* gene variant detected in Chinese Han populations. This polymorphism has been evaluated in patients with LOAD, and it had a significant difference between the genotype and allele frequencies when comparing AD patients with healthy control groups. The results indicate that allele C increases the risk of LOAD development in a Han Chinese population. Because this SNP can affect the expression of TLR4, it might be possible that the clearance of A β in the brain is deficient in carriers of this genetic variant and increases the risk for AD development⁵⁶. These data corroborate those from another study in a Chinese population⁵⁶. After evaluating five *TLR4* SNPs, the authors demonstrated an association between *TLR4* rs1927907 polymorphism with an increased risk to develop LOAD. This intronic SNP regulates alternative splicing and protein production suggesting that TLR4-altered function can contribute to LOAD⁶⁶. Nevertheless, evaluation of seven other *TLR4* SNPs (listed in Table 3) in a Han Chinese population showed that these polymorphisms are associated with less risk of developing LOAD. Thus, these results indicate that TLR4 can contribute to LOAD susceptibility in this population⁶⁶. In fact, the role of TLR4 in AD can be a double-edge sword in AD physiopathology - it is needed for clearance of A β to avoid plaque formation in the brain, but it can also increase inflammation and contribute to neurotoxicity as described above. Thus, depending on the *TLR4* SNP, different functions of TLR4 can be affected differentially influencing AD development or progression.

TLR2 is also involved in an inflammatory response mediated by microglia as well as clearance of A β in the brain^{43,44,45}. Seven *TLR2* SNPs (listed in Table 3) were investigated in AD patients. No significant differences between the frequencies of *TLR2* alleles or genotypes of patients and controls were found. The data suggested no association between risk to LOAD development and *TLR2* SNPs⁶⁷. However, -196 to -174 *del* polymorphism of the untranslated 5'-region in *TLR2* gene has been associated with an increased risk to LOAD development. This polymorphism decreases the transcriptional activity leading to a deficiency in TLR2 expression. This contributes to the increased risk to AD⁶⁷. Corroborating the hypothesis that TLR2 polymorphism can

increase the susceptibility to AD, the presence of GT microsatellite polymorphism in intron II of *TLR2* gene was associated with risk for LOAD⁵⁶. Besides *TLR4* and *TLR2*, *TLR9* is also important in the pathophysiology of AD. Wang et al. (2011)⁵³ demonstrated that the functional *TLR9* rs187084 SNP (variant homozygote GG) decreases LOAD risk. This effect could be associated with a higher expression of *TLR9* in the monocytes of the patients carrying the GG genotype of *TLR9* rs187084 SNP than in those with other genotypes. All of these studies were performed in Han Chinese populations.

To date only two studies have assessed TLR polymorphisms in patients with PD- one in a Greek cohort⁶⁸ and the other in Han Chinese patients⁶⁹. Two polymorphisms were evaluated in Greek sporadic PD patients: *TLR2*-194 to-174 *del* (on chromosome 4q) and *TLR9* rs18708 (-1237 T/C) (on chromosome 3). Both polymorphisms alter the gene promoter activity suggesting that they may modulate *TLR2* and *TLR9* functions. The *TLR9* (-1237 T/C) and *TLR2* (-196 to-174 *del*) polymorphisms are not associated with increased risk of development of PD⁶⁸. The *TLR9* rs352140 and rs187084 SNPs were evaluated in a Han Chinese cohort, and the frequency of the *TLR9* rs352140 T allele was lower in female PD patients than in controls revealing an association between *TLR9* rs352140 with a reduced risk for PD development in females⁶⁹. The results indicate that while *TLR9* rs352140 SNP can protect against PD in females, *TLR9* rs187084 has no effect in susceptibility for PD development⁶⁹. Table 3 summarizes the studies of TLR SNPs in neurodegenerative diseases.

Conclusions

The role of TLR in neuroinflammation and the pathogenesis of neurodegenerative diseases is currently a significant target of scientific research. Neurodegenerative diseases are not caused by alterations in a single gene, but result from the accumulation of such alterations. Each has small effects that result in disease with different levels of severity. The presence of minor variations in innate immunity genes can result in major effects on the risk for disease development. There is limited data on the impact of TLR polymorphisms on neurodegenerative disease. Most studies fail to link *TLR4* and *TLR9* polymorphisms with susceptibility to MS. Some studies showed no alteration or an increase or decrease in the risk for AD after evaluating

polymorphisms in *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* genes. No association between *TLR2/TLR9* polymorphisms and PD was seen in one study, but another showed that *TLR9* SNP was associated with resistance to PD in females. The studies only evaluated the frequency of alleles and genotypes in the populations associated with clinical aspects of the diseases. The mechanism that explains these effects in TLR genes and its inflammatory response or neurodegeneration deserves further study. In addition, only a few ethnicities have been investigated. Studies indicate differential results regarding the frequency of polymorphisms, vulnerability, and outcome of the diseases in different ethnic groups. Thus, TLR polymorphisms need to be investigated in different ethnicities to clarify the role of these polymorphisms in neurodegenerative diseases.

References

1. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80(19):1778-83.
2. Maresova P, Klimova B, Novotny M, Kuca K. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe-A Call for a Uniform European Strategy. *J Alzheimers Dis*. 2016;54(3):1123-1133.
3. Reitz C, Mayeux R. Genetics of Alzheimer's disease in Caribbean Hispanic and African American populations. *Biol Psychiatry*. 2014;75(7):534-41.
4. Bugalho P, Lampreia T, Miguel R, Mendonça MD, Caetano A, Barbosa R. Non-Motor symptoms in Portuguese Parkinson's Disease patients: correlation and impact on Quality of Life and Activities of Daily Living. *Sci Rep*. 2016;(6):32267.
5. Ousman, S.S. and Kubes, P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Neurosci*. 2012;(15), 1096–1101.
6. Enevold C, Oturai AB, Sorensen PS, Ryder LP, Koch-Henriksen N, Bendtzen K. Multiple sclerosis and polymorphisms of innate pattern recognition receptors TLR1-10, NOD1-2, DDX58, and IFIH1. *J Neuroimmunol*. 2009;212(1-2):125-31.
7. Hirsch EC, Jenner P, FRPharm S, and Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 2013;28(1), 24-30.
8. 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.

9. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis.* 2010;37(3):510-8.
10. Carty M, Bowie AG. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochem Pharmacol.* 2011;81:825–37.
11. Walter S, et al.. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 2007;20: 947–956.
12. Lehnardt S, et al.. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J. Neurosci.* 2008;28:2320–2331.
13. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *ClinSci (Lond).* 2008;114(5):347-60.
14. Silva DJ, Borges AF, Souza PO, et al. Decreased Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 7/8-Induced Cytokines in Parkinson's Disease Patients. *Neuroimmunomodulation.* 2016;23(1), 58-66.
15. Silva DJ, Alcântara-Silva TR, Rocha Sobrinho, HM, et al. Neuroinflamação na Doença de Parkinson. *LAMSJ.* 2013;2(4), 178-86.
16. Kawai T, and S Akira. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology.* 2010;11:373-384.
17. Gao D, Li W. Structures and recognition modes of toll-like receptors. *Proteins.* 2016;85(1):3-9. doi: 10.1002/prot.25179.
18. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid

- dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol.* 2005;174(5):2942-50.
19. Govindaraj RG, Manavalan B, Lee G, Choi S. Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PLoS One.* 2010;5(9):e12713.
 20. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2010;42:495–505.
 21. Yang QW, Lu FL, Zhou Y, Wang L, Zhong Q, Lin S, et al. HMBG1 mediates ischemia– reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:593–605.
 22. Thundiyil J, Lim KL. DAMPs and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2015;24(Pt A):17-28.
 23. Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2009;59(2): 278-92. doi: 10.1016
 24. Zhang E, Lu M. Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204(1):11-20. doi: 10.1007/s00430-014-0370-1.
 25. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia.* 2003;43:281–291
 26. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:1013–1021.

27. Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2:297–312.
28. Lathia JD, Okun E, Tang SC, Griffioen K, Cheng A, et al. Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci.* 2008;28(51):13978-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2140-08.2008.
29. Brudek T, Winge K, Agander TK, Pakkenberg B. Screening of Toll-like receptors expression in multiple system atrophy brains. *Neurochem Res.* 2013;38(6):1252-1259.
30. Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging.* 2009;30(5):759-68.
31. Doorn KJ, Moors T, Drukarch B, van de Berg WDJ, Lucassen PJ, van Dam AM. Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:90. doi: 10.1186/s40478-014-0090-1.
32. 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.
33. Hayward JH, Lee SJ. A Decade of Research on TLR2 Discovering Its Pivotal Role in Glial Activation and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurol.* 2014;23(2):138-47. doi: 10.5607/en.2014.23.2.138.

34. Béraud D, Twomey M, Bloom B, Mittereder A, Ton V, Neitzke K, et al. Alpha-Synuclein alters Toll-like receptor expression. *Front Neurosci.* 2011;5:80.
35. Daniele SG, Béraud D, Davenport C, Cheng K, Yin H, Maguire-Zeiss KA. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal.* 2015;8(376):ra45. doi: 10.1126/scisignal.2005965.
36. Babcock AA, Wrenfeldt M, Holm T, Nielsen HH, Dissing-Olesen L, Toft-Hansen H et al. Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *J Neurosci.* 2006; 26: 12826–12837
37. Tiffany HL, Lavigne MC, Cui YH, Wang JM, Leto TL, Gao JL, et al. Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem.* 2001;276(26):23645-52.
38. Yazawa H, Yu Z, Takeda X, Le Y, Gong W, Ferrans V, Oppenheim J, Li C, Wang J. Beta amyloid peptide (A β 42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *The FASEB Journal.* 2001;15:2454–2462.
39. Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho E, Lockett S, Dunlop N, Wang J. Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *The Journal of Biological Chemistry.* 2006;281:3651–3659
40. Cui Y, Le Y, Yazawa H, Gong W, Wang J. Potential role for the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology.* 2002;72:628–635.
41. Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, et al. Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the

- membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol.* 2008;213(1):114-21. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.05.014.
42. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *J Neurosci.* 2009;29(38):11982-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3158-09.2009.
 43. Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR. Toll-like receptors 2 and 4 mediate A β (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem.* 2008;104(2):524-33.
 44. Richard KL, Filali M, Préfontaine P, Rivest S. Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid β 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2008;28(22):5784-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1146-08.2008.
 45. Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K. Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. *Brain.* 2006;129(Pt 11):3006-19.
 46. Scholtzova H, Kascsak RJ, Bates KA, Boutajangout A, Kerr DJ, Meeker HC, et al. Induction of toll-like receptor 9 signaling as a method for ameliorating Alzheimer's disease-related pathology. *J Neurosci.* 2009;29(6):1846-54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5715-08.2009.
 47. Sloane JA, Batt C, Ma Y, Harris ZM, Trapp B, Vartanian T. Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11555-60. doi: 10.1073/pnas.1006496107.
 48. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gütcher I, Wolter K, et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006;116(2):456-64.

49. Miranda-Hernandez S, Baxter AG. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013;2(1):75-93.
50. 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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2400-10.2010.
51. Bsibsi M, Bajramovic JJ, Vogt MH, van Duijvenvoorden E, Baghat A. The microtubule regulator stathmin is an endogenous protein agonist for TLR3. *J Immunol.* 2010;184(12):6929-37. doi: 10.4049/jimmunol.0902419.
52. Touil T, Fitzgerald D, Zhang GX, Rostami A, Gran B. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol.* 2006;177(11):7505-9.
53. Li N, Zhang X, Dong H, Zhang S, Sun J, Qian Y. Lithium ameliorates LPS-induced astrocytes activation partly via inhibition of toll-like receptor 4 expression. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(2):714–25. doi: 10.1159/000443028
54. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001;409(6822): 928-33.
55. Minoretti, P. Effect of the functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2006;391(3):147-9.
56. Wang LZ, Tian Y, Yu JT, Chen W, Wu ZC, Zhang Q, Zhang W, Tan L. Association between late-onset Alzheimer's disease and microsatellite polymorphisms in intron II of the human toll-like receptor 2 gene. *Neurosci Lett.* 2011;489:164-167.

57. Reindl M, Lutterotti A, Ingram J, Schanda K, Gassner C, Deisenhammer F, Berger T, Lorenz E. Mutations in the gene for toll-like receptor 4 and multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2003;61(1):85-8.
58. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000;25(2):187-91.
59. van der Graaf C, Kullberg BJ, Joosten L, Verver-Jansen T, Jacobs L, Van der Meer JW, et al. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine*. 2005;30(5):264-8.
60. Kroner A, Vogel F, Kolb-Maurer A, Kruse N, Toyka KV, Hemmer B, Rieckmann P, Maurer M. Impact of the Asp299Gly polymorphism in the Toll-like receptor 4 (tlr-4) gene on disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2005;165:161–165.
61. Balistreri CR, Candore G, Listì F, Fazio T, Gangi S, Incalcaterra E, et al. Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses: implications for unsuccessful aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1119:203-7.
62. Urcelay E, Blanco-Kelly F, de Las Heras V, de la Concha EG, Arroyo R, Martínez A. TLR4 haplotypes in multiple sclerosis: a case-control study in the Spanish population. *J Neuroimmunol*. 2007;192(1-2):215-8.
63. Carvalho A, Santos M, Maciel P, Rodrigues F. T-1237C polymorphism of TLR9 gene is not associated with multiple sclerosis in the Portuguese population. *MultScler*. 2008;14(4):550-2. doi: 10.1177/1352458507084594.
64. Balistreri CR, Grimaldi MP, Chiappelli M, Licastro F, Castiglia L, Listì F, et al. Association between the polymorphisms of TLR4 and CD14 genes and Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14(26):2672-7.

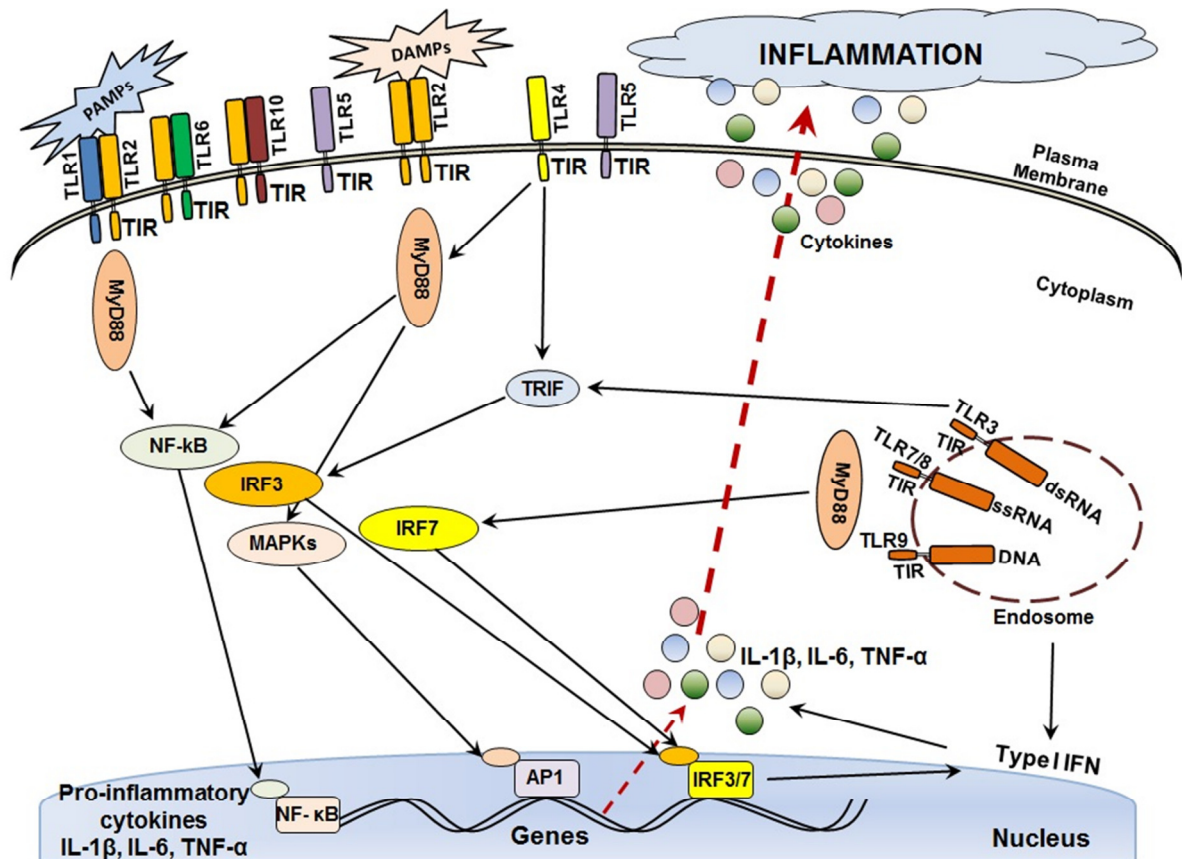
65. Duan ZX, Zhu PF, Dong H, Gu W, Yang C, Liu Q, et al. Functional significance of the TLR4/11367 polymorphism identified in Chinese Han population. *Shock*. 2007;28(2):160-4.
66. Chen YC, Yip PK, Huang YL, Sun Y, Wen LL, Chu YM, Chen TF. Sequence variants of toll like receptor 4 and late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(12):e50771.
67. Yu JT, Mou SM, Wang LZ, Mao CX, Tan L. Toll-like receptor 2 -196 to -174 del polymorphism influences the susceptibility of Han Chinese people to Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm*. 2011;8:136.
68. Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Katsarou Z, Fidani L. TLR9 -1237 T/C and TLR2 -194 to -174 del polymorphisms and the risk of Parkinson's disease in the Greek population: a pilot study. *Neurol Sci*. 2013;34(5):679-82.
69. Zhu K, Teng J, Zhao J, Liu H, Xie A. Association of TLR9 polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population. *Int J Neurosci*. 2016;126(7):612-6. doi: 10.3109/00207454.2015.1050591.
70. Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun*. 2008;22:140-7.
71. Wang LZ, Yu JT, Miao D, Wu ZC, Zong Y, Wen CQ, et al. Genetic association of TLR4/11367 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in a Han Chinese population. *Brain Res*. 2011;1381:202-7. doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.007.
72. Wang YL, Tan MS, Yu JT, Zhang W, Hu N, Wang HF, et al. Toll-like receptor 9 promoter polymorphism is associated with decreased risk of Alzheimer's disease in Han Chinese. *J Neuroinflammation*. 2013;10:101. doi: 10.1186/1742-2094-10-101.

Table 1. Summary of TLR ligands and their different cellular expression in humans.

TLR	Ligands	Origin of ligands	Cells
TLR1	Triacylated lipopeptides	Bacteria	Monocytes, macrophages (microglia), dendritic cells, B lymphocytes, astrocytes
TLR2	Diacylated lipopeptides	Bacteria	Monocytes, macrophages (microglia)
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria	myeloid dendritic cells, mast cells, NK cells, astrocytes
	Zymosan	Fungi	
	Lipophosphoglycan	Protozoan parasites (<i>Leishmania sp</i>)	
TLR3	Double stranded RNA	Virus	Macrophages (microglia), dendritic cells, B lymphocytes, astrocytes, neurons
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS)	Gram-negative bacteria	Monocytes, macrophages (microglia), myeloid dendritic cells, mast cells, B cells, intestinal epithelial cells, astrocytes
	Glycoinositolphospholipids	Protozoan parasites	
TLR5	Flagelin	Bacteria	Monocytes, macrophages (microglia), dendritic cells, intestinal epithelial cells, astrocytes
TLR6	Diacylated lipoproteins	Bacteria	Monocytes, macrophages (microglia), mast cells, B lymphocytes
TLR7	Single-stranded RNA	Virus	Monocytes, macrophages (microglia), plasmacytoid dendritic cells, B lymphocytes
TLR8	Single-stranded RNA	Virus	Monocytes, macrophages (microglia), dendritic cells, B lymphocytes
TLR9	DNA unmethylated CpG rich*	Bacteria	Monocytes, macrophages (microglia), plasmacytoid dendritic cells, B lymphocytes, astrocytes
		Virus	
TLR10	RNA	Bacteria	Macrophages, monocytes, dendritic cells, B lymphocytes
		Virus	

Based on: Carty e Bowie (2011)¹⁰; Kawai & Akira (2010)¹⁶; Aravalli et al. (2007)²⁷; Carpentier et al. (2008)⁷⁰. *CpG: dinucleotídeo citosina-guanosina.

Figure 1. Overview of the expression, assembly and cell activation through Toll-like receptors (TLR) in humans during the inflammatory response



Legenda: TLRs = Toll-like receptors. PAMPs = Pathogen-associated molecular pattern. DAMPs = Damage-associated molecular pattern. MyD88 = Myeloid differentiation primary response gene 88. TRIF = TIR domain-containing adaptor-inducing interferon. MAPKs = Mitogen-activated protein kinases. NF-κB = nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. IRF3 = Interferon regulatory factor 3. IRF7 = Interferon regulatory factor 7. IL-1β = Interleukin 1 beta. IL-6 = Interleukin 6. TNF-α = Tumor Necrosis Factor alpha.

Table 2 Summary identified DAMPs, cell distribution and associated TLR.

DAMP	Cellular distribution	TLR
Alpha-synuclein	Neurons	TLR2
Amyloid β -protein	Neurons	TLR2
MicroRNAs	Nucleated cells	TLR2/1?
HMGB1	All nucleated cells	TLR2, TLR4
Double-stranded DNA / Chromatin	All nucleated cells	TLR9
Mitochondrial DNA	All nucleated cells	TLR9
Defensins	Leucocytes	TLR4
HSP	Nucleated cells	TLR4
Galectins	Nucleated cells	TLR4?
Uric acid	Nucleated cells	TLR2/TLR4
Hyaluronan	Nucleated cells	?
Fibrinogen	Nucleated cells	?
Thioredoxin	Nucleated cells	?
SOD1	Nucleated cells	?
Extracellularly ATP	Nucleated cells	?

Abbreviations: HMGB1 - *High Mobility Box-1*; HSP - *Heat Shock Protein*.

Based on: Misch & Hawn, (2008)³⁶; Lehnardt et al., (2008)³⁷; Béraud et al., (2011)²⁰; Thundiyil & Lim, 2015.

Table 3 Major single nucleotide polymorphisms (SNP) of TLRs and their effects on human neurodegenerative diseases

SNP	Diseases	Effect	Reference
TLR1			
Asn248Ser; Ile602Ser	Multiple sclerosis	Not determined	6
TLR2			
- 196 a – 174 del	Alzheimer	Increases the risk of developing this disease	67
TLR2			
GT Intron II	Alzheimer (LOAD)	Increases the risk of developing LOAD	56
TLR2			
Arg 677Trp	Alzheimer (LOAD)	Increases the risk of developing LOAD	67
Arg753Gln			
rs1898830			
rs11938228			
rs3804099			
rs3804100			
rs7656411			
TLR2			
- 196 a – 174 del	Parkinson	Not determined	68
TLR2			
Arg753Gln	Multiple sclerosis	Increases the risk of developing this disease	6
TLR3			
Leu412Phe; Pro554Ser	Multiple sclerosis	Not determined	6
TLR4			
Asp299Gly	Alzheimer	Increases the risk of developing Late Onset Alzheimer's disease.	55,64
TLR4 C/T			
	Alzheimer	Increases the risk of developing Late Onset Alzheimer's disease.	66

rs1927907				
TLR4	Alzheimer (LOAD)	Increases the risk of developing Late Onset Alzheimer's disease.		71
G11367C				
TLR4	Multiple sclerosis	It increases the progression of the disease in the late phase		6
3'UTR (11367)				
TLR5	Multiple sclerosis	Not determined		6
Asn592Ser; Phe616Leu				
TLR9	Parkinson	Not determined		68
-1237 T/C				
rs187084		Has no effect in susceptibility for PD development in a Han Chinese		69
rs352140		Can protect against PD in females		69
TLR9	Alzheimer	The G allele was revealed to be a protective factor for the LOAD in a Han Chinese population		72
rs187084				
TLR10				
Ile369Leu	Multiple sclerosis	Not determined		6

5. DISCUSSÃO GERAL

A etiopatogenia da doença de Parkinson (DP) é complexa e não totalmente compreendida, provavelmente devido à multiplicidade de fatores envolvidos (genéticos e ambientais) (NOLAN et al., 2013; HIRSCH et al., 2013). Estudos têm evidenciado que as respostas imunes inflamatórias e anormais podem desempenhar um papel crucial na patogênese da DP (COLLINS et al., 2012; NOLAN et al., 2013; HIRSCH et al., 2013; ROCHA et al., 2017). Acredita-se que não apenas no cérebro, mas também periféricamente, a inflamação possa contribuir para o início e progressão do processo neurodegenerativo observado na DP (COLLINS et al., 2012). A neuroinflamação crônica é provavelmente um fator que colabora para a patogênese da DP. A contribuição da inflamação para a fisiopatologia da DP tem sido proposta com base em estudos epidemiológicos, genéticos e imunológicos em humanos e modelos animais e em avaliações *post mortem* (MCGEER et al., 1988; MOGI et al., 1994; MOGI et al., 2007; GROZDANOV et al., 2014). Mecanismos inflamatórios e imunológicos descritos na DP podem não apenas exacerbar ou acelerar a progressão da doença, mas também explicar, pelo menos em parte, alguns dos sintomas clínicos experimentados por pacientes com DP (MOGI et al., 2007; COLLINS et al., 2012). Evidências têm demonstrado o envolvimento de células do sistema imune inato e adaptativo, que, ao serem ativadas via TLR, produzem mediadores pró-inflamatórios ou migram para o SNC, colaborando, assim, para o processo de neurodegeneração na DP (COLLINS et al., 2012; DELEIDI & GASSER, 2013; KANNARKAT et al., 2013; DZAMKO et al., 2017).

A participação de citocinas inflamatórias tais como o TNF α , IL-1 e IL-6 tem sido relacionadas com a fisiopatologia da DP, sugerindo um estado pró-inflamatório nesta doença (BRODACKI et al., 2008; CHEN et al., 2008; REALE et al., 2009; GROZDANOV et al., 2014; SILVA et al., 2016; ROCHA et al., 2017), onde acredita-se que a neuroinflamação crônica desenvolva um importante papel na morte de neurônios dopaminérgicos induzindo a causa ou progressão da DP (COLLINS et al., 2012). Os monócitos são a principal população de leucócitos produtora de TNF α em resposta a agonistas de TLR (LPS) em hemoculturas, podendo colaborar para o processo de neuroinflamação na DP (FOKEMA et al., 2003; DAMSGAARD et al., 2009). Para avaliar a participação de leucócitos sanguíneos no processo inflamatório da DP, o presente estudo, investigou a ativação de leucócitos do sangue periférico de pacientes brasileiros com DP e indivíduos controles saudáveis, pareados por sexo e idade, utilizando-

se agonistas de TLR4 (LPS) e de TLR2/1 (Pam₃Cys) em hemoculturas e avaliou-se também a expressão de TLR1, TLR2 e TLR10 em subpopulações de monócitos.

Sabe-se que o envelhecimento humano é o principal fator de risco para as doenças neurodegenerativas (BRICKFORD et al., 2017). No primeiro estudo nós avaliamos o efeito da idade dos pacientes com DP e de indivíduos controles saudáveis, pareados por sexo, na produção de citocinas (TNF α e IL-10) em hemoculturas estimuladas com LPS e Pam₃Cys. Os nossos resultados mostraram que os pacientes DP adultos jovens produziram níveis mais elevados de TNF α após a estimulação de TLR4 do que os controles. Além disso, eles produziram mais TNF α do que pacientes com DP idosos. Como não houve diferenças entre os grupos de controles jovens e idosos e também não houve diferença entre pacientes com DP idoso e controles pareados, os dados sugerem que a resposta TLR4 é maior em pacientes com DP que têm ≤ 55 anos e início precoce da DP. Em contraste, a resposta ao agonista TLR2 foi menor nos pacientes com DP do que nos controles independentes da idade. Entre os controles jovens e idosos ou pacientes jovens e idosos não foram detectadas diferenças após 6 h de incubação com os agonistas de TLR, mas o TNF-induzido por TLR2 foi reduzido em indivíduos idosos após 24 h de incubação. Assim, enquanto a resposta do TLR4 é aumentada no grupo de pacientes jovens com DP, a TLR2 é reduzida em pacientes jovens e idosos com DP, sugerindo que a idade dos pacientes não influencia na redução da resposta a TLR2 na DP. Já demonstramos que a resposta ao TLR2 está diminuída em pacientes com DP, avaliando outro grupo de pacientes com ampla faixa etária (Silva et al., 2016). Aqui, confirmamos esses resultados em outro grupo de pacientes com DP e demonstramos que essa resposta reduzida de TLR2 é independente da idade ou do início da doença.

A resposta ao já LPS foi avaliada em pacientes com DP, principalmente em células mononucleares de sangue periférico (CMN), não mostrando consenso sobre os resultados. Níveis mais elevados ou mais baixos de TNF α induzido por TLR4 foram encontrados em culturas de CMN de pacientes com DP do que em controles (BESSLER et al., 1999, HASEGAWA et al., 2000, REALE et al., 2009). Nas hemoculturas, anteriormente, não se verificaram diferenças entre os pacientes com DP e os controles quando se compararam as concentrações de TNF α em hemoculturas estimuladas com LPS (SILVA et al., 2016).

Estudos têm evidenciado o possível envolvimento dos TLRs na patogenia da DP (PANARO et al., 2008; ROS-BERNAL et al., 2011; KIM et al., 2013; SILVA et al.,

2016; DZAMKO et al., 2017). A participação de células da imunidade inata no SNC (microglia) e na periferia (monócitos) tem sido apontada como importante na etiopatogênese da DP (GETTS et al., 2008; DREVETS et al., 2010; FUNK et al., 2013; GROZDANOV et al., 2014; SILVA et al., 2016; DZAMKO et al., 2017). A microglia e os monócitos são células que expressam diferentes TLR e podem responder, rapidamente, a estímulos de DAMPs ou PAMPs, produzindo moléculas inflamatórias que podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo o acesso de leucócitos do sangue periférico, substâncias neurotóxicas e citocinas no SNC, que podem ser potencialmente lesivas aos neurônios dopaminérgicos (REALE et al., 2009; DZAMKO et al., 2017). Aventa-se a hipótese de que a neuroinflamação na DP pode ser modulada por células sanguíneas periféricas, após exposição a substâncias indutoras de processo inflamatório (agentes infecciosos e substâncias neurotóxicas) (ROS-BERNAL et al., 2011; KIM et al., 2013); ou, ainda, que alterações no SNC, durante a neuroinflamação, podem levar a alterações do estado funcional de leucócitos do sangue periférico (GROZDANOV et al., 2014; SILVA et al., 2016; DZAMKO et al., 2017). Estudo de Drouin-Ouellet e colaboradores (2015) demonstrou uma elevada expressão de TLR4 e do fator de transcrição nuclear NF- κ B em células do estriado cerebral de pacientes com DP “*post mortem*” sugerindo ativação da via TLR4, a qual ativa MyD88, que envolve enzimas quinases que atuam sobre o NF- κ B, que, por sua vez, ativa genes pró-inflamatórios e elevada produção de TNF- α e IL-1 β e espécies reativas de oxigênio, que desempenham um papel importante facilitando a ativação da microglia e a resposta desta célula a DAMPs (α -Sinucleína) ou PAMPs (LPS) durante a neuroinflamação. Outro estudo revela que as moléculas CD14, TLR2 e TLR4 são necessárias, em conjunto, para o reconhecimento de proteína fibrilar β amiloide A, um DAMP produzido na doença de Alzheimer, para estimular ativação de microglias de camundongos (REED-GEAGHAN et al., 2009).

O nosso segundo estudo caracterizou fenotipicamente, subpopulações de monócitos, demonstrando que há alterações na subpopulação de monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺), uma população de monócitos pró-inflamatórios que produzem grandes quantidades de citocinas em resposta a PAMPs (ZIEGLER-HEITBROCK, 2007; ZIEGLER-HEITBROCK, 2015), e da função do TLR2 nos monócitos de pacientes com DP. Ainda demonstramos que há um aumento na porcentagem celular de CMN expressando o TLR10 e na sua intensidade de expressão celular (IMF), nos pacientes com DP. Também foi demonstrado, *in vitro*, que a

expressão celular de TLR10 colabora para a modulação da atividade de TLR2 sobre o seu agonista (Pam₃Cys). Portanto, alterações em TLR2 e TLR10 podem contribuir para a imunopatogênese da DP. O TLR10 pode formar homodímeros entre si ou heterodímeros com TLR1, TLR2 ou TLR6 (HASAN et al., 2005; GUAN et al., 2010; GODFROY et al., 2012), mas o seu ligante, até o momento não é conhecido. Estudo de modelagem molecular sugere que Pam₃Cys poderia ser um ligante do complexo TLR2/10 e colaborar para a ativação de leucócitos (GOVINDARAJ et al., 2010). A variação genética no gene de TLR10 pode modular o equilíbrio entre respostas imunes pró e anti-inflamatórias e consequentemente explicar a influência genética do ser humano à suscetibilidade a doenças (MORGAN et al., 2012).

Os resultados do nosso trabalho corroboram com o estudo de Stappers e colaboradores (2015) que avaliou a interferência do bloqueio de TLR10 com anticorpo monoclonal neutralizante, em culturas de CMN do sangue periférico de pacientes europeus portadores de infecções cutâneas por patógenos bacterianos (*S. aureus*, *Bacterioides fragilis*, *E. coli*), onde demonstraram um aumento da produção de IL-6 em culturas de CMN de pacientes com infecções bacterianas cutâneas, após estimulação celular com Pam₃Cys ou com antígenos bacterianos de *S. aureus* e de *B. fragilis*. Além disso, camundongos transgênicos para o gene da TLR10 são menos responsivos ao desafio com agonista de TLR2, indicando claramente o papel supressor desse receptor sob o TLR2 (OOSTING et al., 2014).

Nosso estudo verificou que o grupo de pacientes DP com maior gravidade da doença, avaliada pela escala UPDRS, apresentou menor expressão de TLR10 em monócitos, sugerindo a participação deste receptor na modulação da resposta imune inata à agonistas de TLR2/1. Diante destes achados, acredita-se que a avaliação da expressão de TLR10 em leucócitos periféricos e em células do SNC pode atuar como um biomarcador prognóstico para a DP. Estudos adicionais são necessários para decifrar o mecanismo exato pelo qual TLR10 induz seu efeito inibitório e para elucidar o potencial de polimorfismos genéticos de TLR10 na avaliação de risco, prognóstico e tratamento de doenças neurodegenerativas.

A revisão de literatura, aqui apresentada, ressalta que estudos genéticos sobre os TLR identificaram polimorfismos considerados capazes de afetar a defesa do hospedeiro e contribuir para a suscetibilidade e progressão de doenças, aumentando a suscetibilidade a doenças neurodegenerativas (YU et al., 2011; WANG et al., 2011; KALINDERI et al., 2013). O estudo de polimorfismos funcionais nos genes TLR2,

TLR4 e TLR9 em doenças neurodegenerativas tem demonstrado associação positiva entre estes e o aumento do risco para o desenvolvimento de doença de Alzheimer (DA), entretanto, os mecanismos precisos de como estes polimorfismos de TLR afetam a resposta inflamatória, colaborando para a neurodegeneração, ainda não foram elucidados (YU et al., 2011; WANG et al., 2011; KALINDERI et al., 2013). A busca de SNPs ou de genes com padrão de expressão alterado pode contribuir para a elucidação da patogênese da DP, além de identificar genes de suscetibilidade específicos e potenciais alvos terapêuticos. Portanto, mais estudos do polimorfismo funcional de genes TLR e das vias de sinalização intracelular destes receptores são necessários para melhorar a compreensão da associação entre estes polimorfismos e a patogênese das doenças neurodegenerativas. O papel da neuroinflamação na patogênese das doenças neurodegenerativas é atualmente um alvo da investigação científica. A quantidade de dados disponíveis atualmente relacionando o envolvimento do polimorfismo genético de TLR com a patogênese destas doenças é considerada limitada. Sugerimos estudos adicionais de polimorfismos SNP de TLR2 e TLR10 em leucócitos do sangue periférico e em células do SNC (*post mortem*) de pacientes com DP para investigar a sua associação com a neuroinflamação e consequentemente com a patogenia da DP.

Nossos dados, juntamente com estudos anteriores corroboram a hipótese de que mecanismos imunológicos estão envolvidos na fisiopatologia da DP (GROZDANOV et al., 2014; SILVA et al., 2016; DZAMKO et al., 2017; ROCHA et al., 2017). Há evidências de alterações da resposta imune periférica, especialmente no sangue de pacientes com DP, destacando-se que apesar das alterações imunológicas esperadas durante o envelhecimento normal humano, tais como o declínio progressivo das funções imunitárias, neurológicas e aumento da suscetibilidade a infecções microbianas, parece que na DP estas alterações são mais acentuadas.

O estudo da expressão celular de TLR em leucócitos periféricos e no sistema nervoso central (SNC), das vias de sinalização intracelular e da produção de mediadores pró-inflamatórios, é necessário a fim de esclarecer o papel dos TLR na patogênese DP e talvez para a identificação de biomarcadores de prognóstico da doença, como a expressão de TLR10 em leucócitos periféricos e em células do SNC. 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.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo não demonstrou diferenças entre a contagem total de leucócitos do sangue periférico, monócitos e a dosagem da PCR entre os pacientes com DP e os controles saudáveis. Entretanto, ao avaliar as subpopulações de monócitos no sangue periférico observou-se um aumento significativo da subpopulação de monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^{+}$) dos pacientes com DP em relação aos indivíduos controles, estas células apresentam um fenótipo pró-inflamatório podendo contribuir para a fisiopatologia da DP. Não foram detectadas diferenças significantes no percentual de monócitos expressando TLR1 e TLR2 entre pacientes e controles, ambos apresentavam alto percentual de monócitos positivos para estes dois receptores, mas a intensidade média de expressão de TLR2 foi aumentada nos pacientes com DP. A porcentagem de monócitos $TLR10^{+}$ no sangue periférico de pacientes com DP estava significativamente aumentada em relação à dos controles sadios, este receptor forma heterodímeros com TLR1 e TLR2 podendo interferir na função destes receptores e consequentemente na atividade biológica da célula.

O grupo de pacientes com DP e indivíduos controles sadios avaliados, nesta pesquisa, apresentou alta expressão celular de TLR2 em CMN do sangue periférico, independente da idade. Observou-se que TLR4 e TLR2 são diferencialmente afetados durante a DP. A resposta imune periférica de TLR4 está aumentada em pacientes jovens com DP, enquanto que a resposta de TLR2 está diminuída em pacientes DP jovens e idosos. Os resultados sugerem que a deficiência funcional de TLR2 na periferia é independente da idade dos pacientes e da duração da DP. Então, embora a DP seja uma doença relacionada à idade, algumas alterações imunológicas podem ocorrer independentemente da idade (inflamação, infecções, contato com substâncias neurotóxicas, autoimunidade, etc), como a resposta de TLR2.

Nossos dados mostram que nos pacientes com DP a expressão de TLR10 é fundamental para hiporresponsividade ao agonista de TLR2/1 comprovada pelo ensaio de neutralização de TLR10 em CMN do sangue periférico, com anticorpo monoclonal. Foi demonstrado ainda, que a expressão de TLR10 está associada com menor gravidade da doença de Parkinson, avaliada pela escala UPDRS. Acreditamos que o complexo TLR2/10 possa estar envolvido no reconhecimento e resposta imune a DAMPs no SNC, como a α -Sinucleína. Polimorfismos genéticos em genes, como os que codificam a síntese e expressão dos TLRs, de células do sistema imune inato podem resultar em

grandes efeitos sobre o risco de desenvolvimento de doenças. Poucos são os estudos que avaliaram polimorfismos genéticos de TLR em doenças neurodegenerativas. Alguns estudos não demonstraram alteração ou aumento ou diminuição do risco de doença de Alzheimer após a avaliação de polimorfismos nos genes TLR2, TLR4 e TLR9. Não foi observada associação entre os polimorfismos TLR2/TLR9 e DP em um estudo, mas outro mostrou que SNP de TLR9 foi associado com resistência à DP em mulheres chinesas. O mecanismo que explica os efeitos nos genes TLR e sua resposta inflamatória ou neurodegeneração merece um estudo mais aprofundado. Estudos adicionais são necessários para decifrar o mecanismo exato pelo qual o TLR10 induz seu efeito inibitório sobre TLR2 e para elucidar o potencial de polimorfismos genéticos de TLR10 na avaliação de risco, prognóstico e tratamento de doenças neurodegenerativas.

De forma geral, os resultados desta pesquisa, corroboram com a hipótese de que mecanismos imunes e alterações inflamatórias estão envolvidas na doença de Parkinson. Sabe-se que na DP ocorrem alterações imunes periféricas, as quais representam mais do que uma simples redução ou aumento das funções imunológicas. Considera-se um grande desafio compreender como o sistema imune está relacionado ao processo degenerativo que ocorre na DP. Algumas alterações fisiológicas ou imunológicas observadas podem assemelhar-se àquelas que ocorrem com o envelhecimento. Entretanto, essas alterações parecem ser mais exacerbadas em indivíduos com DP.

Como perspectivas pretendemos continuar a pesquisa realizando a avaliação dos níveis de outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nos sobrenadantes de culturas de CMN dos pacientes DP e indivíduos controles e estudar polimorfismos genéticos (SNP) de TLR2 e TLR10 nas amostras de DNA extraídas dos pacientes DP e indivíduos controles, provavelmente aumentando o número amostral de pacientes DP e controles saudáveis. Durante a presente pesquisa foram aplicados, a pacientes com DP e indivíduos controles saudáveis, questionários para avaliação da Ansiedade (Inventário de Ansiedade de Beck), da Depressão (BDI – Beck Depression Inventory), do Sono (Escala de sono da doença de Parkinson), da Fadiga (Parkinson's Disease Fatigue Scale – PDFS-16), cujos escores serão correlacionados com a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por leucócitos do sangue periférico dos pacientes com DP e controles saudáveis.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTI, E.S.; et al. Age dependent modifications of type 1 and type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans, *Mech. Ageing Dev*, v. 127, p. 560–566, 2006.

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-HOYOS, M.; MUÑOZ-CACHO, P.; MARTÍNEZ-TABOADA, V.M. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol*, v. 273, n. 2, p. 124-32, 2012.

BANKS, W.A.; FARRS S.A.; MONKEY, J.E. Entry of blood-bone cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation*, v. 3, p. 319-327, 2002.

BELGE, K.U.; DAYYANI, A.F., 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*, v. 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*, v. 53, p. 141-145, 1999.

BENITEZ, B.A.; DAVIS, A.A.; JIN, S.C.; IBANEZ, L.; ORTEGA-CUBERO, S.; et al. Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Mol Neurodegener*, v. 11, n. 1, p. 29-30, 2016.

BEENAKKER, K.G.M., WESTENDORP, R.G.J., DE CRAEN, A.J.M., et al. Pro-inflammatory capacity of classically activated monocytes relates positively to muscle mass and strength. *Aging Cell*, v. 12, p. 682–689, 2013.

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

BLIEDERHAEUSER, C.; GROZDANOV, V.; SPEIDEL, A.; ZONDLER, L.; RUF, W.P.; et al. Age-dependent defects of alpha-synuclein oligomer uptake in microglia and monocytes. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 3, p. 379-91, 2016.

BOEHMER, E.D.; MEEHAN, M.J.; CUTRO, B.T.; KOVACS, E.J. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated proinflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. **Mech. Ageing Dev**, v. 26, p.1305–13, 2005.

BOEHMER, E.D.; GORAL, J.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. **L Leukoc Biol**, v. 75, p. 342–9, 2004.

BICKFORD, P.C., FLOWERS, A.; GRIMMIG, B. Aging leads to altered microglial function that reduces brain resiliency increasing vulnerability to neurodegenerative diseases. **Exp Gerontol**, S0531-5565, n. 17, p. 30098-0, 2017.

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**, v. 441, p. 158-162, 2008.

BRUDEK, T.; WINGE K.; AGANDER T.K.; PAKKENBERG, B. Screening of Toll-like receptors expression in multiple system atrophy brains. **Neurochem Res**, v. 38, n. 6, p.1252-1259, 2013.

CARVEY, P.M; HENDEY, B.; MONAHAN, A. J.. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 291–314, 2009.

CHEN, H.; O'REILLY, E.J.; SCHWARZSCHILD, M.A.; ASCHERIO, A..Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. **Am J Epidemiol**, v. 167, p. 90–95, 2008.

CHEN, G.Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 826–837, 2010.

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

COLLINS, L. M.; TOULOUSE, A.; CONNOR, T. J.; NOLAN, Y. M.Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Neuropharmacol**, v.62, p. 2154–2168, 2012.

COMOGLU, S.S.; GÜVEN H.; ACAR M.; ÖZTÜRK G.; KOÇER B. Tear levels of tumor necrosis factor- α in patients with Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 553, p. 63-7, 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**, v. 33, n. 3, p. 375-386, 2010.

DAMSGAARD, C.T.; LAURITZEN, L.; CALDER, P.C.; KJAER, T.M.R.; FROKIAER, 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**, v. 340, p. 95–101, 2009.

DELEIDI, M.; GASSER, T.The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease.**Cell Mol Life Sci**, v.70,p. 4259–4273, 2013.

DE LAU, L.M.; BRETELER, M.M.Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 525-535, 2006.

DEPBOYLU, C.; et al. Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. **Exp Neurol**, v. 238, p. 183–191, 2012.

DÍAZ-CORRALES, F.J.; et al. *Nocardia otiitidiscaviarum* (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 539-548, 2004.

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**, v. 129, p. 2394–403, 2009.

DOBBS, R.J.; et al. Helicobacter hypothesis for idiopathic parkinsonism: before and beyond. **Helicobacter**, v. 1, n. 3, p. 309-322, 2008.

DREVETS, D.A.; DILLON, M.J.; SCHAWANG, J.E.; STONER, J.A.; LEENEN, P.J.M. IFN γ triggers CCR2-independent monocyte entry into the brain during systemic infection by virulent *Listeria monocytogenes*. **Brain Behav. Immun**, v. 24, p. 919-929, 2010.

DROUIN-OUELLET, J.; ST-AMOUR, I.; SAINT-PIERRE, M.; LAMONTAGNE-PROULX, J.; KRIZ, J.; et al. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 6, p. 1-11, 2015.

DZAMKO, N.; GECZY, C. L.; HALLIDAY, G. M. Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2014, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.028

DZAMKO, N.; GYSBERS, A.; PERERA, G.; BAHAR, A.; SHANKAR, A.; et al. Toll-like receptor 2 is increased in neurons in Parkinson's disease brain and may contribute to alpha-synuclein pathology. **Acta Neuropathol**, v. 133, n. 2, p.303-319, 2017.

EL-AGNAF, O.M.A.; SALEM, S.A.; PALEOLOGOU, K.E.; et al. α -Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasm. **FASEB J**, v. 15, p. 1-16, 2003.

ETEMAD, S.; ZAMIN R.M.; RUITENBERG M.J.; FILGUEIRA L. A novel in vitro human microglia model: Characterization of human monocyte-derived microglia. **J Neurosci Methods**, v. 209, n. 1, p. 79-89, 2012.

ERIKSEN, J. L.; WSZOLEK, Z.;PETRUCCELLI, L. Molecular pathogenesis of Parkinson disease.**Archives of neurology**, v. 62, n. 3, p. 353–7, 2005.

FITZGERALD, K.A.; ROWE D.C.; GOLENBOCK D.T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex.**Microbes Infect**, v. 6, n. 15, p.1361-7, 2004.

FOKKEMA SJ, LOOS BG, DE SLEGTE C, et al. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 12, p. 1091-6, 2003.

FORSEY, R.J.; THOMPSON,J.M.; ERNERUDH,J.; HURST,T.L.; STRINDHALL,J.; JOHANSSONB.; et al. Plasma cytokine profiles in elderly humans.**Mech Ageing Dev**, v. 124, p. 487–493, 2003.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GIUNTA, S.; OLIVIERI, F.; SEVINI, F.; et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans.**Mech Ageing Dev**, v. 128, p. 92–105, 2007.

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

GAO, H.-M.; HONG, J.-S. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends in immunology**, v. 29, n. 8, p. 357–65, 2008.

GETTS, D.R.; TERRY, R.L.; GETTS, M.T.; et al. Ly6c+ “Inflammatory monocytes” are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. **J Exp Med**, v. 205, p. 2319–37, 2008.

GOETZL E.J.; HUANG M.C.; KON J.; PATEL K.; SCHWARTZ J.B.; FAST K.; et al. Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging. **FASEB J**, v. 24, p. 3580–3589, 2010.

GOVINDARAJ, R.G.; MANAVALAN, B.; LEE, G.; CHOI, S.; Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12713, 2010.

GROZDANOV, V.; BLIEDERHAEUSER, C.; RUF, W.P.; ROTH, V.; FUNDEL-CLEMENS, K.; et al. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 5, p. 651-63, 2014.

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**, v. 101, p. 159-164, 2000.

HASAN, U.; CHAFFOIS, C.; GAILLARD, C.; SAULNIER, V.; MERCK, E. et al.. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. **J Immunol**, v. 174, p. 2942–2950, 2005.

HENEKA M.T.; RODRIGUEZ J.J.; VERKHRATSKY, A. Neurologia in neurodegeneration. **Brain Res Rev**, v. 63, n. 1-2, p. 189-211, 2010.

HIRSCH, E.C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism. Relat Disord**, v. 18, (suppl 1), p. S210–S212, 2012.

HIRSCH E.C.; JENNER P.; PHARM S.; PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of Parkinson's disease. **Mov Disorders**, v. 28, n. 1, p. 24-30, 2013.

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

HORNUNG, V.; ROTHENFUSSER, S.; BRITSCH, S.; KRUG, A.; JAHRSDÖRFER, B.; et al..Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4531-7, 2002.

HUNOT, S.; HIRSCH, E.C. Neuroinflammatory process in Parkinson's disease.**Ann. Neurol**, vol. 53 (sup 13), p. 49-60, 2003.

IDB, 2009. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/idb>

JANG, H.; BOLTZ, D.; STURM-RAMIREZ, K.; SHEPHERD, K.R.; JIAO, Y.; SMEYNE, R.J. Highly pathogenic H5N1 influenza vírus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. **PNAS.U.S.A**, v. 106, p. 14063-14068, 2009.

JIN, M.S.; KIM, S.E.; HEO, J.Y.; LEE, M.E.; KIM, H.M., et al..Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide.**Cell**, v. 130, p. 1071–1082, 2007.

JULIAN, M.W.; STRANGE, H.R.; BALLINGER, M.N.; HOTCHKISS, R.S.; PAPENFUSS TL, et al.. Tolerance and cross-tolerance following Toll-like receptor (TLR)-4 and -9 activation are mediated by IRAK-M and modulated by IL-7 in murine splenocytes. **PloS One**, v. 10, e0132921, 2015.

KALINDERI, K.; BOSTANTJOPOULOU S.; KATSAROU Z.; FIDANI L. TLR9 - 1237 T/C and TLR2 -194 to -174 del polymorphisms and the risk of Parkinson's disease in the Greek population: a pilot study. **Neurol Sci**, v. 34, n. 5, p. 679-82, 2013.

KANG, J.Y.; NAN, X.; JIN, M.S.; YOUN, S-J.; RYU, Y.H.; et al., 2009. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. **Immunity**, v. 31, p. 873–884, 2009.

KANNARKAT, G. T.; BOSS, J. M.; TANSEY, M. G. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. **J Parkinson's Dis**, v. 3, p. 493–514, 2013.

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

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

LEE P.H.; LEE G;; PARK H.J.; BANG O.Y.; JOO I.S.; HUT K. The plasm α synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. **J Neural Transm**, v. 113, p. 1435-1439, 2006.

LEES A.J. The Parkinson chimera. **Neurology**, v. 72, n. 7 (supl), p. 2-11, 2009.

LEWIS, P.; PROWLAND, M.D. Merrit tratado de Neurologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.768-83, 2007.

LINDQVIST, D.; KAUFMAN, E.; BRUNDIN, L.; HALL, S.; SUROVA, Y.; HANSSON, O. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47387, 2012.

LITVAN K.P.; BHATIA D.J.; BURN C.G.; GOETZ A.E.; 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**, v. 18, p. 467-486, 2003.

LIU B.; HONG J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, n. 1, p. 1–7, 2003.

LONG-SMITH C.M.; SULLIVAN A.M.; NOLAN Y.M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 89, n. 3, p. 277-87, 2009.

LUCCHINI, R.; ZIMMERMAN, N.. Lifetime cumulative exposure as a threat for neurodegeneration: need for prevention strategies on a global scale. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 6, p. 1144–8, 2009.

MAHER, F. O.; NOLAN, Y.; LYNCH, M. A. Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. **Neurobiol Aging**, v. 26, p. 717–728, 2005.

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

MARCHETTI B.; ABBRACCHIO M.P. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 10, p. 517-25, 2005.

MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B.E.; MCGEER, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v.38, n. 8, p.1285-91, 1988.

MIKACENIC C.; REINER A.P.; HOLDEN T.D.; NICKERSON D.A.; WURFEL M.M. Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 locus is the major genetic determinant of interindividual difference in TLR1/2-mediated responses. **Genes Immun**, v. 14, n. 1, p. 52-57, 2013.

MIZUNO, K.; TOMA, T.; TSUKIJI, H.; OKAMOTO, H.; YAMAZAKI, H.; et al.. Selective expression of CD16^{high}CCR2[–] subpopulation of circulating monocytes

with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. **Clin. Exp. Immunol.** v. 142, p. 461–70, 2005.

MOGI, M.; HARADA, M.; KONDO, T.; RIEDERER, P.; INAGAKI, H.; et al. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci Lett.** 1994;v. 180, n. 2, p. 147-50, 1994.

MOGI, M.; KONDO, T.; MIZUNO, Y.; NAGATSU, T. p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. **Neurosci Lett.** v.414, n. 1, p. 94-7, 2007.

MUANGPAISAN, W.; MATHEWS, A.; HORI, H.; SEIDEL, D. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. **J Med Assoc Thai.** v. 94, n. 6, p. 749–755, 2011.

NAGATSU, T.; SAWADA, M.. Inflammatory Process in Parkinson's Disease: Role for Cytokines. **Current pharmaceutical design.** v. 11, p. 999–1016, 2005.

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

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2008. Global burden disease 2008. Disponível em: <http://www.who.int/research/en/>

OOSTING, M.; CHENG, S. C.; BOLSCHER, J. M.; et al. Human TLR10 is an antiinflammatory pattern-recognition receptor. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 111, p. 4478-84, 2014.

ORR C.F.; ROWE D.B.; HALLIDAY G. M. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** v. 68, n. 5, p. 325-40, 2002.

PLACKETT, T.P.; BOEHMER, E.D.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. Aging and innate immune system, **J. Leukoc.Biol.** v. 76, p. 291–299, 2004.

PHINNEY, A.L.; ANDRINGA, G.; BOL, J.G.; WOLTERS, E.; VAN MUISWINKEL, F.L.; et al. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging. **Parkinsonism Relat.Disord**, v. 12, p. 228–238, 2006.

PFEIFFER, A.; et al. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. **Eur J Immunol**, v. 31, p.3153– 3164, 2001.

REED-GEAGHAN, E.G.; SAVAGE J.C.; HISE A.G.; LANDRETH, G.E. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A{beta} stimulated microglial activation. **J Neurosci**, v. 29, p. 11982–11992, 2009.

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.** v. 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., **PLoS One**. v. 8, n. 11, p. e79160, 2013.

ROCHA, N. P.; ASSIS, F.; SCALZO, P. L.; VIEIRA, É. L.; BARBOSA, I. G.; et al. Reduced Activated T Lymphocytes (CD4+CD25+) and Plasma Levels of Cytokines in Parkinson's Disease. **Mol Neurobiol**, 2017. doi: 10.1007/s12035-017-0404-y.

SACHIDANANDAM R.; WEISSMAN D.; SCHMIDT S.C.; KAKOL J.M.; STEIN L.D.; MARTH G.; et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928-33, 2001.

SAWADA M.; IMAMURAK.; NAGTSU, T. Role of Cytokines in Inflammatory process in Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 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**, v. 468, p. 56-58, 2010.

SCHAPIRA A.H.V.; BEZARD E.; BROTHIE J.; et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, p. 845-854, 2006.

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, 697972, 2013.

SHI, M.; LIU, C.; COOK, T.J.; BULLOCK, K.M.; ZHAO, Y.; GINGHINA. C.; et al. Plasma exosomal alpha-synuclein is likely CNS derived and increased in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 128, p. 639–650, 2014.

SILVA, D.J.; BORGES, A.F.; SOUZA, P.O.; REIS DE SOUZA, P.; RIBEIRO DE BARROS, CARDOSO, C.; et al. Decreased Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 7/8-Induced Cytokines in Parkinson's Disease Patients. **Neuroimmunomodulation**, v. 23, n. 1, p. 58-66, 2016.

SIMS G.P.; ROWE, D.C.; RIETDIJK, S.T.; HERBST R.; COYLE, A.J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p.367–388, 2010.

STAPPERS, M. H.; et al. Genetic Variation in TLR10, an Inhibitory Toll-Like Receptor, Influences Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections. **J Infect Dis**, v. 212, n. 9, p. 1491-9, 2015.

SUN, Y.; LI, H.; SUN, M.J.; ZHENG, Y.Y.; GONG, D.J.; 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**, v. 37, p.268–276, 2014.

TRIANTAFILOU, M.; et al. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. **Biochem J**, v. 381, p.527–536, 2004

TRIANTAFILOU, M.; et al.. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. **J Biol Chem**, v. 281, p. 31002–31011, 2006.

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

VAN BERGENHENEGOUWEN J.; PLANTINGA T.S.; JOOSTEN L.A.; NETEA M.G.; FOLKERTS G.; et al. TLR2& Co: a critical analysis of the complex interactions betweenTLR2and coreceptors. **J Leukoc Biol**, v. 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**, v. 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**, v. 69, n. 4, p. 333-41, 2007.

WARD, JR.; et al..A central role for monocytes in Toll-like receptor-mediated activation of the vasculature. **Immunology**, v. 128, p. 58–68, 2009.

WAHNER, A.D.; SINSHEIMER, J.S.; BRONSTEIN, J.M.; RITZ, B. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 64, n. 6, p. 836-840, 2007.

WANG L.Z.; TIAN Y.; YU J.T.; CHEN W.; WU Z.C.; et al. Association between late-onset Alzheimer's disease and microsatellite polymorphisms in intron II of the human toll-like receptor 2 gene. **Neurosci Lett**, v. 489, p.164-167, 2011.

WALES, P.; PINHO, R.; LAZARO, D.F.; OUTEIRO, T. F. Limelight on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. **J Parkinson's Dis**, v. 3, p.415–459, 2013.

WARNER T.T.; SCHAPIRA A.H. Genetics and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. v. 53, (Supl 3), p. S16-23, 2003.

WASCHBISCH, A.; et al. Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. **J Immunol**, v.196, p. 1558-1567, 2016.

WONG, K.L.; YEAP, W.H.; TAI, J.J.; et al., 2011. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunol Res**, v. 53, p. 41-57, 2011.

YE, S. M.; JOHNSON, R. W. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. **Neuroimmunomodulation**, v. 9, p. 183–192, 2001.

YOKEL, R.A. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. **J Alzheimers Dis**, v. 10, p. 223-253, 2006.

YU J.T.; MOU S.M.; WANG L.Z.; MAO C.X.; TAN, L. Toll-like receptor 2 -196 to -174 del polymorphism influences the susceptibility of Han Chinese people to Alzheimer's disease. **J Neuroinflamm**, v. 8, p. 136-7, 2011.

XIONG, Y.; PENNINI, M.; VOGEL, S.N.; MEDVEDEV, A.E. IRAK4 kinase activity is not required for induction of endotoxin tolerance but contributes to TLR2-mediated tolerance. **J Leukoc Biol**, v. 94, p. 291–300, 2013.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: Their role in infection and inflammation. **J. Leukoc. Biol**, v. 81, p. 584–92, 2007.

ZIEGLER-HEITBROCK L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. **Front Immunol**, v.6, p. 423-7, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON IDIOPÁTICA

Pesquisador: HERMÍNIO MAURÍCIO DA ROCHA SOBRINHO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20032113.0.0000.5078

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 430.095

Data da Relatoria: 17/10/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de respostas às pendências referente ao Projeto de Pesquisa "CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON IDIOPÁTICA".

Objetivo da Pesquisa:

Não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O número de indivíduos de pesquisa ainda são divergentes: 42 na metodologia (21 casos e 21

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3289-8338 **Fax:** (62)3289-8428 **E-mail:** cephoufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 430.095

controles) e os recrutados (critérios de inclusão) serão 60, incompatível para o pareamento. **PENDÊNCIA ATENDIDA**

Também não há justificativa para a inclusão de indivíduos da comunidade religiosa. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Com relação aos indivíduos da comunidade religiosa este Comitê de Ética em Pesquisa solicita que o pesquisador cumpra rigorosamente as recomendações da Resolução CNS 466/12 principalmente nos itens III.1 e IV conforme citado a seguir:

III.1 - A eticidade da pesquisa implica em: a) respeito ao participante da pesquisa em sua dignidade e autonomia, reconhecendo sua vulnerabilidade, assegurando sua vontade de contribuir e permanecer, ou não, na pesquisa, por intermédio de manifestação expressa, livre e esclarecida;

IV - DO PROCESSO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa. Entende-se por Processo de Consentimento Livre e Esclarecido todas as etapas a serem necessariamente observadas para que o convidado a participar de uma pesquisa possa se manifestar, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida.

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Após início, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, via Plataforma Brasil, relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações. O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: oephufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 430.095

Situação: Protocolo aprovado.

GOIANIA, 21 de Outubro de 2013

Assinador por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: oephcufg@yahoo.com.br

Página 03 de 03

Anexo 2 – Manuscrito submetido

Arquivos de Neuro-Psiquiatria

ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA

Toll-like receptors and their genetic polymorphisms in neurodegenerative diseases

Journal:	<i>Arquivos de Neuro-Psiquiatria</i>
Manuscript ID:	ANP-2017-0149
Manuscript Type:	Review Articles
Date Submitted by the Author:	17-May-2017
Complete List of Authors:	Rocha Sobrinho, Herminio; Universidade Federal de Goias Ribeiro-Dias, Fatima; Universidade Federal de Goiás, Immunology
Keyword:	Toll-like receptors, genetic polymorphism, neuroinflammation, neurodegenerative diseases

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

Anexo 3 – Manuscrito submetido

Immunological Investigations



TLR4 and TLR2 are differentially associated with age during Parkinson disease

Journal:	<i>Immunological Investigations</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rocha Sobrinho, Herminio; Universidade Federal de Goias, Immunology Silva, Delson; Universidade Federal de Goias, Neurology Gomides, Larissa; Universidade Federal de Goias Dorta, Miriam; Universidade Federal de Goias Oliveira, Milton; Universidade Federal de Goias Ribeiro-Dias, Fatima; Universidade Federal de Goias, Immunology
Keywords:	Whole Blood Cultures, Toll-like receptors, Parkinson's disease, cytokines, aging

SCHOLARONE™
Manuscripts