

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Nauana Somensi

AVALIAÇÃO DAS BASES MOLECULARES E CELULARES DE PROCESSOS  
INFLAMATÓRIOS E NEUROINFLAMATÓRIOS NA DOENÇA DE PARKINSON: O  
PAPEL DOS RECEPTORES TLR4 E RAGE

Nauana Somensi

Avaliação das bases moleculares e celulares de processos inflamatórios e neuroinflamatórios na Doença de Parkinson: o papel dos receptores TLR4 e RAGE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Coorientador: Prof. Dr. Juciano Gasparotto

Porto Alegre

2022



## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente às agências de fomento de pesquisa e ciência brasileiras que financiaram os estudos apresentados nesta tese, incluindo a bolsa de doutorado, que permitiu que eu me dedicasse a este trabalho científico nos últimos quatro anos. CNPq, CAPES e FAPERGS, suas existências são fundamentais para o desenvolvimento do Brasil.

Aos professores que compõem a banca examinadora desta tese, Rachel Krolow, Fábio Klamt, Luciano S. de Fraga e Cláudio Viegas Jr., é uma honra poder contar com vocês para avaliar e engrandecer esse trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, querida UFRGS, que desde 2011 tem amparado meus estudos e formação; aos seus alunos e servidores que contribuíram para a realização deste trabalho. Ao PPG Bioquímica e seus funcionários, sou muito grata por todo o suporte e atenção.

Ao laboratório 32 da UFRGS e aos colegas que proporcionaram bons momentos neste lugar. Sou grata a todos que auxiliaram na minha formação científica, profissional e pessoal. Ao meu orientador Daniel, pela confiança e suporte; ao professor Zé, pelos grandes ensinamentos compartilhados; aos queridos colegas que se tornaram grandes amigos, Carol e Lucas, vocês alegram e inspiram a vida científica (e além dela).

Agradeço especialmente ao Juciano, que me co-orientou desde a iniciação científica, e não poderia ter sido diferente no doutorado. Sobretudo, tenho em ti um ombro amigo, Juci; imensa é a alegria em aprender e crescer contigo.

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente ao Departamento de Farmacologia, seus servidores, colaboradores e alunos. Agradeço especialmente

ao professor Alfeu, por abrir as portas do laboratório, pela confiança e apoio. O agradecimento se estende aos colegas do Lab Cancer, por me receberem tão bem e estarem sempre à disposição

Também sou imensamente grata aos amigos que tive a oportunidade de compartilhar tantos momentos especiais, que tornaram a jornada mais leve e feliz... Sou muito sortuda e grata por cada risada, acolhimento, reflexão, e tantos aprendizados. É difícil citar todos os espalhados por esse sul e Brasil a fora, mas tenho certeza que cada um sabe do espaço que tem em meu coração. Um adendo especial se faz necessário para alguns: Vitinho, Laurinha e Rafa vulgo Uruguiana (*in memoriam*), fiéis amigos que ganhei no lab 32, presentes cada qual da sua maneira e que levarei sempre comigo. Também agradeço imensamente às amigas que foram fundamentais durante esse período: Clarissa, minha companheira de todas as horas; Mayara, um reencontro que me abraçou desde a chegada à ilha; Paulinha, dona de um coração imenso que me acolhe; Juliana, cujo apoio terapêutico foi essencial para chegar até aqui.

Aos alunos, colegas, mestres e vivências que o yoga me traz. Sou grata por aprender diariamente com essa filosofia e prática, sobretudo sobre entrega, humildade e dedicação.

Por fim, espero conseguir expressar em palavras toda minha gratidão àqueles que são minha base:

Maurilio, meu companheiro, incentivador incansável do meu potencial científico e docente. Sou imensamente grata pela vida e família que construímos juntos; é lindo sonhar, realizar e compartilhar tudo contigo (e o Escobar)! Amo vocês infinitamente.

Meus pais, minha mãe Marli a pai Jorge, meu porto seguro, fonte de

inspiração, luz e amor; vocês tornam tudo isso possível. Minha irmã, Tay, e meus sobrinhos, Augusto e Alice, vocês são alegria e alicerces na busca do sentido desta jornada. A vocês, sou grata pela vida e por trilharem ela ao meu lado, confiando em mim até mesmo quando eu não fui capaz de fazê-lo.

Agradeço também aos meus avós, minhas raízes, em especial minha vó Eloy, por ser um berço de amor, e ao meu nono Marcelino (*in memoriam*), sua luta contra o Parkinson me motivou a persistir nesta pesquisa.

Dedico este trabalho a todas as brasileiras e os brasileiros, aos acometidos com doenças neurodegenerativas e especialmente aos participantes deste trabalho, que acreditaram à ciência a esperança em um futuro melhor. Desejo que possamos contribuir para o progresso científico e proporcionar qualidade de vida a vocês, a nós.

*“Eu quero viver em um mundo onde todas as mulheres tenham acesso à educação, e todas as mulheres possam obter o PhD, se assim o desejarem. O privilégio não tem que ser negativo, mas temos que compartilhar nossos recursos e orientar sobre como usar nosso privilégio de maneira que capacite àqueles que não têm.”*

**Bell Hooks**

*“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.”*

**Paulo Freire**

## Sumário

<b>PARTE I</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>17</b>
1.1 Inflamação e sistema imunológico .....	17
1.2 Receptores associados a efeitos intracelulares pró-inflamatórios	19
1.3 TLR4 .....	20
1.4 RAGE.....	22
1.5 Neuroinflamação e Neurodegeneração: Doença de Parkinson (DP).....	24
1.6 Doença de Parkinson (DP): dados demográficos e características fisiopatológicas .....	28
1.7 TLR4 na neuroinflamação e neurdegeneração.....	31
1.8 RAGE na neuroinflamação e neurodegeneração .....	33
1.9 Crosstalk de RAGE e TLR4 .....	34
<b>2 Justificativa</b> .....	<b>37</b>
<b>3 Objetivos</b> .....	<b>38</b>
3.1 Objetivos específicos .....	38
<b>PARTE II</b> .....	<b>40</b>
<b>4 Resultados</b> .....	<b>41</b>
4.1 Capítulo I.....	42
4.2 Capítulo II.....	79
4.3 Capítulo III.....	117
<b>PARTE III</b> .....	<b>133</b>
<b>5 Discussão</b> .....	<b>134</b>

<b>6 Conclusões .....</b>	<b>149</b>
<b>7 Perspectivas .....</b>	<b>150</b>
<b>8 Referências .....</b>	<b>152</b>

## PARTE I

## Resumo

A inflamação é uma resposta fisiológica complexa, que envolve a participação de diferentes células imunológicas e mediadores inflamatórios. O sistema imunológico é constituído por células estruturadas com receptores de membrana capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a danos (DAMPs), como é o caso dos receptores do tipo *toll*, incluindo o TLR4, e o receptor de produtos finais de glicação avançada, o RAGE. Quando o estímulo inflamatório é acentuado, o RAGE e TLR4 são ativados e perpetuam o sinal pró-inflamatório, o que é capaz de danificar células e tecidos, tanto da periferia quanto do cérebro. A inflamação periférica e central vem sendo associada com a Doença de Parkinson (DP); produção elevada de citocinas inflamatórias e a reatividade microglial têm papel central na patogênese. O mecanismo desencadeador da DP ainda não foi identificado e os tratamentos disponíveis focam na sintomatologia. O objetivo desta tese é esclarecer o papel do TLR4 e RAGE na resposta imunológica inata e inflamação e elucidar como eles estão envolvidos na neuroinflamação e neurodegeneração dopaminérgica da Doença de Parkinson. No Capítulo I, investigamos o status inflamatório e perfil clínico de pacientes diagnosticados com DP; os DAMPs séricos encontraram-se diminuídos em DP quando comparados aos controles, e continuaram decaindo ao longo do tempo; ao mesmo tempo, pacientes com DP apresentaram um perfil anti-inflamatório de citocinas que se alterou para pró-inflamatório após um ano, mesmo sem evolução do estadiamento da doença. Além disso, desenvolvemos uma ferramenta capaz de prever a DP no estágio HY 2. No Capítulo II avaliamos um modelo *in vivo* de denervação dopaminérgica e o receptor TLR4 apresentou estar envolvido na neuroinflamação e morte neuronal dopaminérgica, principalmente em fêmeas. Por fim, no Capítulo III apresentamos um estudo *in vitro* com linhagem de monócitos em que os receptores TLR4 e RAGE intermediaram respostas imunológicas celulares através da modulação da fagocitose e ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B); já os agonistas dos receptores, tais como as proteínas do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) e a proteína de choque térmico de 70kD (HSP70), atuaram como mediadores pró-inflamatórios, atenuando o perfil anti-inflamatório. As modificações induzidas por processos inflamatórios através de TLR4 e RAGE são capazes de afetar a função imunológica, inflamação e também a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos, podendo estar na base da cadeia multifatorial de eventos que ocasionam a DP esporádica.

**Palavras-chave:** inflamação, neuroinflamação, sistema imunológico, Doença de Parkinson, neurodegeneração, TLR4, RAGE, DAMPs

## Abstract

Inflammation is a complex physiological response that involves the participation of different immune cells and inflammatory mediators. The immune system consists of structured cells with membrane receptors capable of recognizing pathogen-associated (PAMPs) and damage-associated (DAMPs) molecular patterns, such as toll-like receptors, including TLR4, and the receptor for advanced glycation end products, RAGE. When the inflammatory stimulus is increased, RAGE and TLR4 are activated and perpetuate the pro-inflammatory signal, which is capable of damaging cells and tissues, both in the periphery and in the brain. Peripheral and central inflammation have been associated with Parkinson's Disease (PD); high production of inflammatory cytokines and glial reactivity play a central role in pathogenesis. The triggering mechanism of PD has not yet been identified and available treatments focus only on symptoms. The aim of this thesis is to establish the role of TLR4 and RAGE in the innate immune response and inflammation, to elucidate how they are involved in the neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration of Parkinson's Disease. In Chapter I, we investigated the inflammatory status and clinical profile of patients diagnosed with PD; serum DAMPs were found to be lower in PD when compared to controls, and continued to decline over time; at the same time, patients with PD presented an anti-inflammatory profile of cytokines that changed to pro-inflammatory after one year, even without progression of the disease staging. In addition, we developed a tool capable to predict PD at stage HY 2. In Chapter II we evaluated an *in vivo* model of dopaminergic denervation and the TLR4 receptor was shown to be involved in neuroinflammation and dopaminergic neuronal death, mainly in females. Finally, in Chapter III we present an *in vitro* study with a monocyte lineage where the TLR4 and RAGE receptors mediated cellular immune responses through modulation of phagocytosis and NF- $\kappa$ B activation; the agonists HMGB1 and HSP70, acted as pro-inflammatory mediators, attenuating the anti-inflammatory profile. The changes induced by inflammatory processes through TLR4 and RAGE are capable of affecting immune function, inflammation and also the survival of dopaminergic neurons, and may be at the base of multifactorial chain of events that cause sporadic PD.

**Keywords:** inflammation, neuroinflammation, immune system, Parkinson's disease, neurodegeneration, TLR4, RAGE, DAMPs

## Lista de Abreviaturas

**4-HNE:** 4-hidroxinonenal

**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina

**AGE:** produto final de glicação avançada, do inglês: *advanced glycation end-products*

**AGER:** Gene humano do RAGE, do inglês: *advanced glycation end-products receptor*

**ALOX 15:** araquidonato 15-lipoxigenase, do inglês: *arachidonate 15-lipoxygenase*

**AP-1:** proteína ativadora-1, do inglês: *activator protein 1*

**CCL5/RANTES:** ligante 5 de quimiocina (motivo C-C), do inglês: *C-C Motif Chemokine Ligand 5*, também chamado de RANTES, do inglês: *Regulated On Activation, Normal T-Cell Expressed and Secreted*

**BDI:** teste de depressão, do inglês: *Beck II depression*

**BHE:** barreira hematoencefálica

**BMI:** IMC, índice de massa corporal, do inglês: *body mass index*

**CCL13:** ligante 13 de quimiocina (motivo C-C), do inglês: *C-C Motif Chemokine Ligand 13*

**CML:** carboximetil-lisina

**CNS:** sistema nervosa central, do inglês: *central nervous system*

**CXCL9:** ligante 9 de quimiocina (motivo CXC), do inglês: *C-X-C Motif Chemokine Ligand 9*

**DAMP:** padrão molecular associado ao dano, do inglês: *damage-associated molecular pattern*

**DP:** Doença de Parkinson

**ERO:** espécie reativa de oxigênio

**ERN:** espécie reativa de nitrogênio

**FPS-ZM1:** nome comercial do inibidor seletivo de RAGE, N-Benzil-N-ciclo-hexil-4-clorobenzamida

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial, do inglês: *glial fibrillary acidic protein*

**HC:** indivíduos controles saudáveis, do inglês: *healthy control*

**HMGB1:** grupo de alta mobilidade 1, do inglês: *high mobility group box 1*

**HSP70:** proteína de choque térmico 70kD, do inglês: *high shock protein 70*

**HY:** escala Hoehn and Yahr

**Iba-1:** proteína adaptadora ionizada 1 de ligação ao cálcio, do inglês: *ionized calcium binding adapter protein 1*

**IL-“x”:** interleucina número “x”

**IkB:** proteína cinase inibidora do fator nuclear NF-κB, do inglês: *inhibitory kinase kappa B*

**IKK:** proteína cinase de IκB

**JNK:** proteína cinase ativadas por estresse/cinases jun amino-terminais, do inglês: *stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases*

**LPS:** lipopolissacarídeo

**MAPK:** proteína-cinases ativadas por mitógenos, do inglês: *mitogen-activated protein kinase*

**MHC:** complexo principal de histocompatibilidade, do inglês: *major histocompatibility complex*

**MIP:** proteínas inflamatórias de macrófagos, do inglês: *macrophage inflammatory proteins*

**MoCA:** teste cognitivo do inglês: *Montreal Cognitive Assessment*

**MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina, do inglês: *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*

**MYD88:** molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88, do inglês: *myeloid differentiation primary response 88*

**NF- $\kappa$ B:** fator nuclear kappa B, do inglês: *nuclear factor kappa B*

**NMS:** sintomas não motores, o inglês: *non-motor symptoms*

**NO:** óxido nítrico, do inglês: *nitric oxide*

**OFT:** teste de campo aberto, do inglês: *open field test*

**p38 MAPK:** proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kD, do inglês: *p38 mitogen-activated protein kinases*

**PAMP:** padrão molecular associado a patógeno, do inglês: *patogen-associated molecular pattern*

**PBMC:** célula mononuclear de sangue periférico, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*

**PD:** Doença de Parkinson, do inglês: *Parkinson's disease*

**PD<sub>E</sub>:** avaliação dos pacientes com Doença de Parkinson, do inglês: *Parkinson's disease evaluation*

**PD<sub>R</sub>:** reavaliação dos pacientes com Doença de Parkinson, do inglês: *Parkinson's disease re-evaluation*

**PDSS:** escala de avaliação do sono da doença de Parkinson, do inglês: *Parkinson's disease sleep scale*

**PMA:** forbol 12-miristato 13-acetato, do inglês: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

**RAGE:** receptor para produtos finais de glicação avançada, do inglês: *receptor for advanced glycation end products*

**REM:** movimento rápido dos olhos, do inglês: *rapid eye movement*

**RT-qPCR:** reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real, do inglês: *reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction*

**siRNA:** pequenos RNAs de interferência, do inglês: *small interference RNA*

**SN:** substância negra

**SNpc:** substância negra *pars compacta*

**SNr:** substância negra reticulada

**SNC:** sistema nervoso central

**sRAGE:** RAGE solúvel, do inglês: *soluble receptor for advanced glycation end products*

**ST:** estriado, do inglês: *striatum*

**STAT-1:** transdutor de sinal e ativador da transcrição 1, do inglês: *Signal transducer and activator of transcription 1*

**TAK-242:** ou Resatorvid, nomes comerciais para o inibidor seletivo de TLR4, com fórmula (R)-Etil 6-(N-(2-cloro-4-fluorofenil)sulfamoil) ciclohexeno-1 carboxilato

**TH:** tirosina hidroxilase

**TLR4:** receptor tipo toll 4, do inglês: *toll-like receptor 4*

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral- $\alpha$ , do inglês: *tumor necrosis factor- $\alpha$*

**TRIF:** proteína adaptadora contendo domínio TIR induzindo Interferon- $\beta$ , do inglês: *TIR domain containing adapter inducing IFN- $\beta$*

**U937:** linhagem celular de monócitos humanos

**UPDRS:** escala unificada de avaliação na doença de Parkinson, do inglês: *Unified Parkinson Disease Rating Scale*

# **1 Introdução**

## **1.1 Inflamação e sistema imunológico**

A inflamação é uma resposta fisiológica que envolve a participação de uma variedade de mediadores químicos, vias de sinalização e células do sistema imunológico. A inflamação aguda pode ser induzida por patógeno ou algum dano intrínseco, e tem como finalidade sinalizar a fonte do dano e reparar/restaurar a homeostase no tecido afetado. Caso o insulto seja intenso, complexo ou constante, ou ainda, se o sistema de defesa não for eficaz em neutralizá-lo e/ou eliminá-lo, a inflamação pode evoluir para um estado crônico.

O sistema imunológico inato é o primeiro a ser ativado frente às alterações fisiológicas, sejam elas provenientes de insultos patogênicos extrínsecos ou fisiopatológicos intrínsecos. Algumas das células que compõem esse sistema são classificadas como fagócitos: os monócitos do sangue, macrófagos teciduais e micróglias no sistema nervoso central (SNC)(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os monócitos são células mononucleares do sangue que participam das primeiras respostas imunológicas e são capazes de migrar para tecidos e alterar a expressão de proteínas, receptores e morfologia, a fim de se diferenciarem em macrófagos. Macrófagos, por sua vez, são células fagocitárias dos tecidos e desempenham papéis essenciais na imunidade inata e também na adaptativa. Além de destruir patógenos, estas células funcionam como apresentadoras de antígenos: apresentam os antígenos processados a células mais especializadas do sistema imunológico adaptativo, os linfócitos. Estes, por sua vez, são capazes de gerar uma resposta mais robusta e memória imunológica.

Já no cérebro, as respostas imunes são atribuídas às células da glia,

principalmente à micróglia, células residentes especializadas em processar e apresentar antígenos. Aproximadamente 12% de todas as células do sistema nervoso central são micróglias e estão preferencialmente localizadas próximas às regiões de vascularização, como meninges e órgãos circunventriculares, refletindo assim seu papel na defesa imunológica cerebral. Elas apresentam baixa reatividade em estados basais e tem função de suporte trófico essencial para a sobrevivência neuronal, auxiliando na manutenção celular (STREIT, 2002). Uma vez estimulada, a micróglia é capaz de liberar citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e disparar a atividade fagocitária associada à ativação da NADPH oxidase (HALLIWELL, 2006).

Macrófagos e micróglias fagocitam microorganismos e moléculas e a partir da fusão do fagossomo com o lisossomo, formam o fagolisossomo. Os fagolisossomos são muito ácidos devido ao acúmulo de muitas moléculas de V-ATPase em sua membrana. A ativação da NADPH oxidase, enzima de membrana responsável pela produção de espécies reativas direcionadas ao interior do fagolisossomo, resulta na produção de radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), substratos para a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HOCl). Também ocorre a produção de espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), através da enzima óxido nítrico sintetase induzida (NAGATSU; MOGI; ICHINOSE; TOGARI, 2000), além da atividade de enzimas lisossômicas, que processam e até mesmo degradam as moléculas fagocitadas (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2020). Algumas espécies reativas são importantes sinalizadoras celulares, como é o caso do óxido nítrico, que induz a produção de citocinas por macrófagos e atua sobre biomoléculas de células adjacentes (WINK; B HINES; CHENG; SWITZER *et al.*, 2011).

Dependendo dos estímulos inflamatórios, os macrófagos podem assumir

diferentes fenótipos, que abrangem uma grande diversidade e plasticidade (BECKER, M.; DE BASTIANI, M. A.; PARISI, M. M.; GUMA, F. *et al.*, 2015). Muitos autores os agrupam tipicamente em perfis clássicos ou alternativos. A reatividade clássica é estimulada por substâncias tóxicas de agentes microbianos como LPS (lipopolissacarídeo), bem como citocinas derivadas de células T auxiliares tipo 1 (células Th1) e interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Este subtipo está associado a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-1 que estão envolvidos em respostas citotóxicas. Por outro lado, macrófagos alternativos são tipicamente induzidos por citocinas Th2 (IL-4 e/ou IL-13), e são caracterizadas por respostas anti-inflamatórias, imunossupressoras e de reparo tecidual, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (MORRONE; SOMENSI; FRANZ; RAMOS *et al.*, 2019).

## **1.2 Receptores associados a efeitos intracelulares pró-inflamatórios**

Os macrófagos e micróglias iniciam suas atividades fagocíticas e inflamatórias através da identificação de partículas alvo presentes no meio extracelular. Para isso, estas células são equipadas com receptores responsáveis por fazer o reconhecimento de moléculas específicas ou padrões moleculares, sendo estes classificados como receptores de padrão (PRRs do inglês "*Pattern Recognition Receptors*"). Os padrões moleculares podem estar associados a patógenos (PAMPs, do inglês "*Patogen Associated Molecular Paterns*"), como é o caso de endotoxinas de bactérias, ou padrões associados a danos (DAMPs, do inglês "*Damage Associated Molecular Paterns*") (SANTONI; CARDINALI; MORELLI; SANTONI *et al.*, 2015). Os DAMPs são caracterizados por serem moléculas intrínsecas, com expressão e papel fisiologicamente intracelular, e quando presentes no meio

extracelular estão associados a danos nas células.

Nas células do sistema imunológico inato, ao reconhecerem seus ligantes, os PRRs passam a gerar sinais intracelulares e, subsequentemente, a ativar diversos processos celulares. Estes variam de acordo com a molécula ligante, célula alvo e contexto em questão, podendo ser: fagocitose, proliferação celular, morte e, além disso, produção de mediadores inflamatórios capazes de ativar células adjacentes (CHAVAKIS; BIERHAUS; AL-FAKHRI; SCHNEIDER *et al.*, 2003; EHRCHEN; SUNDERKOTTER; FOELL; VOGL *et al.*, 2009)

Dessa forma, mais células do sistema imunológico são recrutadas e ativadas, a fim de lidar com o insulto de forma regulada e controlada. Contudo, em ocasiões nas quais ocorre excessiva sinalização pró-inflamatória e acúmulo de mediadores inflamatórios, a expressão e atividade de alguns receptores aumentam, desencadeando a intensificação do quadro inflamatório (CHUAH; BASIR; TALIB; TIE *et al.*, 2013; LUCAS; MAES, 2013; YK; R; H; TH *et al.*, 2013; ZHONG; LI; ZHOU; JIANG *et al.*, 2020). Este é o caso dos receptores TLR4 e RAGE, que medeiam a resposta imune inflamatória e também preparam os monócitos, macrófagos e micróglia para a fagocitose.

### **1.3 TLR4**

Os receptores do tipo Toll (TLR) são uma família de proteínas evolutivamente conservadas que permitem que as células do sistema imune inato respondam rapidamente a presença de estruturas microbianas (PAMPs) e também a dano celular (DAMPs). As células expressam diferentes TLRs, presentes em diferentes localizações na célula, sendo o TLR4 um dos principais receptores transmembranares que desempenham importante função durante a inflamação desencadeada por

fagócitos. O TLR4 é o principal receptor de endotoxina (como o LPS de bactérias gram-negativas) e, além disso, das proteínas HMGB-1 e HSPs (LUCAS; MAES, 2013). HMGB-1 e HSPs podem estar no meio extracelular não apenas durante lesão celular, mas também em várias condições assépticas de estresse celular e tecidual. Desta forma, respostas inflamatórias imunológicas podem ser ativadas sem a presença de microrganismos invasores.

Os TLRs pertencem a uma classe de receptores ampla, chamada de IL-1/superfamília de TLR, que incluem receptores para as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18. Eles são receptores transmembrana tipo 1, contendo repetições extracelulares ricas em leucina e um domínio receptor Toll / interleucina-1 (TIR) intracelular. A ativação de TLR4 inicia uma cascata de transdução de sinal que recruta um conjunto de adaptadores contendo o domínio TIR intracelular, como MyD88 ou TRIF, que ativam vias de sinalização citoplasmática (LUCAS; MAES, 2013).

Os principais fatores de transcrição ativados são NF- $\kappa$ B e AP1, que induzem a expressão de genes envolvidos na imunidade e inflamação, dentre eles uma ampla variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e seus receptores, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ); as interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IL-23; proteínas inflamatórias de macrófagos MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , óxido nítrico sintase induzida (LEE; KIM, 2007; NAGATSU; MOGI; ICHINOSE; TOGARI). A ativação do NF- $\kappa$ B dependente de TRIF é apropriadamente chamada de ativação de NF- $\kappa$ B de “fase tardia”, enquanto a rota mais rápida de TLR4 através de MyD88 é a “fase inicial” de NF- $\kappa$ B. A coordenação da sinalização "precoce" e "tardia" é uma capacidade de TLR4, podendo explicar a progressão dos processos inflamatórios, tais como da neuroinflamação para neurodegeneração, em que há dano inflamatório

no CNS e morte neuronal (BUCHANAN; HUTCHINSON; WATKINS; YIN, 2010).

#### 1.4 RAGE

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana multiligante da superfamília das imunoglobulinas. É classificado como um receptor do tipo "scavenger", de limpeza, que se liga tipicamente a múltiplos ligantes e promove a remoção de alvos não próprios (principalmente produtos bacterianos) ou alterados (oxidados, acetilados) (LEY; PRAMOD; CROFT; RAVICHANDRAN *et al.*, 2016). Inicialmente descrito como um receptor específico para produtos finais de glicação avançada (HUTTUNEN; FAGES; RAUVALA, 1999), incluindo peptídeos contendo os resíduos glicosilados carboxi-metil-lisina (CML), carboxi-etil-lisina (CEL) e argipirimidina, o RAGE é, na verdade, capaz de reconhecer padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), presentes em proteínas, como a S100B, HMGB1, peptídeo beta-amiloide ( $A\beta$ ) e HSP70 (PRANTNER; NALLAR; VOGEL, 2020).

O RAGE está presente apenas em mamíferos e possui baixa expressão fisiológica, com exceção do período do desenvolvimento e em tecidos com alta barreira imunológica primária (pele, alvéolos pulmonares e fagócitos). Sua expressão também se encontra aumentada em diversas patologias relacionadas a um estado pró-inflamatório crônico, como diabetes, artrite reumatoide, aterosclerose, doença renal crônica, doença de Alzheimer e Parkinson e diversos tipos de câncer (MACZUREK; SHANMUGAM; MUNCH, 2008; SRIKANTH; MACZUREK; PHAN; STEELE *et al.*, 2011).

A interação do RAGE com seus ligantes ativa rapidamente a proteína NADPH oxidase presente na parte interna da membrana plasmática, capaz de ativar via de

sinalização citoplasmática na qual o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como segundo mensageiro em pelo menos uma das etapas (JIANG; WANG; TUO; MA *et al.*, 2018). Além disso, também ativa mecanismos transitórios de ação, como a ativação de cascatas de fosforilação e oxidação de grupamentos tióis de proteínas redox-sensíveis (SRIKANTH; MACZUREK; PHAN; STEELE *et al.*, 2011). Tais eventos acabam induzindo a fosforilação de proteínas cinases da subunidade inibitória IκBα (IKKs). Esta subunidade é responsável pela integridade do complexo IκB-p50-p65, que é inativo. No entanto, a fosforilação de IκBα por IKKs resulta na dissociação das subunidades p50-p65, as quais podem formar homo e/ou heterodímeros. Uma vez que migra para o núcleo, a unidade p65 (NF-κB) é capaz de atuar como fator de transcrição gênica (SARNICO; BRANCA; LANZILLOTTA; PORRINI *et al.*, 2012). Essa ativação redox-dependente de NF-κB, que por sua vez controla a expressão de mediadores pró-inflamatórios (por exemplo, citocinas), é uma das vias mais clássicas derivadas da ativação de RAGE

(JANSSEN-HEININGER; POYNTER; BAEUERLE, 2000).

Como o gene do RAGE (*Ager*) também possui um elemento responsivo ao NF-κB, a ativação do receptor é capaz de aumentar a própria expressão (BOPP; BIERHAUS; HOFER; BOUCHON *et al.*, 2008; LI; SCHMIDT, 1997). Tal mecanismo de retroalimentação positiva, bem como a indução da transcrição de RAGE por citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, vêm sendo apontados como o eixo principal da intensificação/perpetuação de estados pró-inflamatórios crônicos (LUKIC; HUMPERT; NAWROTH; BIERHAUS, 2008).

Um exemplo desse processo ocorre na Doença de Alzheimer. Observou-se que a ativação do RAGE pelo peptídeo β-amiloide estabelece um eixo de retroalimentação positiva da cascata amiloidogênica, uma vez que induz a liberação

de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no tecido cerebral e ocasiona a ativação da micróglia, com consequente produção de espécies reativas via NADPH oxidase, NO sintase e mieloperoxidases. Esses fatores aumentam a produção e acúmulo do próprio peptídeo  $\beta$ -amiloide e do próprio RAGE, intensificando a inflamação e progressão da patologia (MACZUREK; SHANMUGAM; MUNCH, 2008).

### **1.5 Neuroinflamação e Neurodegeneração: Doença de Parkinson (DP)**

A Doença de Parkinson é caracterizada por alterações no sistema dopaminérgico e consequentes alterações motoras; apesar de não ser comumente considerada uma doença relacionada ao sistema imunológico, há componentes evidentes da resposta inflamatória que precedem e acompanham a neurodegeneração na DP. As células residentes do sistema nervoso central, tais como neurônios, micróglia e astrócitos, podem ser afetadas e danificadas durante processos inflamatórios decorrentes tanto da periferia quanto do próprio cérebro. Sabe-se que a inflamação sistêmica é capaz de induzir a reatividade microglial, o que contribui para o desenvolvimento de processos neuroinflamatórios e progressão das doenças neurodegenerativas (GLASS; SAIJO; WINNER; MARCHETTO *et al.*, 2010; QIN; WU; BLOCK; LIU *et al.*, 2007). Por outro lado, a inflamação no sistema nervoso, além de ativar a micróglia, também desencadeia o aumento de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea (GASPAROTTO; RIBEIRO; BORTOLIN; SOMENSI; RABELO *et al.*, 2017; WILLIAMS-GRAY; WIJEYEKOON; YARNALL; LAWSON *et al.*, 2016).

Os efeitos da inflamação são consistentes com a hipótese multifatorial da origem da DP (SULZER, 2007). Os fatores desencadeadores da inflamação podem ser a desregulação das vias inflamatórias (por exemplo, alteração imunológica

associada ao envelhecimento ou vulnerabilidade genética), patógenos (infecção bacteriana ou viral), toxinas ambientais (agrotóxicos) e agregados de proteínas insolúveis ( $\alpha$ -sinucleína) (SU; FEDEROFF, 2014).

Foi observado que a substância negra dos pacientes apresentava altos níveis de expressão de HLA-DR, uma molécula da família do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes (MCGEER; ITAGAKI; BOYES; MCGEER, 1988). Em seguida, outros componentes típicos de resposta pró-inflamatória crônica foram descritos na DP, tais como ativação contínua da micróglia, e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no soro e no líquido cefalorraquidiano (AKIYAMA; BARGER; BARNUM; BRADT *et al.*, 2000). Há também a evidência epidemiológica demonstrando que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (em particular, o ibuprofeno) pode ser preventivo em relação à DP (GAO; CHEN; SCHWARZSCHILD; ASCHERIO, 2011).

O soro de pacientes com DP pode ser constituído de níveis mais elevados de TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-2 e IL-10 circulantes em comparação a grupos controles; componentes anti-inflamatórios podem estar associados à redução do déficit motor, enquanto que níveis elevados de componentes pró-inflamatórios estão associados com déficit cognitivo (WILLIAMS-GRAY; WIJEYEKOON; YARNALL; LAWSON *et al.*, 2016).

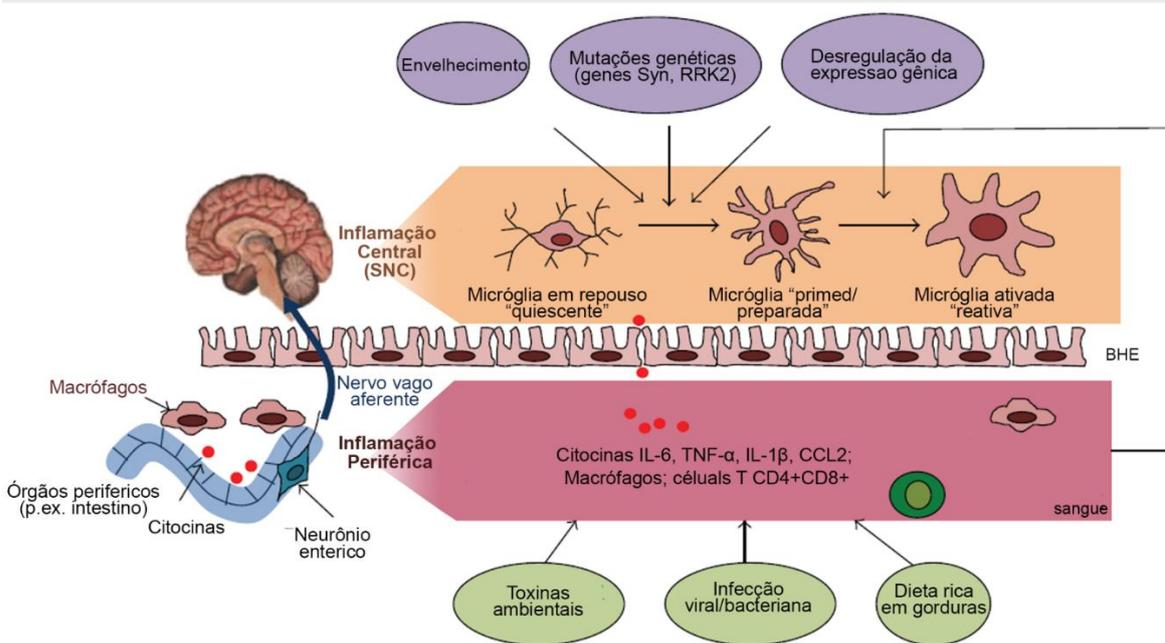
Acredita-se que as citocinas e espécies reativas produzidas pela micróglia reativa modulem diretamente a progressão da morte neuronal na DP. Os neurônios dopaminérgicos são tipicamente sensíveis à reatividade microglial devido a algumas características metabólicas intrínsecas. Tais características tornam esse subtipo neuronal especificamente mais sensível ao estresse oxidativo originado pela ação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas produzidas pela micróglia reativa. Em

condições saudáveis, a oxidação celular da dopamina (que pode ser não enzimática ou catalisada pela monoamina-oxidase) produz  $H_2O_2$ , radicais superóxido e formas semi-quinonas (radicais) da própria dopamina. O estresse oxidativo potencializa a decomposição da dopamina em derivados tóxicos, bem como reforça a ativação de vias de sinalização pró-apoptóticas disparadas pela ação de citocinas pró-inflamatórias (LULL; BLOCK, 2010).

A reatividade microglial capaz de induzir a degeneração neuronal dopaminérgica não é necessariamente disparada por uma infecção. O acúmulo de formas aberrantes da  $\alpha$ -sinucleína produzida nos neurônios dopaminérgicos pode disparar a reatividade microglial, devido principalmente à presença contínua de agregados insolúveis dessa proteína que acabam por ser reconhecidos como corpos estranhos pela micróglia (GAO; KOTZBAUER; URYU; LEIGHT *et al.*, 2008). Esta interação entre os neurônios dopaminérgicos e a micróglia pode ser reforçada, tornando-se um ciclo de retroalimentação positiva que acaba por induzir as células microgliais a um estado patológico crônico de ativação, resultando em quadro neuroinflamatório e uma progressão contínua do processo de neurodegeneração.

A inflamação no SNC é uma característica comum a todas as formas de DP, tanto genética (familiar), quanto idiopática (esporádica). Diferente do que se pensava, a neuroinflamação não é um evento isolado do SNC (SU; FEDEROFF, 2014); há uma fluidez com a periferia, que pode ocorrer de diversas maneiras, conforme mostrado na Figura 1. A rota neural é através do núcleo motor dorsal do nervo vago (TRACEY, 2002); a via humoral envolve citocinas circulantes que se comunicam com o cérebro por várias vias: (i) por transporte saturável através da barreira hematoencefálica (BHE) (HIRSCH; VYAS; HUNOT, 2012); (ii) ativando células endoteliais e diapedese de macrófagos perivasculares (LAFLAMME;

LACROIX; RIVEST, 1999) e (iii) através de órgãos circunventriculares que não possuem barreira hematoencefálica funcional (BLATTEIS, 1992). Ainda, o influxo de glóbulos brancos periféricos no parênquima cerebral indica que ainda pode estar ocorrendo uma disfunção da barreira hematoencefálica em pacientes com DP. Esse processo também permite que mudanças no cérebro possam afetar as células imunes e esses efeitos podem ser transferidos para o sistema imune periférico.



**Figura 1.** Interação entre o sistema imunológico central e periférico na doença de Parkinson - Adaptado de Su, X e Federoff, H.J., 2014. O processo de envelhecimento, mutação genética e/ou desregulação de certas expressões gênicas servem como um estímulo iniciador ("priming") para a micróglia. Após estimulação secundária (por exemplo, toxina ambiental, infecção viral, dieta rica em gordura), a inflamação periférica é induzida e se comunica com o cérebro através de vias neurais (aferente vagal) ou humoral (por exemplo, circulação de citocinas). A micróglia iniciada é ainda mais reativa e libera quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias conduzindo à neurodegeneração.

As modificações bioquímicas induzidas por processos inflamatórios capazes de afetar a função e sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos podem estar na base da cadeia multifatorial de eventos que ocasionam a DP esporádica (D, 2007; SULZER, 2007). Esta ideia é relativamente nova na literatura, porém as evidências

em seu favor vêm trazendo importantes *insights* no entendimento das bases moleculares da DP. Dentre estes *insights*, a ideia de que a identificação de componentes comuns responsáveis pela integração da sinalização pró-inflamatória com a sinalização pró-apoptótica nos monócitos, macrófagos, micróglia e nos neurônios dopaminérgicos revelará novos alvos terapêuticos, cujo mecanismo de ação residirá no combate à neuroinflamação e neurodegeneração propriamente dita, e não apenas nas consequências da morte neuronal dopaminérgica.

O efeito da inflamação na sobrevivência de neurônios da via nigroestriatal tem sido investigado em modelos animais através da utilização de lipopolissacarídeo de parede celular bacteriana (LPS), bem como de toxinas indutoras de degeneração dopaminérgica comumente aplicadas em modelos animais da doença DP, como a 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) e MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina).

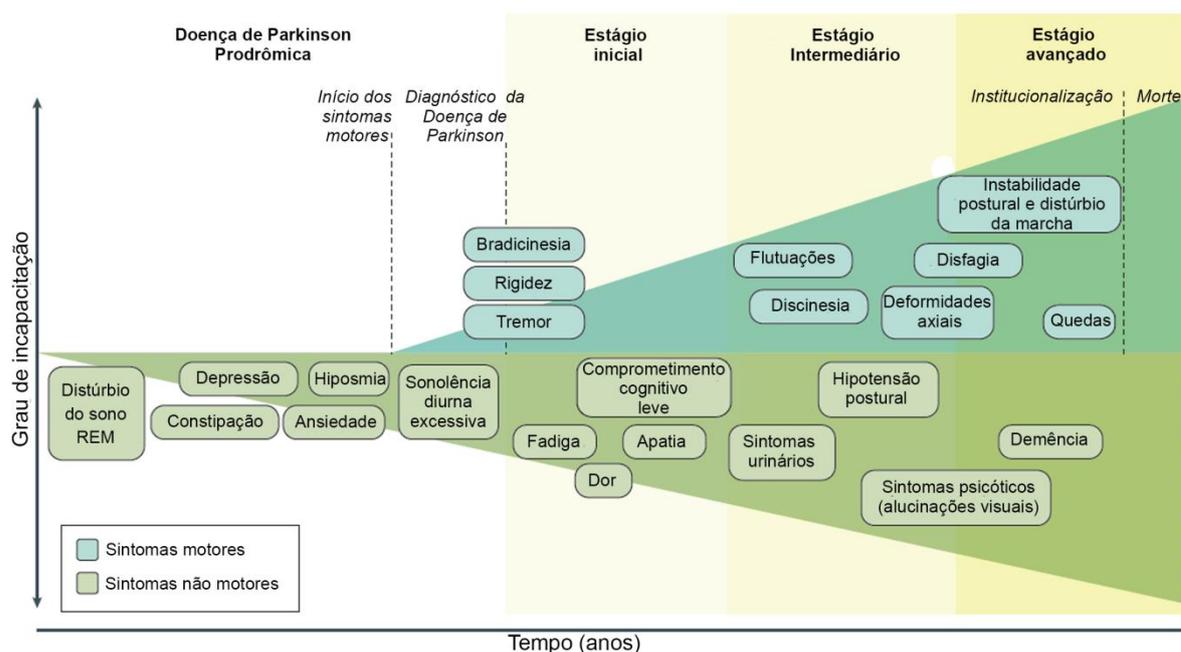
## **1.6 Doença de Parkinson (DP): dados demográficos e características fisiopatológicas**

A DP está dentre as patologias neurodegenerativas mais frequentes atualmente; estima-se que a sua prevalência é de 1% na população mundial acima de 60 anos de idade (WIRDEFELDT; ADAMI; COLE; TRICHOPOULOS *et al.*, 2011). No Brasil, a divulgação da DP não é obrigatória; portanto, não há dados oficiais sobre o número real de pacientes com a doença, mas um estudo estima que 3,3% dentre os idosos com idade maior ou igual a 65 anos possuam DP (BARBOSA; CARAMELLI; MAIA; CUNNINGHAM *et al.*, 2006).

A DP é aproximadamente duas vezes mais prevalente em homens do que em mulheres (VAN DEN EEDEN; TANNER; BERNSTEIN; FROSS *et al.*, 2003). Estudos sugerem que o sexo masculino está relacionado com idade precoce de manifestação

da DP e maior gravidade de sintomas clínicos (JURADO-CORONEL; CABEZAS; ÁVILA RODRÍGUEZ; ECHEVERRIA *et al.*, 2018). Além disso, existem diferenças relacionadas ao sexo na resposta farmacológica aos tratamentos, incluindo L-DOPA (COLOMBO; ABBRUZZESE; ANTONINI; BARONE *et al.*, 2015).

Os sintomas clássicos observados nos pacientes com DP são motores, tais como tremores, rigidez muscular, discinesia, instabilidade postural. Contudo, quando esses sintomas se tornam evidentes, mais de 50% dos neurônios dopaminérgicos já morreram; anteriormente a isso, os pacientes já apresentam alguns sintomas não-motores, que evoluem com o passar da doença (Figura 2): depressão, ansiedade, distúrbio do sono de ondas lentas (sono REM), constipação, alteração ou perda de sensibilidade olfativa (anosmia), que até mesmo precedem os sintomas motores (CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006; PFEIFFER, 2016). Como os sintomas não motores fazem parte da fase prodromal da doença, ou seja, antes mesmo do estabelecimento do diagnóstico, são associados à DP somente após o aparecimento dos sintomas motores.



**Figura 2.** Sintomas clínicos associados à doença progressão da de Parkinson – Adaptado de Poewe e colaboradores, 2017. O diagnóstico da doença de Parkinson ocorre com o início dos sintomas motores (estágio inicial) tipicamente no final dos 50 anos, mas pode ser precedido por uma fase prodrômica de anos ou mesmo décadas, caracterizada por sintomas não motores específicos (Doença de Parkinson prodrômica). Os sintomas não motores tornam-se cada vez mais prevalentes e óbvios ao longo da doença, mas podem estar presentes em grau variável em todos os estágios da doença de Parkinson. A incapacidade progressiva da doença de Parkinson é impulsionada pela combinação desses problemas não motores com o aumento da gravidade das características motoras cardinais, o desenvolvimento de complicações motoras induzidas pela levo DOPA (doença de Parkinson em estágio intermediário) e a evolução da deficiência de L-DOPA- deficiências motoras responsivas, como instabilidade postural, problemas de marcha (incluindo congelamento) e disfagia (doença de Parkinson em estágio avançado).

A sintomatologia da DP é decorrente da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos do eixo nigroestriatal, constituído pela inervação dos neurônios da substância negra do núcleo caudado e do putâmen, que é considerada um marco patológico da DP. A origem dessa degeneração neuronal ainda não é estabelecida, mas estudos mostram que a DP está significativamente associada a fatores genéticos, eventos moleculares e celulares, incluindo estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, mecanismos pró-apoptóticos e inflamatórios (REALE; IARLORI; THOMAS; GAMBI *et al.*, 2009).

Uma característica importante da DP é o acúmulo de agregados insolúveis da proteína  $\alpha$ -sinucleína nos tecidos cerebrais. Tais agregados formam os corpos de Lewy, que são considerados uma característica histopatológica definidora da doença (GOEDERT, 2001). A precisão do diagnóstico com essa marcação só acontece pós-mortem, quando é possível fazer essa investigação no cérebro dos pacientes, que já apresentavam sintomas característicos e responsividade ao tratamento de reposição dopaminérgica.

A formação de corpos de Lewy interfere na integridade das conexões entre os

neurônios do eixo nigroestriatal, gera inflamação pela reatividade glial e ocasiona a morte progressiva dos neurônios dessa região (TANSEY; ROMERO-RAMOS, 2019). As micróglia identificam os agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína como corpos estranhos e na tentativa de fagocitar o agente estressor ocorre aumento de reatividade resultando em um processo neuroinflamatório exacerbado e neurodegeneração (GAO; KOTZBAUER; URYU; LEIGHT *et al.*, 2008).

### **1.7 TLR4 na neuroinflamação e neurodegeneração**

A expressão de TLR4 foi evidenciada em neurônios e glia em condições saudáveis (TANG; ARUMUGAM; XU; CHENG *et al.*, 2007; TANG; LATHIA; SELVARAJ; JO *et al.*, 2008), embora o TLR4 tenha expressão mais elevada na micróglia do que outros tipos de células do SNC (LEHNARDT; MASSILLON; FOLLETT; JENSEN *et al.*, 2003). Os neurônios expressam diferentes TLRs, incluindo os TLRs 1-9, que possuem papel na homeostase neuronal (VAN NOORT; BSIBSI, 2009)(VAN NOORT; BSIBSI, 2009). Já as micróglia expressam TLRs preferencialmente localizados em regiões próximas à vascularização, como meninges e órgãos circunventriculares, refletindo assim seu papel na defesa imunológica cerebral. Como a reatividade microglial é amplamente controlada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), o TLR4 está implicado na neurotoxicidade mediada pela micróglia que ocorre em muitas patologias cerebrais. Os astrócitos também expressam TLRs e respondem aos seus agonistas liberando moléculas pró-inflamatórias, mas em menor extensão do que a micróglia (GASIOROWSKI; BROKOS; ECHEVERRIA; BARRETO *et al.*, 2018).

Quando superestimulada, a micróglia causa estresse oxidativo e dano a outras células do SNC, mais notavelmente neurônios (BLOCK; ZECCA; HONG,

2007), sendo um dos fatores relacionados com a morte de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson. Foi sugerido que a ativação do ciclo TLR/EROs/ERNs é uma característica comum presente em muitos distúrbios associados aos hábitos e condições da vida moderna, incluindo neurodegeneração (LUCAS; MAES, 2013).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para entender especificamente como é a expressão e ativação de TLR4 neuronal em patologias do SNC (BUCHANAN; HUTCHINSON; WATKINS; YIN, 2010; TANG; LATHIA; SELVARAJ; JO *et al.*, 2008; VAN NOORT; BSIBSI, 2009). Sabe-se, por exemplo, que TLR4 tem expressão aumentada em neurônios expostos ao peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) ou ao produto de peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal (4-HNE), e que o TLR4 é um receptor essencial na apoptose neuronal induzida por essas moléculas (TANG; LATHIA; SELVARAJ; JO *et al.*, 2008). Estudos desenvolvidos em modelos animais mostram que LPS administrado sistemicamente é capaz de ligar-se ao receptor TLR4 na micróglia e induzir ativação pró-inflamatória da mesma, resultando em dano neural (LEHNARDT; MASSILLON; FOLLETT; JENSEN *et al.*, 2003).

Foi observado em animais nocaute para TLR4 que a indução de modelo de DP com MPTP produziu uma microgliose significativamente menor em relação aos animais selvagens, caracterizada pela expressão diminuída de Iba-1 e MHC-II (NOELKER; MOREL; LESCOT; OSTERLOH *et al.*, 2013). Estudos paralelos neste mesmo modelo mostram redução de discinesia, além de menor transcrição e expressão de AP-1 na substância negra, um fator de transcrição que regula processos como proliferação e apoptose; adicionalmente, resultados de imunofluorescência revelaram que a expressão de AP-1 é menor em neurônios positivos para TH e em astrócitos positivos para GFAP nos camundongos TLR4-

nocautes tratados com de MPTP em relação aos animais selvagens (ZHAO; WANG; CAO; ZHANG *et al.*, 2016).

### **1.8 RAGE na neuroinflamação e neurodegeneração**

Em nível de SNC, o RAGE é expresso por células endoteliais, neurônios e células gliais. Sua participação direta na neuroinflamação é reforçada: ele atua tanto no transporte de compostos através da BHE, como na atividade e metabolismo de neurônios, astrócitos e células da micróglia (JURANEK; DAFFU; WOJTKIEWICZ; LACOMIS *et al.*, 2015). A expressão de RAGE se encontra aumentada em demência com corpos de Lewy, uma condição presente na DP (DALFO; PORTERO-OTIN; AYALA; MARTINEZ *et al.*, 2005). Em pacientes com DP, há um acúmulo de AGEs nos corpos de Lewy em tecidos cerebrais, possivelmente devido à glicação das proteínas desempacotadas que constituem esses aglomerados (MUNCHAU; BHATIA, 2000). O aumento na glicação de proteínas é frequente em condições de estresse, alta disponibilidade de glicose e de aglomerados de proteínas desempacotadas (I; C, 2021; OTT; JACOBS; HAUCKE; NAVARRETE SANTOS *et al.*, 2014).

Além disso, foi demonstrado que a proteína S100B, agonista de RAGE, apresenta-se em níveis elevados tanto no líquido cefalorraquidiano como na substância negra de pacientes com DP (SATHE; MAETZLER; LANG; MOUNSEY *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram observados com animais nocautes para S100B, nos quais a indução de DP com MPTP produziu uma microgliose significativamente menor, com diminuída expressão de RAGE e de TNF- $\alpha$ , e consequente diminuição da perda celular dopaminérgica. Uma investigação epidemiológica avaliando três diferentes polimorfismos do gene do RAGE

(-374T/A,-429T/C e G82S) em uma população chinesa do grupo étnico Han (sudeste da Ásia), indicou que a presença do alelo -429C está associada a uma menor susceptibilidade à DP (GAO; TENG; LIU; HAN *et al.*, 2014).

A isoforma de RAGE solúvel (sRAGE) também é um dos mecanismos de bloqueio fisiológico de RAGE, atuando como antagonista ao evitar que outros ligantes interajam com o receptor. Desta forma, o sRAGE é capaz de inibir a ativação da sinalização do RAGE (ZHANG; BUKULIN; KOJRO; ROTH *et al.*, 2008), atribuindo-o potencial terapêutico em doenças neurodegenerativas (CHEN; WALKER; SCHMIDT; ARANCIO *et al.*, 2007) Recentemente, nosso grupo observou que o bloqueio sistêmico do RAGE é capaz de proteger o estriado de danos causados pela injeção sistêmica de LPS, reduzindo a reatividade microglial e astrocitária bem como parâmetros de dano neuronal (GASPAROTTO; RIBEIRO; BORTOLIN; SOMENSI; FERNANDES *et al.*, 2017). Este efeito foi observado ocorrer de forma aguda (até 24 horas após a indução de inflamação) e o bloqueio de RAGE inibiu a ativação sistêmica de NF-κB e liberação de citocinas pró-inflamatórias na circulação.

Os trabalhos desenvolvimentos em nosso grupo demonstraram que a inibição do RAGE reverte a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra, induzida tanto pelo LPS sistêmico em tempos mais prolongados (GASPAROTTO; RIBEIRO; BORTOLIN; SOMENSI; FERNANDES *et al.*, 2017), bem como pela toxina 6-OHDA (6-hidroxidopamina), um modelo mais específico da denervação dopaminérgica associada à DP (GASPAROTTO; RIBEIRO; BORTOLIN; SOMENSI; RABELO *et al.*, 2017).

## **1.9 Crosstalk de RAGE e TLR4**

A sinalização de TLRs pode requerer co-receptores e/ou oligomerização para

uma transdução de sinal adequada (VOGEL; FITZGERALD; FENTON, 2003). Paralelamente, sabe-se que o RAGE exerce maior ativação na célula quando interage com outras moléculas, formando uma homodimerização (ZONG; MADDEN; WARD; MOONEY *et al.*, 2010). Esta oligomerização pode ser estendida para mais de duas moléculas, aumentando o local de interação, criando uma área maior capaz de interagir com proteínas maiores, como a HSP70 (GRUNWALD; LIGABUE-BRAUN; SOUZA; HEIMFARTH *et al.*, 2016), essencial para a transdução de sinal intracelular (SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a estimulação de TLR4 e RAGE regulam vias de sinalização em comum, que envolvem a ativação de NF- $\kappa$ B para induzir a expressão gênica (JUDY R. VAN BEIJNUM, 2008). Os TLRs podem sinalizar via MyD88, IRAK e TRAF para NF- $\kappa$ B, bem como via Rac1 e PI3K, ERK1/2 e p38 MAPK. O RAGE, por sua vez, pode ativar Rac1 e CDC42, assim como o Ras e MAPK; além disso, o RAGE fosforilado também se liga às proteínas adaptadoras TIRAP e MyD88, transduzindo sinal para moléculas a jusante (SAKAGUCHI; MURATA; YAMAMOTO; ONO *et al.*, 2011). Dessa forma, além do processo de feedback positivo desencadeado pela expressão de RAGE, a ativação de TLR4 também modula a sua expressão (ZHONG; LI; ZHOU; JIANG *et al.*, 2020). Esse mecanismo desencadeia uma resposta inflamatória intensa e prolongada, capaz de danificar células e tecidos, levando ao desenvolvimento de doenças (LUCAS; MAES, 2013; SCHMIDT; YAN; YAN; STERN, 2001).

Apesar da atuação consistente de RAGE em processos pró-inflamatórios, sabe-se que moléculas ligantes deste receptor em associação com opsoninas (como é o caso de HMGB1 e C1q), são capazes de desencadear respostas anti-inflamatórias em macrófagos, que se diferenciam em um perfil M2 (PRANTNER;

NALLAR; VOGEL, 2020). Esse é um dado interessante, uma vez que nos revela a complexidade de respostas imunológicas reguladas por este receptor em contextos fisiopatológicos. Além disso, a ligação dos agonistas a apenas um receptor não explica todos os efeitos causados na célula; nosso grupo realizou um trabalho em que a atenuação de RAGE foi capaz de reduzir significativamente a fosforilação de ERK1/2, ativação de NF- $\kappa$ B e expressão de citocinas pró-inflamatórias, porém não foi capaz de modular a ativação de p38 MAPK e genes anti-inflamatórios (SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017). Postula-se uma possível dependência mútua entre RAGE e TLR4 para gerar respostas celulares especializadas e mais eficientes (BONGARZONE; SAVICKAS; LUZI; GEE), moduladas por seus agonistas de diferentes maneiras, essenciais para o desfecho da resposta imunológica periférica e central.

A contribuição relativa dos diferentes receptores e ligantes é provável que difira entre os tipos de células e condições patológicas (DILLON; AGRAWAL; BANERJEE; LETTERIO *et al.*, 2006; FRODERMANN; CHAU; SAYEDYAHOSSEIN; TOTH *et al.*, 2011), capaz de modular a intensidade da resposta imunológica. Esta interação, frente a estímulos inflamatórios, pode desencadear diferentes desfechos de eventos celulares, de forma sistêmica, tanto periférica quanto em nível de SNC.

## **2 Justificativa**

Os receptores RAGE e TLR4 estão envolvidos na regulação de respostas imunológicas e inflamatórias em diversas patologias. Eles regulam muitas vias celulares em comum e a sinalização de ambos receptores leva a uma ativação inflamatória sustentada, característica de doenças crônicas, como é o caso de neurodegenerações, incluindo a DP.

Apesar de a DP não ser comumente considerada uma doença relacionada ao sistema imune, há claros componentes de resposta pró-inflamatória durante a neurodegeneração na DP que precisam ser estabelecidos, a fim de compreender o processo de neurodegeneração e, dessa forma, conseguir evitá-lo. O mecanismo bioquímico que leva à morte dos neurônios dopaminérgicos na DP ainda não foi elucidado, portanto os tratamentos disponíveis focam na sintomatologia. A administração de L-DOPA é empregada para repor os níveis de dopamina e de agonistas de receptores de dopamina para ativar neurônios estriatais; no entanto, com a contínua degeneração dos neurônios dopaminérgicos, tais tratamentos perdem a efetividade com o tempo. Portanto, uma ação estratégica para o combate à DP é o entendimento dos mecanismos básicos da inflamação e neuroinflamação, o que permitirá a aplicação de abordagens terapêuticas focadas no combate à neurodegeneração, que é a causa dos sintomas característicos da DP.

### **3 Objetivos**

O objetivo geral da Tese foi de esclarecer o papel do RAGE e TLR4 na ativação da resposta imunológica e entender como eles estão envolvidos na DP.

#### **3.1 Objetivos específicos de cada capítulo**

##### **Capítulo I:**

**Objetivo 1:** Avaliar os níveis sorológicos dos padrões moleculares associados a dano (DAMPs) que são ligantes de RAGE e TLR4, em pacientes diagnosticados com DP;

**Objetivo 2:** Avaliar o perfil inflamatório dos pacientes com PD ao longo do tempo, através dos níveis de citocinas e quimiocinas séricas;

**Objetivo 3:** Correlacionar DAMPs/Ligantes de RAGE/TLR4 e citocinas séricas com características clínicas específicas da DP em diferentes subtipos e estágios clínicos;

##### **Capítulo II:**

**Objetivo 1:** Caracterizar, utilizando um protocolo de indução de denervação nigroestriatal (injeção intracraniana de 6-OHDA), o papel inflamatório de TLR4 na doença de Parkinson e sua relação com a morte neuronal, em modelo animal nocaute para o gene do *TLR4*. Ainda, avaliar como se encontra a expressão de RAGE nesse modelo e como o TLR4 é capaz de influenciar sua expressão;

**Objetivo 2:** Comparar os efeitos do modelo de denervação dopaminérgica em machos e fêmeas e elucidar o efeito dos receptores TLR4 e RAGE neste contexto;

**Objetivo 3:** Avaliar o papel do TLR4 e RAGE na evolução dos déficits

motores, cognitivos e comportamentais induzidos pelo modelo de denervação dopaminérgica;

### **Capítulo III**

**Objetivo 1:** Caracterizar as vias de sinalização ativadas pelos agonistas de RAGE e TLR4 em modelo celular de macrófagos humanos, e avaliar a função de cada receptor na modulação das respostas celulares inflamatórias;

**Objetivo 2:** Caracterizar o envolvimento de RAGE e TLR4 na polarização de macrófagos para os perfis pró e anti-inflamatório.

## PARTE II

#### **4 Resultados**

Os resultados desta tese estão dispostos em três capítulos: o Capítulo I contém resultados de um estudo clínico apresentados em forma de artigo científico, em fase final de preparação. O Capítulo II contém resultados de um estudo *in vitro* em forma de artigo científico, publicado no periódico *Neurochemistry International*, acrescidos de resultados complementares não publicados. No Capítulo III estão apresentados os resultados preliminares de um estudo *in vitro* com cultura celular de macrófagos.

## 4.1 Capítulo I

### **Approaching promising markers for Parkinson's disease using serum cytokines and DAMPs along with clinical parameters**

Artigo em fase final de preparação para submissão no periódico

*Parkinsonism & Related Disorders*

1 **Approaching promising markers for Parkinson's disease using serum cytokines**  
2 **and DAMPs along with clinical parameters**

3 Nauana Somensi<sup>1</sup>, Nayron Medeiros Soares <sup>2,3</sup>; Marcelo Fachetti<sup>4</sup>, Juciano  
4 Gasparotto<sup>5</sup>, Carolina Saibro Girardi<sup>1</sup>, Camila Tiefense Ribeiro<sup>1</sup>, Gabriela Magalhães  
5 Pereira<sup>2,3</sup>, Ana Carolina Leonardi Dutra <sup>2,3</sup>; Nathalie Ribeiro Artigas<sup>2,3</sup>, Júlia Schneider  
6 Krimberg<sup>1,6</sup>, Bruno Elkfury Monticelli<sup>3,6</sup>, José Cláudio Fonseca Moreira<sup>1</sup>, Artur  
7 Francisco Schumacher-Schuh<sup>2,3</sup>, Rosa Maria Martins de Almeida<sup>6</sup>, Arlete Hilbig<sup>7,8</sup>,  
8 Carlos Roberto de Mello Rieder <sup>7,8</sup>; Daniel Pens Gelain<sup>1</sup>

9  
10 <sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS),  
11 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Rio Grande do  
12 Sul, Brazil.

13 <sup>2</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
14 (UFRGS). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

15 <sup>3</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Porto Alegre, Rio Grande do  
16 Sul, Brazil.

17 <sup>4</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina  
18 (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

19 <sup>5</sup> Instituto de Biociências, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Alfenas,  
20 Minas Gerais, Brazil.

21 <sup>6</sup> Instituto de Psicologia, Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências  
22 e Comportamento (LPNeC), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto  
23 Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

24 <sup>7</sup> Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Ciências da Saúde  
25 de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

26 <sup>8</sup> Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio  
27 Grande do Sul, Brazil.

28

29

30 **Abstract**

31 Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative  
32 disease. Typical symptoms include movement alleviation, tremor or stiffness, and non-  
33 motor symptoms such as depression, REM sleep disorder and constipation. Peripheral  
34 inflammation plays an essential role in disease initiation and progression, exacerbating  
35 the neuroinflammation in the central nervous system (CNS) and synergistically driving  
36 neurodegeneration. Immune system respond to danger-associated molecular patterns  
37 (DAMPs) trough pattern recognition receptors (PRRs), such as TLR4 and RAGE,  
38 producing cytokine and chemokine during the stressor and inflammatory process;  
39 these processes stimulates peripheral and inflammation in PD. However, the  
40 inflammatory status and course of PD are highly variable, and there are no established  
41 prognostic biomarkers. We evaluate serum cytokines, chemokines, and some DAMPs  
42 that are RAGE and TLR4 agonists in parallel with clinical parameters of PD, including  
43 motor and NMS. Blood samples were collected from PD patients and healthy controls  
44 at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Serum parameters were  
45 measured by multiplex and ELISA immunoassay. Bioinformatics analysis was  
46 performed to identify predictors of disease and cluster patients by serum profile.  
47 Serum DAMPs and RAGE ligands were lower in PD when compared to healthy  
48 controls (HC) and kept decaying over time. At the same time, PD patients present an  
49 anti-inflammatory profile of cytokines that turn to pro-inflammatory after a year, even  
50 without progression of disease staging. We also observed two distinct clusters of PD

51 patients according to serum profiles, wherein DAMPs/RAGE ligands vary inversely to  
52 cytokines. Together, the 12 serum markers analyzed by the machine learning model  
53 (HMGB1, HSP70, S100B, 4-HNE, CML, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10)  
54 were able to predict the PD in HY scale 2.

55       Keywords: Parkinson's Disease, serum marker, inflammation, cytokines,  
56 DAMPs

57

## 58       **Introduction**

59       Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative  
60 disease, and according to the Global Burden of Disease study, 6.2 million patients  
61 lived with PD in 2016 and this frequency will double by 2040 [1]. The main  
62 neuropathological finding is the progressive loss of dopaminergic neurons in the  
63 midbrain and  $\alpha$ -synuclein-containing Lewy bodies in the substantia nigra [2]. Currently,  
64 the major factors in diagnosing this disease are the appearance of typical symptoms,  
65 such as movement alleviation, tremor or stiffness, and an important improvement  
66 when initiating treatment with L-dopa, which restores lost dopamine.

67       Besides the characteristic motor changes in PD, the patients present non-motor  
68 symptoms (NMS) that include depression, REM sleep disorder, hyposmia and  
69 constipation [3, 4]. However, the NMS are present in prodromal PD and are associated  
70 with the disease only after the appearance of motor symptoms, when the diagnosis is  
71 established. At this moment, 50-70% of dopaminergic neurons have already died [5].  
72 With the progression of neurodegeneration, other NMS become more evident, such as  
73 cognitive impairment, urinary symptoms and dementia [6].

74       The cause of neurodegeneration in PD is not entirely understood. Accumulating  
75 evidence implicates genetic and environmental factors and mitochondrial dysfunction,

76 inflammation, oxidative stress, and impaired autophagy [7]. Peripheral inflammation  
77 plays an essential role in disease initiation and progression, exacerbating the  
78 neuroinflammation in CNS and synergistically driving neurodegeneration [8]. Some  
79 changes were found in peripheral immune functions in patients with PD, such as  
80 decreased lymphocytes population and dysregulation in the serum cytokine network  
81 [9, 10].

82         Cytokine and chemokine respond to danger-associated molecular patterns  
83 (DAMPs) during stressor and inflammatory processes [11], which are recognized by  
84 pattern recognition receptors (PPR), that include the receptor for advanced glycation  
85 end products (RAGE) and Toll-like receptor 4 (TLR4). They are multiligand proteins  
86 that interact with a broad spectrum of ligands: RAGE binds several advanced glycation  
87 end-products (AGEs), S100 family proteins including S100B, heat shock proteins  
88 (HSP70), high mobility box group 1 (HMGB-1), peptide amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ), bacterial  
89 lipopolysaccharide (LPS) [12]; TLR4 also recognizes HMGB1, HSP70, S100 family  
90 proteins and LPS. In addition, RAGE and TLR4 play crucial roles in developing many  
91 human disorders such as neurodegenerative conditions, including Parkinson's disease  
92 [13, 14]. In addition, RAGE is responsible for the propagation of systemic inflammation  
93 in the brain and the development of dopaminergic denervation [15, 16].

94         The inflammatory status and course of PD are highly variable, and there are no  
95 established prognostic biomarkers. We evaluate serum cytokines, chemokines, and  
96 some DAMPs that are RAGE agonists in parallel with clinical parameters of PD,  
97 including motor and NMS. Blood samples were collected from PD patients and healthy  
98 controls at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Serum parameters  
99 were measured by multiplex and ELISA immunoassay. Bioinformatic analysis was  
100 performed to identify predictors of disease and cluster patients by serum profile.

101           **Materials and Methods**

102           *Case selection and control group*

103           A total of 96 patients were diagnosed with PD according to the London Brain  
104 Bank [17] at the Movement Disorders Outpatient Clinic of the Hospital de Clínicas de  
105 Porto Alegre (HCPA). The patients were accompanied longitudinally between March  
106 2017 and March 2020. All patients were under treatment (dopaminergic or other) at  
107 sample collection. In addition, 57 healthy control (HC) volunteers, mostly the patients'  
108 escorts, were also evaluated during the same period as the normal controls.

109           The exclusion criteria for both groups were as follows: (1) had associated  
110 neurological comorbidities; (2) had physical limitations of trauma-orthopedic or  
111 rheumatological origin; (3) severe and uncorrected visual changes that make the  
112 research difficult; (4) chemical or alcohol dependence. Particularly in the PD group, an  
113 exclusion criterion was to use Deep Brain Stimulation – DBS. All research subjects or  
114 their family members signed a consent form before participating in the study (involving  
115 data and blood sample collection).

116           The research protocol of this study was approved by the hospital Ethics  
117 Committee 170212 with certificate number 67574217.8.0000.5327. In addition, all  
118 subjects (or their caregivers) signed a written informed consent to participate in the  
119 study.

120

121           *Clinical assessments*

122           All participants were evaluated by baseline assessments that included  
123 comorbidities (SAH, depression, diabetes, cancer), blood pressure and BMI (body  
124 mass index). In addition, they participated in questionnaires to access some clinical  
125 assessments: symptom severity, including motor and NMS, by Movement Disorder

126 Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-  
127 UPDRS) [18]; Hoehn and Yahr scale (YH), that indicates disease staging; cognitive  
128 assessment by MoCA [19]; depression by Beck II depression inventory (BDI) [20] and  
129 sleep assessment by Parkinson's disease sleep scale (PDSS) [21]. MoCA, BDI and  
130 PDSS also evaluated in HC participants.

131 We chose to evaluate some specific tests of MDS-UPDRS and the PDSS  
132 individually. The MDS-UPDRS I is relative to non-motor experiences of daily living,  
133 including evaluation of mental activity, behavior and mood, wherein MDS-UPDRS I.II  
134 represents psychosis and MDS-UPDRS I.XI constipation; MDS-UPDRS II include  
135 self-evaluation of activities of daily living, involving motor activities; MDS-UPDRS III  
136 evaluates the motor function and MDS-UPDRS IV the motor complications, wherein  
137 MDS-UPDRS IV.I is respective to dyskinesia. The PDSS 5 relates to fidgeting in bed;  
138 PDSS 6, disturbing dreams at night; PDSS 7, disturbing hallucinations at night (seeing  
139 or hearing something you have been told does not exist).

140

#### 141 *Sample collection and detection*

142 Each participant had 2 mL of peripheral venous blood collected. Tubes were  
143 centrifuged at 2500g for 10 minutes, and serum was aliquoted and frozen at -20°C up  
144 to a month, followed by -80°C storage until analysis.

145 The clinical and blood parameters analyzed of PD patients were called "PD  
146 evaluation" (PD<sub>E</sub>). In addition, the patients were longitudinally evaluated,  
147 approximately one year after evaluation, for clinical assessments and also submitted  
148 to a new blood sample collection, which was called "revaluation" (PD<sub>R</sub>).

149 The cytokines in the serum of PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub> were measured with multiplex  
150 assays (Thermo Fischer, Cat. No. LHC6004 and EPXS090-12199-901, respectively).

151 The sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detected some serum  
152 proteins in PD<sub>E</sub>: α-synuclein, amyloid-β42 and CCL5/RANTES. The protein content  
153 was calculated according to the standard curve, expressed in concentration (pg/mL or  
154 ng/mL). In addition, indirect ELISA was performed on HSP70, HMGB1, S100B, 4-  
155 Hydroxynonenal (4-HNE), Carboxymethyl Lysine (CML) and Nitrotyrosine. The  
156 proteins are expressed in % relative to the mean fluorescence of HC. The fabricant  
157 information, antibodies and sample dilutions used in ELISA assays are included in  
158 **Supplemental Table 1.**

159

#### 160 *Sample selection for the machine prediction model*

161 The PD<sub>E</sub> data containing 96 Parkinson's patients and 20 analyzed serum  
162 variables were filtered. First, we eliminated six serum variables that contained less  
163 than 50% of the 50% analysis values and then 34 patients in the same situation. Thus,  
164 the dataset for such studies contains 62 Parkinson's patients and 14 serum variables.

165 The imputation of missing (unmeasured) data was performed using the k-  
166 Nearest Neighbors algorithm with the weighted mean of the five closest patients as the  
167 aggregation function of each variable. For this, we use the kNN function of the VIM  
168 package.

169

#### 170 *Importance of variables*

171 To generate and evaluate the models and analyze the importance of variables,  
172 we divided/separated the dataset into a training and validation group (we used cross-  
173 validation) containing 80% of the samples (50 patients) and a test group containing  
174 20% of the samples (11 patients). Then, we used the Recursive Feature Elimination  
175 (RFE) algorithm in training set with the functions of the "Random Forest" algorithm to

176 fit the models, predictions and importance of variables, with an external resampling  
177 method of repeated cross-validation, with ten folds (folds) and five repetitions. In the  
178 RFE function, we used the size parameter from 1 to 14 and; the "rfeControl" and "rfe"  
179 functions from the Caret package looked for the optimal variables in all possible  
180 combinations of sets of variables (i.e., just one variable, two variables, ..., 14  
181 variables).

182

### 183 *Clustering analysis*

184 We evaluated if PD<sub>E</sub> patients separate into different groups according to the  
185 profile of serum markers. Clustering analysis was assessed by the bNbClust package  
186 that evaluated 24 indices to determine the number of clusters.

187

### 188 *Statistical Analysis*

189 SPSS20.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL) was used to analyze the data and  
190 GraphPad 8.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) to create the graphs. We  
191 first performed Levene's test to determine the homogeneity of variances and the  
192 Shapiro-Wilk test to verify the normality of samples. The outliers were removed for  
193 analysis. Next, we analyzed HC and PD<sub>E</sub> groups with independent T-test to compare  
194 means of continuous variables with normal distribution and Mann-Whitney U test to  
195 compare medians of continuous variables with non-normal distributions; Chi-square or  
196 Fisher exact tests were used for categorical variables. Longitudinal samples were  
197 analyzed with paired-samples T-test or related samples by Wilcoxon test in order to  
198 compare PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub> means or medians, respectively. Pearson or Spearman tests  
199 were used for correlation analysis. Finally, ANOVA evaluated the influence of more  
200 than one categorical or continuous variable, followed by Tukey's posthoc. A  $p < 0.05$

201 was considered statistically significant.

202

## 203 **Results**

### 204 *Demographic and general information of PD and HC groups*

205 The general demographic and disease-associated information of patients with  
206 PD (PD group, n=96) and HC participants (control group, n=56), including age group,  
207 gender, body mass index (BMI), comorbidities, blood pressure, and familial history of  
208 parkinsonism are shown in **Table 1**. The PD patients were older ( $p=0.016$ ), had lower  
209 BMI ( $p=0.037$ ) and had a higher incidence of diabetes ( $p=0.037$ ) compared to HC.  
210 Interestingly, men with PD present lower diastolic pressure than HC ( $p=0.049$ ).

211 Clinical tests were applied to PD patients in both evaluation (PD<sub>E</sub>) and re-  
212 evaluation after a year (PD<sub>R</sub>) to assess symptom severity (UPDRS), cognitive  
213 assessment (MoCA), depression (BDI), sleep assessment (PDSS) and disease stage  
214 (HY). In addition, the control group also participated in questionnaires of clinical  
215 assessments, unless the UPDRS and HY, which are exclusively for PD patients. The  
216 results are shown in **Table 2**.

217 Few changes were observed in PD patients (PD<sub>E</sub>) regarding the control group  
218 (HC) or itself over time (PD<sub>R</sub>). PD<sub>E</sub> patients reported better performance in disturbing  
219 dreams than the control group ( $p= 0.024$ ); however, it worsened over time ( $p= 0.010$ ,  
220 compared to PD<sub>R</sub>). We observed alterations over time in psychosis (UPDRS I.II,  $p=$   
221  $0.044$ ), in which PD patients have an improvement in this behavior.

222

### 223 *Serum analytes measurements*

224 We analyzed the serum of controls and PD patients to detect cytokines, ligands  
225 of RAGE and prion-like proteins (**Table 3, Figure 1**). IL-6, 4-HNE, CML and CCL5

226 decreased in PD<sub>E</sub> compared to HC ( $p= 0.005$ ,  $p= <0.0001$ ,  $p=0.043$  and  $p=0.0101$ ,  
227 respectively). When analyzed longitudinally, comparing PD<sub>R</sub> to PD<sub>E</sub>, the IL-6, IL-10  
228 and HSP70 increased ( $p= <0.0001$ ,  $p= <0.019$  and  $p=0.015$ , respectively) and S100B,  
229 4-HNE and CML decreased ( $p= <0.023$ ,  $p= <0.0001$  and  $p= <0.0001$ , respectively).

230 To further investigate the cytokine profile in PD, we also compared the ratios of  
231 pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines (**Figure 2**). PD<sub>E</sub> patients showed  
232 lower TNF- $\alpha$ /IL-4 ( $p=0.009$ ), IL-6/IL-4 ( $p=0.002$ ) and IL-6/IL-10 ( $p=0.002$ ) in  
233 comparison to HC, suggesting a bias toward a Th2 profile. However, this profile  
234 changed across the time, as we observed an increase in TNF- $\alpha$ /IL-4 ( $p=0.010$ ), IL-  
235 6/IL-4 ( $p=0.001$ ) and IL-6/IL-10 ( $p=0.002$ ) ratios in PD<sub>R</sub>.

236 We stratified the samples according to PD disease stages by HY scale (I, II, III,  
237 IV). We only found differences in serum IL-2 of PD<sub>E</sub>, a decrease between phases III  
238 and IV ( $p=0.017$ , one-way ANOVA followed by Tukey's, data not shown).

239

#### 240 *Correlation analysis*

241 We evaluated the correlations of serum analytes each other and with clinical  
242 parameters in both evaluations (PD<sub>E</sub>) (**Supplemental Table 2 and 3**) and re-  
243 evaluations (PD<sub>R</sub>) (**Supplemental Table 4 and 5**). RAGE ligands correlated with each  
244 other (**Figure 3 A, C and D; Supplemental Table 2 and 4**) in all groups. Also, TNF- $\alpha$ ,  
245 IL-1 $\beta$ , IL2, IL4 and IL-10 correlate (**Figure 3 B, D and F; Supplemental Table 2 and**  
246 **4**). However, we did not observe significant correlations between these groups.

247 Because diabetes incidence and depression (BDI) prevalence was higher and  
248 BMI was lower in PD, we evaluate its correlations with serum parameters  
249 (**Supplemental Table 2**). Diabetes negative correlate with nitrotyrosine ( $r=-0.312$   
250  $p=0.06$ ), CML ( $r= -0.295$ ,  $p=0.010$ ), 4-HNE ( $r=0.365$ ,  $p=0.001$ ) and positive correlates

251 with IL-2 ( $r=0.269$ ,  $p=0.036$ ). BDI is positively correlated with HMGB1 ( $r=0.254$ ,  
252  $p=0.034$ ) and negatively correlated with IL-10 ( $r=-0.0307$ ,  $p=0.020$ ). In turn, BMI has  
253 positive correlation with IL-10 ( $r=0.273$ ,  $p=0.032$ ) and negative correlation with HSP70  
254 ( $r=-0.281$ ,  $p=0.016$ ) (**Supplemental Table 3**). Since PD is significantly associated with  
255 aging process and PD were older than HC, we evaluated correlation of age with serum  
256 markers. In PD<sub>E</sub>, age is negative correlated with HSP70 ( $r=-0.331$ ,  $p=0.004$ ), CML ( $r=-$   
257  $0.243$ ,  $p=0.034$ ) and nitrotyrosine ( $r=-0.344$ ,  $p=0.002$ ) (**Supplemental Table 3**). In  
258 PD<sub>R</sub>, AGE is positive correlated to IL-6 ( $r=0.353$ ,  $p=0.035$ ) (**Supplemental Table 2**).

259       Peripheral inflammation plays a role in the development of preclinical non-motor  
260 symptoms, so we also evaluated its correlations with serum markers. We found  
261 negative correlation of anti-inflammatory cytokine IL-4 with psychosis (UPDRS I.II,  $r=-$   
262  $0.257$ ,  $p=0,047$ ), constipation (UDPRS I.IX,  $r=-0.256$ ,  $p=0,048$ ), UPDRS III non-motor  
263 ( $r=-0.379$ ,  $p=0.003$ ) and positive correlation with disturbing dreams (PDSS6,  $r=0.266$   
264  $p=0.028$ ), present in **Supplemental Table 3**.

265       When analyzing the variables of staging and classification of the disease in PD<sub>E</sub>  
266 (Supplemental Table 3), we found a correlation of HY just with IL-10 ( $r=-0.367$ ,  
267  $p=0.003$ ); total UPDRS correlates negatively with IL-4 ( $r=-0.399$ ,  $p=0.002$ ) and IL-10  
268 ( $r=-0.276$ ,  $p=0,031$ ) and positively with nitrotyrosine ( $r=0.238$ ,  $p=0,040$ ). We did not  
269 find a correlation of those variables in a re-evaluation of patients (PD<sub>R</sub>, **Supplemental**  
270 **Table 5**).

271

#### 272       *Algorithm prediction of PD*

273       In the prediction of the “HY” classification, a set of 12 variables (HMGB1,  
274 HSP70, S100B, 4HNE, CML, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ ) showed the  
275 highest accuracy values in the training set (Accuracy = 0.53 and  $\kappa$  = 0.03). Six

276 variables have positive importance (Accuracy = 0.45 and  $\kappa$  = 0.08) in descending  
277 order: IL-4, Nitrotyrosine, S100B, IFN- $\gamma$ , HSP70, IL-2 and TNF- $\alpha$  (**Figure 4A**).

278 In the regression prediction of "total UPDRS", the set of all 14 variables  
279 (HMGB1, HSP70, S100B, 4HNE, CML, Nitrotyrosine, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-  
280 10, IFN- $\gamma$  and amyloid- $\beta$ ) was the one that presented the lowest values of Root Mean  
281 Squared Error (RMSE) and Mean Absolute Error (MAE) in the training set (RMSE  
282 (SD)= 33.96 (7.55), MAE (SD) = 28.99 (6.7)). Seven variables have positive  
283 importance set (RMSE =25.13, MAE = 19.44), in descending order: 4-HNE, IL-6,  
284 HMGB1, IL-4, S100B and IL-10 (**Figure 4B**).

285

#### 286 *Clustering analysis*

287 We evaluated our dataset (61 Parkinson's patients and 14 serum variables) to  
288 verify if the serum variables defined any groups/clusters and if these clusters  
289 presented any difference regarding the variables "Hoehn and Yahr" and "UPDRS  
290 total". According to the distinct serum profile among patients, we found two and three  
291 clusters that showed the highest concordance indices, 8 and 7, respectively (**Figure**  
292 **5**). In the analysis of 2 and 3 clusters, there was no difference in "HY stage" and "Total  
293 UPDRS" between the clusters (t-test of 2 clusters:  $p$ = 0.587 and  $p$ =0.528,  
294 respectively; 3 clusters: adjusted Tukey's test  $p$ =0.552 and  $p$ =0.887, respectively).

295 Analyzing two clusters, cluster 1 has 43 patients with increasing RAGE agonists  
296 ( $p$ <0.001), decreased IL-6 ( $p$ =0.019), and IL-10 ( $p$ =0.009) compared to cluster 2,  
297 containing 18 patients (**Figure 5 A and B**). Analyzing three clusters, cluster 1 contains  
298 26 patients with lower RAGE agonists in serum compared to clusters 2 and 3 and  
299 lower IL-2 ( $p$ =0.039) compared to cluster 2. Cluster 2 has 28 patients, and Cluster 3  
300 has eight patients with lower amyloid- $\beta$  and higher IL-10 serum levels than clusters 1

301 and 2 (**Figures 5 C and D**).

302

### 303 **Discussion**

304 The microenvironment of the central and peripheral immunologic system is  
305 modified in PD during the pathological process; however, it is not clear if these  
306 changes are secondary to neurodegeneration or if they may be playing an active role  
307 in this process (KOMOHARA; DEPARTMENT OF CELL PATHOLOGY; OHNISHI;  
308 DEPARTMENT OF CELL PATHOLOGY *et al.*). The interplay between CNS and  
309 periphery is consistent with Braak's theory [22]; both neural and humoral pathways  
310 mediate communication from the peripheral site to the brain [8]. Also, change in the  
311 brain and BBB could affect immune cells, and these effects could be transferred to the  
312 peripheral immune system [23].

313 RAGE drives the propagation of systemic inflammation to the brain [15, 16],  
314 mediating natural proteins transport through BBB [24] and also between neurons [25].  
315 The interaction of RAGE with its ligands triggers rapid generation of reactive oxygen  
316 species (ROS) and inflammatory cytokines production. The perpetuation of this  
317 process contributes to neuroinflammation and dopaminergic neuron death in PD [13].  
318 Unfortunately, we did not have access to CSF to verify this shift to the brain; in serum  
319 samples of PD, RAGE agonists decreased and did not show any consistent correlation  
320 with cytokines.

321 For instance, studies have reported abnormalities in immune functions in  
322 patients with PD, including a reduction in the percentage of activated T lymphocytes,  
323 poor response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to mitogens, and  
324 impaired cytokine production; this includes lower plasma levels of IL-4, IL-6, IL-10, IL-  
325 17A, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  and a predominance of Th1 profile [10]. We also found a

326 reduction in serum cytokine, chemokine and DAMPs of patients (IL6, CCL5, 4-HNE,  
327 CML) and a decreased TNA- $\alpha$ /IL-4, IL-6/IL-4 and IL-6/IL-10 ratios, suggesting a Th2  
328 activated profile. Interestingly, there was a shift in Th1 profile over time, as PD<sub>R</sub>  
329 patients increased these cytokine ratios. Also, some serum markers increased after a  
330 year (IL-2, IL-6, IL-10 and HSP70) while other RAGE agonists decreased (4-HNE  
331 CML, S100B). These alterations in both pro-inflammatory and anti-inflammatory serum  
332 markers play a complex alteration in immune profile and network.

333         Peripheral inflammation appears to accompany the non-motor symptom of PD  
334 [8]. In the evaluation of PD (PD<sub>E</sub>), some non-motor symptoms were negatively  
335 correlated with anti-inflammatory cytokine IL-4 and a few DAMPs/RAGE agonists.  
336 Furthermore, disease scales of rating (MDS-UPDRS) and staging (HY) were also  
337 negatively correlated with anti-inflammatory cytokines and/or DAMPs. In contrast to  
338 our findings, a recent study describes higher levels of IL-4 and lower levels of IFN $\gamma$   
339 predicting more severe tremors in people with PD [26]. Moreover, we observed few  
340 changes in NMS over time. However, alterations in psychosis (MDS-UPDRS I.II) and  
341 sleep quality (PDSS 5) occur. Only the progression of psychosis correlated with serum  
342 marker, accompanying the increase of S100B ( $r=0.399$ ,  $p=0.11$ , data not shown).  
343 Remarkably, we found a shift of anti-inflammatory to pro-inflammatory status in the  
344 periphery over time, but it did not change correlations to clinical symptoms.

345         Previous research has shown that PD is strongly associated with inflammation  
346 factors, such as genetics, environmental (e.g., pesticides), aging, and the depletion of  
347 mitochondrial function [3], which may be dysregulating inflammatory pathways. The  
348 patients in our study are older than healthy controls and have a high incidence of  
349 comorbidities, which may influence the peripheral immune system. Aging is a major  
350 factor for both genetic and idiopathic PD; recent evidence suggests that the aged brain

351 resides in a chronic state of neuroinflammation, characterized by increased reactivity  
352 and pro-inflammatory activation of the peripheral immune system [8].

353 The presence of diabetes mellitus (DM) may predispose toward a PD-like  
354 pathology and, when present in patients with PD, can induce a more aggressive  
355 phenotype [27]. AGEs contribute inflammation and to diabetic complications [10, 28]; it  
356 can induce tau aggregation by the polymerization and protein cross-linking and  
357 memory deficit through RAGE signaling [29]. Here, PD patients have an increased  
358 incidence of diabetes compared to HC; however, it has a negative correlation with  
359 AGEs -as they decreased in PD serum- and a positive correlation with the pro-  
360 inflammatory cytokine IL-2. Because of that, we performed a new analysis of serum  
361 markers, excluding the diabetes patients (data not shown), and only CML loses  
362 significance, showing no decrease from PD<sub>E</sub> to HC. Looking longitudinally (PD<sub>R</sub> x  
363 PD<sub>E</sub>), IL-2 loses significance ( $p=0.061$ ), while IFN- $\gamma$  had an increase in concentration  
364 ( $p=0.016$ ) and Nitrotyosine decreased ( $p=0.003$ ) in serum of non-diabetic patients.

365 All the PD patients in this study were under drug treatments, in which 81.2%  
366 used L-Dopa. It is reported that long-term treatment with anti-parkinsonian drugs may  
367 influence the immune system through direct effects on lymphocytes or in antigen-  
368 presenting cells [10], as dopamine receptors are present in the peripheral immune  
369 system, triggering a variety of modulatory effects on the immune responses (Basu and  
370 Dasgupta, 2000). However, studies described controversial effects regarding L-Dopa,  
371 and it is not clear whether it acts as an immunostimulatory or as an immuno-  
372 suppressor factor [9]. Recently, Rocha et al. described that L-DOPA and pramipexole  
373 were able to decrease the production of cytokines by PBMC [10].

374 Our predictive machine model showed that it is a good and robust model,  
375 although the outcome of the disease is low due to the distribution of samples. Because

376 the patients had a prevalence in the HY II stage, the model had high accuracy in  
377 hitting the group. Although considering the other subgroups, the model is not hitting,  
378 as indicated by the low kappa value. The 12 serum markers together could predict de  
379 PD more than alone.

380 We observed two different subgroups of inflammatory status between patients,  
381 and they differ in the profile of cytokines and RAGE agonists/DAMPS, with an inverse  
382 relationship. While in one cluster the concentration of agonists is higher than in the  
383 other cluster, the concentration of inflammatory cytokines is lower. However, it has no  
384 association with the staging or severity scales of the disease.

385 The main limitations of our study include the relatively small cohort, mainly  
386 related to the number of patients evaluated longitudinally; due to the covid-19  
387 pandemic calamity situation, we had to suspend the follow-up of patients in this study.  
388 Furthermore, we only had access to amyloid-peptide- $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein ELISA kits to  
389 analyze PD<sub>E</sub> samples, so they were not evaluated in PD<sub>R</sub>; however, they did not differ  
390 in the serum when compared to HC.

391 Here, we observed early changes in serum inflammatory profile even without  
392 alterations in disease staging (HY) and rating scale (total MDS-UPDRS) after a year,  
393 which are based on behavior and symptom alterations. These changes include the  
394 shift of anti-inflammatory to pro-inflammatory profile and a decrease in serum RAGE  
395 agonists. Furthermore, we identified two distinct profiles of PD patients and described  
396 a promising tool to predict disease.

397

## 398 **Conclusion**

399 In Parkinson's disease, we have the bias of aging, comorbidities, and drug  
400 intervention that may modulate the immune system and inflammation in both the brain

401 and periphery; however, we had interesting observations. First, serum DAMPs and  
402 RAGE ligands were lower in PD when compared to HC and kept decaying over time.  
403 At the same time, PD patients present an anti-inflammatory profile of cytokines that  
404 turns pro-inflammatory after a year, even without progression of disease staging.  
405 Finally, according to serum profiles, we observed two distinct clusters of PD patients,  
406 wherein DAMPs/RAGE ligands vary inversely to cytokines. Together, the 12 serum  
407 markers analyzed by the machine learning model (HMGB1, HSP70, S100B, 4-HNE,  
408 CML, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10) were able to predict de PD in HY  
409 scale 2.

410

#### 411 **Acknowledgments**

412 We thank Brazilian public universities and Brazilian science and research  
413 agencies that funded this project. We also thank Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for  
414 English language editing.

415

#### 416 **Declaration of competing interest**

417 Declarations of competing interest: None

418

#### 419 **Author contributions**

420 NS planned and organized the study, carried out the immunodetection analysis,  
421 data analysis and manuscript writing; NMS carried out planning and recruitment of  
422 participant of studies, clinical data collection and organization; MF carried out  
423 bioinformatics analysis; JG organized and planned the study and performed multiplex  
424 analysis; CSG and CTR organized serum samples and performed multiplex analysis;  
425 GMP, ACL and NRA carried out serum collection, organization and clinical interviews;

426 JSK and BEM assisted the organization and evaluation of clinical data; JCFM, AFS  
 427 and RMMA provided funding and discussed design conceiving; AH and CRMR  
 428 coordinated clinical study at the hospital and provided access to crucial research  
 429 components; DPG provided funding, convinced of the study and reviewed the  
 430 manuscript.

431

432 **Tables**

433 **Table 1. Descriptive demographic and baseline features of PD<sub>E</sub> and control**  
 434 **groups.**

		HC	PD <sub>A</sub>	<i>p-value</i>
<b>Total participants</b>		57	96	
<b>Age (years)</b>		58.7± 9.6	62.7±10	*0.016 <sup>a</sup>
<b>Sex (F/M)</b>		33/24	50/46	
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>		26.91 ± 3.94	25.40 ± 4.43	*0.037 <sup>a</sup>
<b>Comorbidities cases (%)</b>	SAH	17 (29.8%)	26 (27.1%)	0.853 <sup>b</sup>
	Diabetes	1 (1.8%)	12 (12.5%)	*0.032 <sup>b</sup>
	Depression	3 (5.3%)	8 (8.4%)	0.538 <sup>b</sup>
	Cancer	5 (8.8%)	8 (8.4%)	0.580 <sup>b</sup>
<b>Systolic Pressure</b>		123,19 ± 15,83	123,98 ± 16.37	0.776 <sup>a</sup>
<b>Diastolic Pressure</b>		78.94 ± 10.41	77.66 ± 11.32	0.498 <sup>a</sup> # <sub>m</sub> 0.049
<b>Family History of <u>Parkinsonism</u> (%)</b>		21,1	32,3	0.143 <sup>a</sup>
<b>Time of diagnosis (years)</b>			9.8 ± 5.2	
<b>L-Dopa treatment (%)</b>			81.2	

435

436 BMI, Body Mass Index; SAH, Systemic Arterial Hypertension. Continuous normal  
 437 samples are expressed by mean ± SD (standard deviation). Statistical analysis were  
 438 performed by: <sup>a</sup>, independent sample *t* student test; <sup>b</sup>, chi-square cross tables; # ANOVA  
 439 test including sex influence, <sup>m</sup> indicating the male sex.

440

441

442

443

444 **Table 2. Descriptive clinical assessments of the control group (HC), PD**  
 445 **patients in evaluation (PD<sub>E</sub>), and re-evaluation (PD<sub>R</sub>)**

	HC	PD <sub>A</sub>	<i>p-value</i>	PD <sub>R</sub>	<i>p-value</i>
UPDRS II (non-motor)		18.9 ± 9.8		18.24 ± 7.87	0.910 <sup>b</sup>
UPDRS III (motor)		44.83 ± 15.77		43.28 ± 16.60	0.125 <sup>b</sup>
Psychosis (frequency)		13 (13.7%)		15 (22.7%)	0.071 <sup>e</sup>
	UPCRS I.II	0.27 ± 0.79		0.43 ± 0.94	*0.044 <sup>d</sup>
Constipation (frequency)		46 (48.8%)		35 (53%)	0.273 <sup>e</sup>
	UPCRS I.XI	1.11 ± 1.33		0.89 ± 1.10	0.571 <sup>d</sup>
Diskynesia (frequency)		54 (56.8%)		38 (57.6%)	0.346 <sup>e</sup>
	UPCRS IV.I	1.09 ± 1.30		1.09 ± 1.08	0.740 <sup>d</sup>
Total UPDRS		85.08 ± 30.80		81.79 ± 30.16	0.284 <sup>b</sup>
HY stage		2 (2-3)			
cases (frequency)	I	17 (17.9%)			
	II	46 (48.4%)			
	III	21 (22.1%)			
	IV	11 (11.6%)			
	V	1 (1.1%)			
Total MoCA	27 (25-28)	25 (21-27.5)	*0.008 <sup>a</sup>	25 (21,75-28)	0.176 <sup>c</sup>
BDI	7 (3-13)	14 (9.25-22.75)	***<0.0001 <sup>a</sup>	11 (6-20.75)	0.095 <sup>c</sup>
PDSS scale 5	6 (3-8)	6 (3-9)	0.895 <sup>a</sup>	5 (1.25-9)	0.629 <sup>c</sup>
PDSS scale 6	9 (8-10)	8 (4-10)	*0.024 <sup>a</sup>	9 (6-10)	*0.010 <sup>c</sup>
PDSS scale 7	10 (9-10)	10 (10-10)	0.121 <sup>a</sup>	10(10-10)	0.154 <sup>c</sup>

446

447 MDS-UPDRS=Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale,  
 448 HY=Hoehn and Yahr, MoCA scale, Montreal Cognitive Assessment, BDI= Beck's  
 449 Depression Inventory, PDSS=Parkinson's disease sleep scale. Results are expressed  
 450 in mean ± SD (for variables with normal distribution) or median (IR). Statistical analysis  
 451 were performed by: <sup>a</sup> Mann Withney between HC and PD<sub>E</sub>; <sup>b</sup> paired sample t-test  
 452 between PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub>; <sup>c</sup> Wilcoxon test between PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub>;

453  
 454

455

456

457

458

459

460

461

462 **Table 3. Serum proteins**

463

	HC	PD <sub>E</sub>	<i>p<sub>E</sub></i> .value	PD <sub>R</sub>	<i>p<sub>R</sub></i> .value
TNF-α (pg/mL)	0.55 (0.53-0.61)	0.54 (0.53-0.56)	0.34 <sup>b</sup>	0.55 (0.45-0.90)	0.090 <sup>d</sup>
IL-1β (pg/mL)	0.21 (0.18-0.23)	0.22 (0.21-0.22)	0.749 <sup>b</sup>	0.20 (0.15-0.33)	0.285 <sup>d</sup>
IL-2 (pg/mL)	0.85 (0.84-0.86)	0.85 (0.84-0.86)	0.485 <sup>b</sup>	0.86 (0.80-1.06)	*0.027 <sup>d</sup>
IL-6 (pg/mL)	1.70 (0.65-2.96)	0.65 (0.65-0.82)	**0.005 <sup>a</sup>	2.32 ± 1.19	***<0.0001 <sup>d</sup>
IFN-γ (pg/mL)	0.81 (0.49-1.08)	0.41(0.4-1.21)	0.901 <sup>b</sup>	0.97 (0.68-1.20)	0.069 <sup>d</sup>
IL-4 (pg/mL)	0.65 (0.57-0.66)	0.65 (0.65-0.66)	0.602 <sup>b</sup>	0.57 (0.52-0.78)	0.859 <sup>d</sup>
IL-10 (pg/mL)	0.56 ( 0.55-0.57)	0.56 (0.55-0.56)	0.419 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.44	*0.019 <sup>d</sup>
HMGB1 (%)	101.08 ± 25.68	104.13 ± 30.55	0.568 <sup>a</sup>	102.95 ± 28.43	0.503 <sup>a</sup>
HSP70 (%)	95.36 (71.17-129.66)	97.79(78.61-128.06)	0.537 <sup>b</sup>	131.46 (90.50-167.19)	*0.029 <sup>d</sup>
S100B (%)	100.01 ± 7.67	97.47 ± 9.89	0.135 <sup>a</sup>	95.01 ± 9.97	*0.023 <sup>c</sup>
4HNE (%)	100.79 ± 8.86	91.74 ± 11.56	***<0.0001 <sup>a</sup>	85.46 ± 7.38	***<0.0001 <sup>c</sup>
CML (%)	100.87 ± 7.34	97.42 ± 11.24	*0.043 <sup>a</sup>	85.87 ± 12.67	***<0.0001 <sup>c</sup>
Nitrotyrosine (%)	100.97 ± 16.00	97.42 ± 17.14	0.261 <sup>a</sup>	95.83 ± 17.97	0.177 <sup>c</sup>
RANTES (CCL5)	99.51 ± 43.52	75.31 ± 34.32	*0.0101		
amyloid-β (pg/mL)	202.90 (194.51-217.26)	201.29 (190.97-209.35)	0.203 <sup>b</sup>		
α-synuclein (ng/mL)	17.22 (9.75-34.83)	12.45 (8.53-20.21)	0.062 <sup>b</sup>		

464

465 Statistical analysis were performed by: <sup>a</sup> independent sample t student test between  
 466 HC and PD<sub>E</sub>; <sup>b</sup> Mann Withney test between HC and PD<sub>E</sub>; <sup>c</sup> paired sample t-test  
 467 between PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub>; <sup>d</sup> Wilcoxon test between PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub>;

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

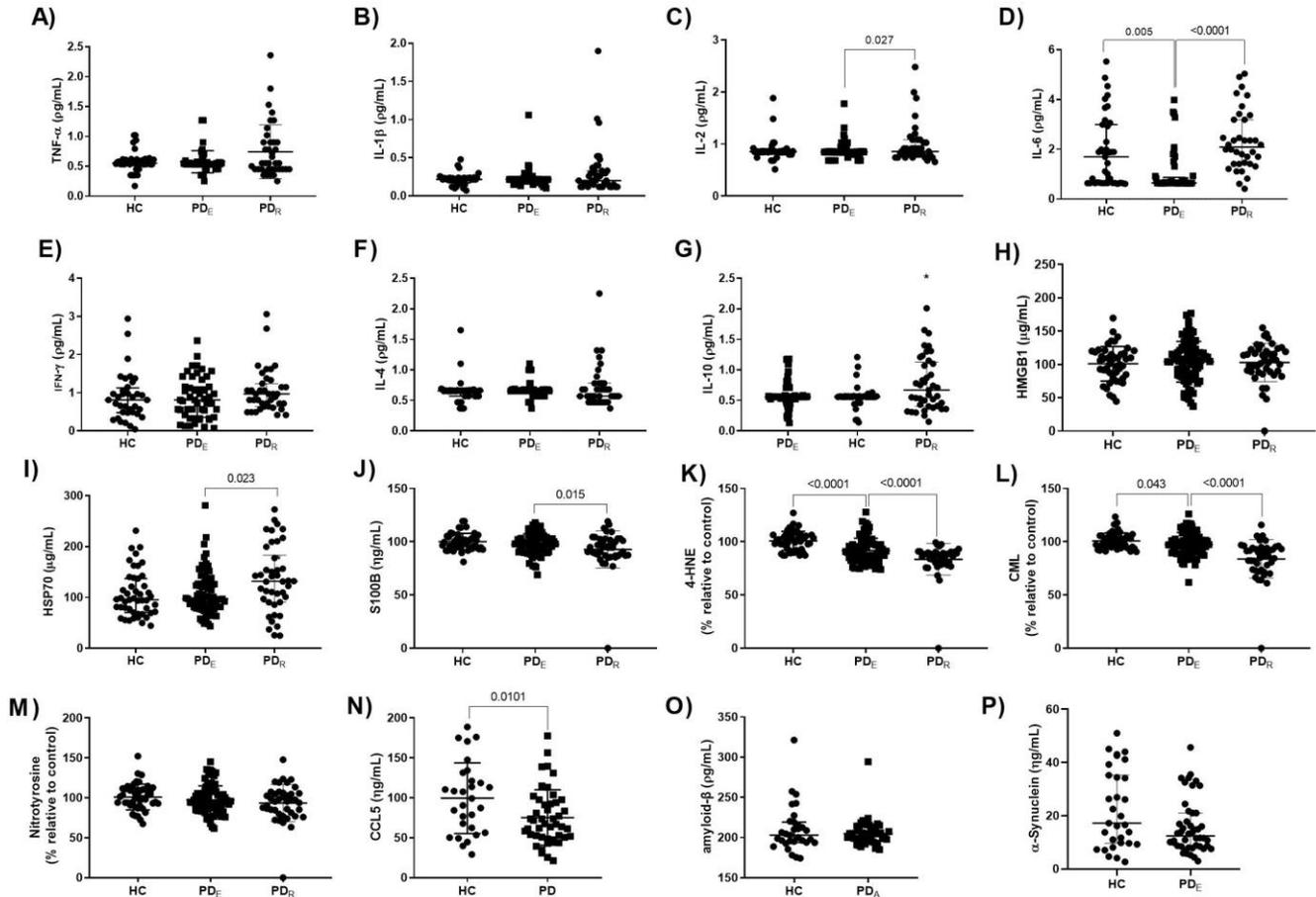
479

480

481 **Figures**

482

483 **Figure 1. Serum cytokines, RAGE agonists and DAMPs**



484

485 Serum A) TNF-α, B) IL-1β, C) IL-2, D) IL-6, E) IFN-γ, F) IIL4, G) IL-10, H) HMGB1, I)  
 486 HSP70, J) S100B, K) 4-HNE, L) CML, M) Nitrotyrosine, N) CCL5 (RANTES), O)  
 487 amyloid-β, P) α-Synuclein. Statistical analysis were performed by: independent t-test  
 488 or Mann Withney test between HC and PD<sub>R</sub>; Wilcoxon test between related samples  
 489 PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub>, as indicated in Table 3.

490

491

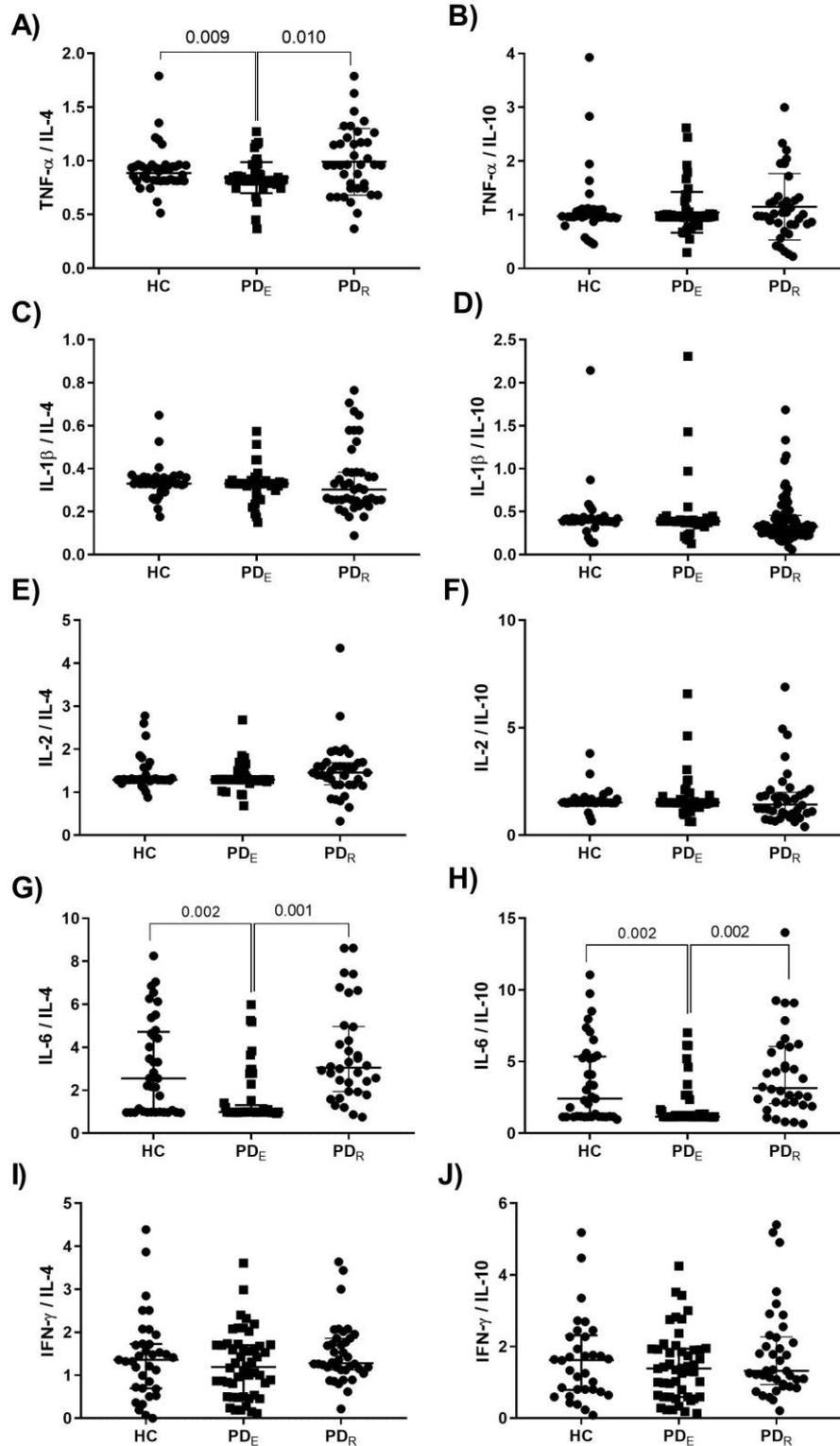
492

493

494

495

496 **Figure 2. Serum ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines**



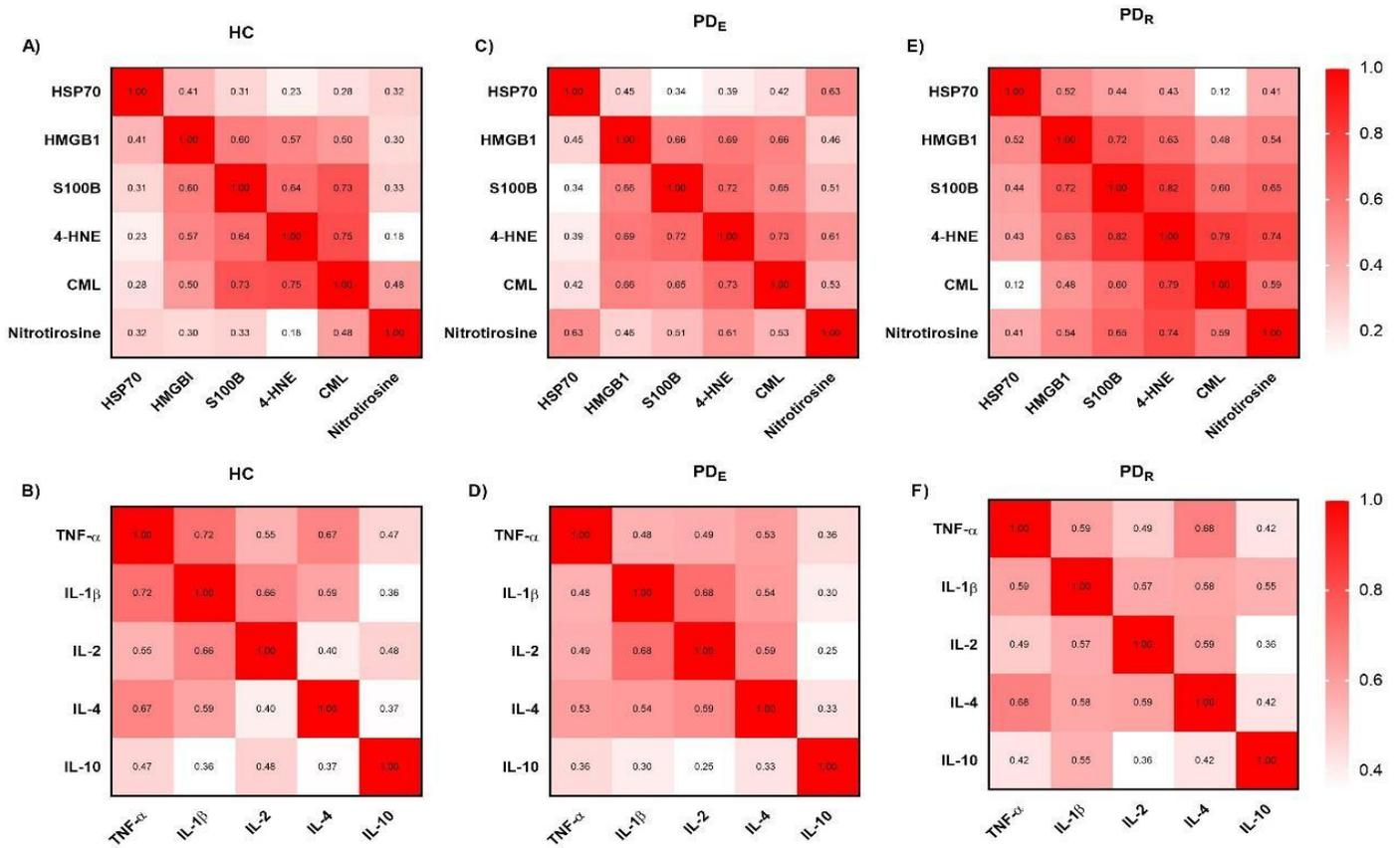
497

498 Pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokines ratios. A) TNF- $\alpha$ /IL-4, B) TNF- $\alpha$ /IL-10,  
 499 C) IL-1 $\beta$ /IL-4, D) IL-1 $\beta$ /IL-10, E) IL-2/IL-4, F) IL-2/IL-10, G) IL-6/IL-4, H) IL-6/IL-10, I) IFN-

500  $\gamma$ /IL-4, J) INF- $\gamma$ /IL-10. Statistical analysis were performed by Mann Withney test  
 501 between HC and PD<sub>R</sub>; Wilcoxon test between related samples PD<sub>E</sub> and PD<sub>R</sub>.  
 502  
 503

504

505 **Figure 3. Correlations**



506

507 A and B: correlations in HC; C and D: correlations in PDE; E and F: correlations in  
 508 PDR. Statistical analysis were performed using Pearson or Spearman correlation  
 509 tests; the coefficient of correlation  $r$  is demonstrated.  
 510

511

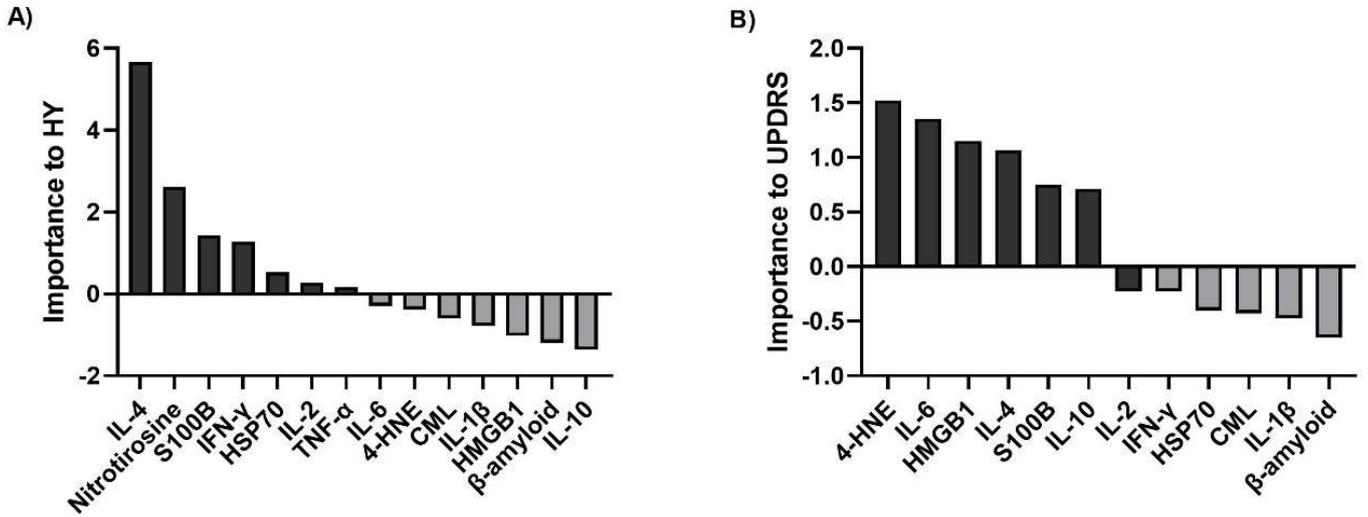
512

513

514

515

516 **Figure 4. Importance of variables to predict HY and total UPDRS**

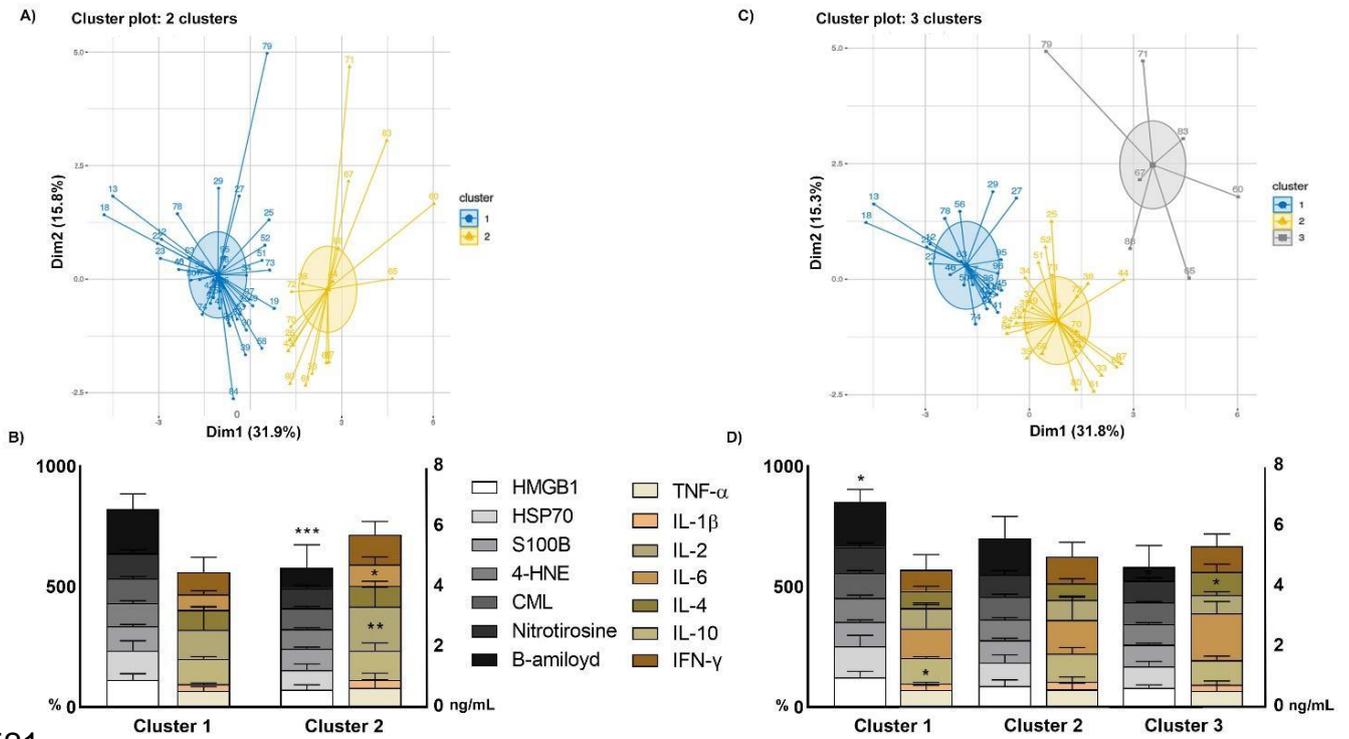


517

518 Importance of variables to predict A) HY scale and B) total UPDRS.

519

520 **Figure 5. Clustering analysis**



521

522

523 Two clusters analysis demonstrated in A) graph plot of patients grouping, B) serum  
 524 profile of RAGE agonists and cytokines in each cluster. Three clusters analysis C)  
 525 Three clusters plot, D) Serum profile of RAGE agonists and cytokines in three cluster  
 526 analysis. Significant values \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  were analyzed by T-test  
 527 between two clusters; one-way ANOVA followed by Tukey's posthoc between three  
 528 clusters.  
 529

530 **Supplemental Materials**

531 **Supplemental Table 1. Antibodies dilution for indirect ELISA.**

532

Antibody	Assay	Manufacturer	Cat. No.	Sample concentration	Antibody concentration	Secondary antibody	Secondary antibody concentration
<b>α-synuclein</b>	sandwich ELISA	Thermo Fischer	KHB0061	1:10	-	-	-
<b>Amyloid β42</b>	sandwich ELISA	Thermo Fischer	KHB3441	1:10	-	-	-
<b>RANTES</b>	sandwich ELISA	Thermo Fischer	EHRNTS	1:100	-	-	-
<b>Nitrotyrosine</b>	indirect ELISA	Abcam	ab7048	1:5.000	1:20.000	Rabbit	1:3.000
<b>4-HNE</b>	indirect ELISA	Abcam	ab46545	1:5.000	1:20.000	Rabbit	1:3.000
<b>CML</b>	indirect ELISA	Abcam	ab27684	1:5.000	1:20.000	Rabbit	1:3.000
<b>S100B</b>	indirect ELISA	Santa Cruz Biotechnology	SC 28533	1:5.000	1:10.000	Rabbit	1:3.000
<b>HMGB1</b>	indirect ELISA	Santa Cruz Biotechnology	SC 26351	1:1.000	1:3.000	Goat	1:3.000
<b>HSP70</b>	indirect ELISA	Millipore	MAB3846	1:1.000	1:3.000	Mouse	1:2.000

533

534

535

536

537

538

539

540

541 **Supplemental Table 2. Correlations of serum markers in PD<sub>E</sub>.**

543 Results expressed by: coefficient of correlation  $r$  ( $p$ ), with Pearson correlation for  
544 parametric distribution (between CCL5, HMGB1, S100B, 4-HNE, CML, Nitrotyrosine)  
545 and Spearman's correlation for non-parametric distribution (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6,  
546 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, HSP70). The correlations with statistical significance are marked in  
547 *italics*.  
548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570 **Supplemental Table 3. Correlations of serum and clinical parameters**  
571 **in PD<sub>E</sub>.**

572

573 Results expressed by: coefficient of correlation  $r$  ( $p$ ), with Pearson correlation for  
574 parametric distribution (between CCL5, HMGB1, S100B, 4-HNE, CML, Nitrotyrosine,  
575 age, time of diagnosis, BMI, systolic and diastolic blood pressure, all UPDRS scales)  
576 and Spearman's correlation for non-parametric distribution (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6,  
577 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, HSP70, MoCA, BDI, all PDSS scales and HY). The correlations  
578 with statistical significance are marked in *italics*.  
579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601 **Supplemental Table 4. Correlations in serum markers of PD<sub>R</sub>.**

602

603 Results expressed by: coefficient of correlation  $r$  ( $p$ ), Pearson correlation for  
604 parametric distribution (between IL6, IL-10, HMGB1, S100B, 4-HNE, CML,  
605 Nitrotyrosine, age, time of diagnosis, UPDRS II, UPDRS III, UPDRS IV.I and Total  
606 UPDRS) and Spearman's correlation for non-parametric distribution. The correlations  
607 with statistical significance are marked in *italics*.

608

609

610

611

612

613 **Supplemental Table 5. Correlations between serum markers and clinical**  
614 **parameters of PD<sub>R</sub>.**

616 Results expressed by: coefficient of correlation  $r$  ( $p$ ), Pearson correlation for  
617 parametric distribution (between IL6, IL-10, HMGB1, S100B, 4-HNE, CML,  
618 Nitrotyrosine, age, time of diagnosis, UPDRS II, UPDRS III, UPDRS IV.I and Total  
619 UPDRS) and Spearman's correlation for non-parametric distribution. The correlations  
620 with statistical significance are marked in *italics*.  
621

## 622 **References**

623 [1] G.P.s.D. Collaborators, Global, regional, and national burden of  
624 Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of  
625 Disease Study 2016, *Lancet Neurol* 17 (2018) 939-53.

626 [2] O.B. Tysnes, A. Storstein, Epidemiology of Parkinson's disease, *J Neural*  
627 *Transm (Vienna)* 124(8) (2017) 901-905.

628 [3] R.F. Pfeiffer, Non-motor symptoms in Parkinson's disease, *Parkinsonism*  
629 *Relat Disord* 22 Suppl 1 (2016) S119-22.

630 [4] K. Chaudhuri, D. Healy, A. Schapira, Non-motor Symptoms of Parkinson's  
631 Disease: Diagnosis and Management, *The Lancet. Neurology* 5(3) (2006).

632 [5] H.C. Cheng, C.M. Ulane, R.E. Burke, Clinical progression in Parkinson  
633 disease and the neurobiology of axons, *Ann Neurol* 67(6) (2010) 715-25.

634 [6] W. Poewe, K. Seppi, C.M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkmann,  
635 A.E. Schrag, A.E. Lang, Parkinson disease, *Nat Rev Dis Primers* 3 (2017) 17013.

636 [7] M.W.C. Rousseaux, J.M. Shulman, J. Jankovic, Progress toward an  
637 integrated understanding of Parkinson's disease, *F1000Res* 6 (2017) 1121.

638 [8] X. Su, H.J. Federoff, Immune responses in Parkinson's disease: interplay  
639 between central and peripheral immune systems, *Biomed Res Int* 2014 (2014)  
640 275178.

641 [9] M. Reale, C. Iarlori, A. Thomas, D. Gambi, B. Perfetti, M. Di Nicola, M.  
642 Onofri, Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease, *Brain, behavior, and*

643 immunity 23(1) (2009) 55-63.

644 [10] NP. Rocha, F. Assis, P.L. Scalzo, E.L.M. Vieira, I.G. Barbosa, MS de  
645 Souza, P.P. Christo, H.J. Reis, A.L. Teixeira, Reduced Activated T Lymphocytes  
646 (CD4+CD25+) and Plasma Levels of Cytokines in Parkinson's Disease, Mol  
647 Neurobiol 55(2) (2018) 1488-1497.

648 [11] T. Maslanik, L. Mahaffey, K. Tannura, L. Beninson, B.N. Greenwood, M.  
649 Fleshner, The inflammasome and danger-associated molecular patterns (DAMPs)  
650 are implicated in cytokine and chemokine responses following stressor exposure,  
651 Brain, behavior, and immunity 28 (2013) 54-62.

652 [12] H.J. Kim, M.S. Jeong, S.B. Jang, Molecular Characteristics of RAGE and  
653 Advances in Small-Molecule Inhibitors, Int J Mol Sci 22(13) (2021).

654 [13] X. Jiang, X. Wang, M. Tuo, J. Ma, A. Xie, RAGE and its emerging role in  
655 the pathogenesis of Parkinson's disease, Neurosci Lett 672 (2018) 65-69.

656 [14] N. Somensi, S.C. Lopes, J. Gasparotto, R. Mayer Goncalves, C.  
657 Tiefensee-Ribeiro, D. Oppermann Peixoto, P. Ozorio Brum, C.M. Pinho, J.P. Agnes,  
658 L. Santos, J. de Oliveira, F. Spiller, J.C. Fonseca Moreira, A. Zanotto-Filho, R.D.  
659 Prediger, D. Pens Gelain, Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine-  
660 induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice, Neurochem Int 151  
661 (2021) 105215.

662 [15] J. Gasparotto, C.T. Ribeiro, R.C. Bortolin, N. Somensi, H.S. Fernandes,  
663 A.A. Teixeira, M.O.R. Guasselli, C. Agani, N.C. Souza, M. Grings, G. Leipnitz, H.M.  
664 Gomes, MA de Bittencourt Pasquali, P.R. Dunkley, P.W. Dickson, J.C.F. Moreira,  
665 D.P. Gelain, Anti-RAGE antibody selectively blocks acute systemic inflammatory  
666 responses to LPS in serum, liver, CSF and striatum, Brain, behavior, and immunity  
667 62 (2017) 124-136.

668 [16] J. Gasparotto, C.T. Ribeiro, R.C. Bortolin, N. Somensi, T.K. Rabelo, A.  
669 Kunzler, N.C. Souza, M.A.B. Pasquali, J.C.F. Moreira, D.P. Gelain, Targeted  
670 inhibition of RAGE in substantia nigra of rats blocks 6-OHDA-induced dopaminergic  
671 denervation, *Scientific reports* 7(1) (2017) 8795.

672 [17] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical  
673 diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases,  
674 *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55(3) (1992) 181-4.

675 [18] C.G. Goetz, B.C. Tilley, S.R. Shaftman, G.T. Stebbins, S. Fahn, P.  
676 Martinez-Martin, W. Poewe, C. Sampaio, M.B. Stern, R. Dodel, B. Dubois, R.  
677 Holloway, J. Jankovic, J. Kulisevsky, A.E. Lang, A. Lees, S. Leurgans, P.A. LeWitt,  
678 D. Nyenhuis, C.W. Olanow, O. Rascol, A. Schrag, J.A. Teresi, J.J. van Hilten, N.  
679 LaPelle, URTF Movement Disorder Society, Movement Disorder Society-sponsored  
680 revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale  
681 presentation and clinimetric testing results, *Movement disorders : official journal of*  
682 *the Movement Disorder Society* 23(15) (2008) 2129-70.

683 [19] ZS. Nasreddine, N.A. Phillips, V. Bedirian, S. Charbonneau, V.  
684 Whitehead, I. Collin, J.L. Cummings, H. Chertkow, The Montreal Cognitive  
685 Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment, *J Am Geriatr*  
686 *Soc* 53(4) (2005) 695-9.

687 [20] M.H. Gomes-Oliveira, C. Gorenstein, F. Lotufo Neto, L.H. Andrade, Y.P.  
688 Wang, Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression  
689 Inventory-II in a community sample, *Braz J Psychiatry* 34(4) (2012) 389-94.

690 [21] K.R. Chaudhuri, S. Pal, A. DiMarco, C. Whately-Smith, K. Bridgman, R.  
691 Mathew, F.R. Pezzela, A. Forbes, B. Hogl, C. Trenkwalder, The Parkinson's disease  
692 sleep scale: a new instrument for assessing sleep and nocturnal disability in

693 Parkinson's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73(6) (2002) 629-35.

694 [22] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rub, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steur, E.  
695 Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease,  
696 *Neurobiology of aging* 24(2) (2003) 197-211.

697 [23] R. Kortekaas, K.L. Leenders, J.C. van Oostrom, W. Vaalburg, J. Bart, A.T.  
698 Willemsen, N.H. Hendrikse, Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain  
699 in vivo, *Ann Neurol* 57(2) (2005) 176-9.

700 [24] R. Deane, S. Du Yan, R.K. Subramanian, B. LaRue, S. Jovanovic, E.  
701 Hogg, D. Welch, L. Manness, C. Lin, J. Yu, H. Zhu, J. Ghiso, B. Frangione, A. Stern,  
702 A.M. Schmidt, D.L. Armstrong, B. Arnold, B. Liliensiek, P. Nawroth, F. Hofman, M.  
703 Kindy, D. Stern, B. Zlokovic, RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across  
704 the blood-brain barrier and accumulation in brain, *Nature medicine* 9(7) (2003) 907-  
705 13.

706 [25] K. Takuma, F. Fang, W. Zhang, S. Yan, E. Fukuzaki, H. Du, A. Sosunov,  
707 G. McKhann, Y. Funatsu, N. Nakamichi, T. Nagai, H. Mizoguchi, D. Ibi, O. Hori, S.  
708 Ogawa, D.M. Stern, K. Yamada, S.S. Yan, RAGE-mediated signaling contributes to  
709 intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction, *Proceedings of the*  
710 *National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47) (2009)  
711 20021-6.

712 [26] K. Diaz, M.L. Kohut, D.W. Russell, E.L. Stegemoller, Peripheral  
713 inflammatory cytokines and motor symptoms in persons with Parkinson's disease,  
714 *Brain Behav Immun Health* 21 (2022) 100442.

715 [27] G. Pagano, S. Polychronis, H. Wilson, B. Giordano, N. Ferrara, F.  
716 Niccolini, M. Politis, Diabetes mellitus and Parkinson disease, *Neurology* 90(19)  
717 (2018) e1654-e1662.

718 [28] H. Vlassara, J. Uribarri, Advanced glycation end products (AGE) and  
719 diabetes: cause, effect, or both?, *Curr Diab Rep* 14(1) (2014) 453.

720 [29] XH Li, BL Lv, JZ. Xie, J. Liu, X.W. Zhou, J.Z. Wang, AGEs induce  
721 Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3  
722 activation, *Neurobiology of aging* 33(7) (2012) 1400-10.

723

## 4.2 Capítulo II

### **Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine-induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice**

Artigo científico publicado no periódico Neurochemistry International (2021)

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105215>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

Research Article

**Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine–induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice**

Nauana Somensi<sup>a,\*</sup>, Samantha Cristiane Lopes<sup>b</sup>, Juciano Gasparotto<sup>a, c</sup>, Rosângela Mayer Gonçalves<sup>b</sup>, Camila Tiefensee Ribeiro<sup>a</sup>, Daniel Oppermann Peixoto<sup>a</sup>, Pedro Ozorio Brum<sup>a</sup>, Cibele Martins Pinho<sup>b</sup>, Jonathan Paulo Agnes<sup>b</sup>, Lucas dos Santos<sup>a</sup>, Jade de Oliveira<sup>a</sup>, Fernando Spiller<sup>b</sup>, José Cláudio Fonseca Moreira<sup>a</sup>, Alfeu Zanotto-Filho<sup>b</sup>, Rui Daniel Prediger<sup>b</sup>, Daniel Pens Gelain<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. CEP: 37130-001. Centro - Alfenas/MG

**\*Corresponding author:**

Nauana Somensi, MSc.  
Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Laboratório 32, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: nauana.somensi@gmail.com Phone: +55 51 33085578, fax: +55 51 33085577. ORCID: 0000-0003-0440-7249

26 **Abbreviations:** 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; CNS, central nervous system; CX,  
27 cortex; DA: dopamine; DAMPs, damage-associated molecular patterns; DAT:  
28 dopamine transporter; PD, Parkinson's disease; RAGE, receptor for advanced  
29 glycation end-products; SN, substantia nigra; SNc, substantia nigra pars compacta;  
30 ST, striatum; TLR4, Toll-like receptor 4; *TLR4*<sup>-/-</sup>: TLR4 gene knockout; WT, wild-type.

31 **Abstract**

32 Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by  
33 progressive loss of the nigrostriatal dopaminergic neurons that are associated with  
34 motor alterations and non-motor manifestations (such as depression).  
35 Neuroinflammation is a process with a critical role in the pathogenesis of PD. In this  
36 regard, toll-like receptor 4 (TLR4) is a central mediator of immune response in PD.  
37 Moreover, there are gender-related differences in the incidence, prevalence, and  
38 clinical features of PD. Therefore, we aimed to elucidate the role of TLR4 in the sex-  
39 dependent response to dopaminergic denervation induced by 6-hydroxydopamine (6-  
40 OHDA) in mice. Female and male adult wildtype (*WT*) and *TLR4* knockout (*TLR4*<sup>-/-</sup>)  
41 mice were administered with unilateral injection of 6-OHDA in the dorsal striatum, and  
42 non-motor and motor impairments were evaluated for 30 days, followed by  
43 biochemistry analysis in the substantia *nigra pars compacta* (SNc), dorsal striatum,  
44 and dorsoventral cortex. Early non-motor impairments (i.e., depressive-like behavior  
45 and spatial learning deficits) induced by 6-OHDA were observed in the male *WT* mice  
46 but not in male *TLR4*<sup>-/-</sup> or female mice. Motor alterations were observed after  
47 administration of 6-OHDA in both strains, and the lack of TLR4 was also related to  
48 motor commitment. Moreover, ablation of *TLR4* prevented 6-OHDA-induced  
49 dopaminergic denervation and microgliosis in the SNc, selectively in female mice.  
50 These results reinforced the existence of sex-biased alterations in PD and indicated  
51 TLR4 as a promising therapeutic target for the motor and non-motor symptoms of PD,  
52 which will help counteract the neuroinflammatory and neurodegenerative processes.

53

54 **Keywords:** Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine; Motor function; Toll-like  
55 receptor 4; Microglia; Neuroinflammation.

56

57

## 1. Introduction

58 Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease mainly  
59 characterized by the death of dopaminergic neurons in the substantia *nigra pars*  
60 *compacta* (SNc), leading to dopamine deficiency in the basal ganglia, which leads to a  
61 movement disorder characterized by the classical parkinsonian motor symptoms (e.g.,  
62 resting tremor, bradykinesia, muscle rigidity, and postural imbalance). Patients with PD  
63 also present with a series of non-motor symptoms, including olfactory dysfunction,  
64 cognitive impairment, psychiatric symptoms, sleep disorders, and autonomic  
65 dysfunction (Chaudhuri et al., 2005). Moreover, depression and cognitive dysfunction  
66 are at least partially associated with the frontostriatal pathophysiological network  
67 affected in PD (Vriend et al., 2014).

68 PD is approximately two times more prevalent in men than in women (Van Den  
69 Eeden et al., 2003). Studies have suggested a sex-related effect on the age, severity,  
70 clinical symptoms, and pharmacological response in patients with PD (Jurado-Coronel  
71 et al., 2018). Women present with delayed motor symptoms of PD, but a higher  
72 prevalence of psychiatric symptoms, including depression (Nilsson et al., 2002; Riedel  
73 et al., 2010). Furthermore, women exhibit elevated physiological dopamine levels and  
74 dopamine transporter (DAT) activity in the striatum due to genetic, environmental  
75 (lifestyle), and hormonal influences. For instance, estrogen influences a 16% higher  
76 mean striatal DAT binding in women than that in men (Haaxma et al., 2007), and that  
77 endogenous estrogen may have a protective role against the development of PD  
78 (Pavon et al., 2010). Additionally, gender-related differences in pharmacological  
79 response to anti-PD treatments, including L-DOPA, are also reported (Colombo et al.,  
80 2015).

81 The progressive degeneration of dopaminergic neurons in PD is associated with a  
82 consistent inflammatory response in the central nervous system (CNS). It is well  
83 established that neuroinflammation plays a pivotal role in the development and  
84 progression of PD (Fuzzati-Armentero et al., 2019; MT et al., 2019), and that the  
85 immune system is over-reactive in the brain in patients with PD. Glial cells (astrocytes  
86 and microglia) play a central role in maintaining cerebral homeostasis. However,  
87 chronic accumulation of inflammatory stressors activates pro-inflammatory signaling  
88 pathways that ultimately lead to progressive neuronal death (Hirsch and Standaert,  
89 2020; Wang et al., 2015). Reactive microglial and astrocytic cells and further  
90 inflammatory responses are found in the brains in patients and animal models of PD;  
91 but, the exact mechanisms of neuroinflammation in the pathogenesis of PD remain  
92 unclear (Pajares et al., 2020; Troncoso-Escudero et al., 2018; Wang et al., 2015).

93 Damage-associated molecular patterns (DAMPs) accumulate in PD (Roh and Sohn,  
94 2018), and stimulate neuroinflammation via activation of different pattern recognition  
95 receptors, such as the Toll-like receptor 4 (TLR4) (Ahmad et al., 2013; Campolo et al.,  
96 2019). TLR4 mediates immune response during inflammatory insults in the CNS,  
97 shares common ligands and signaling pathways with other pattern receptors, such as  
98 RAGE, and initiates and sustains chronic inflammation (Gasiorowski et al., 2018;  
99 Ibrahim et al., 2013). Despite its relevant immunological role in the microglial cells,  
100 TLR4 is also found in the astrocytes and neurons (Gasiorowski et al., 2018; Okun et  
101 al., 2009). Ablation or blocking of TLR4 in the animal models for PD suppresses  
102 inflammation, and thus, rescues motor and non-motor deficits and protects against  
103 dopaminergic loss (Campolo et al., 2019).

104 Thus, TLR4 has an essential role in the neuroinflammatory process in PD, wherein  
105 symptoms and incidence vary with sex. This study aimed to elucidate whether there

106 are any sex-related differences in the susceptibility to ablation of TLR4 in PD. We used  
107 *TLR4* knockout mice (*TLR4*<sup>-/-</sup>) to investigate the role of TLR4 in dopaminergic  
108 denervation induced by unilateral striatal injection of 6-OHDA in male and female  
109 mice. Motor and non-motor behavioral tests were performed, followed by biochemistry  
110 analysis in the SNc, dorsal striatum, and dorsoventral cortex. The differences between  
111 the behavior of male and female mice, neuroinflammation, and dopaminergic  
112 denervation were analyzed.

113

114

## 2. Materials and methods

115

### 2.1. Animals

116 Adult male and female C57BL/6 wildtype (*WT*) total of 29 animals and *TLR4* knockout  
117 (*TLR4*<sup>-/-</sup>), a total of 33 mice (7–8 weeks old) were obtained from an inbred colony at  
118 Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Brazil). The animals were caged  
119 collectively (approximately six animals), with *ad libitum* food and water, and  
120 maintained on a 12 h light-dark cycle (7 am/7 pm) in a temperature-controlled room  
121 (23 ± 1 °C). All experimental procedures were performed following the National  
122 Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and were approved  
123 by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-UFSC Protocol  
124 #8900110718).

125

126

### 2.2. 6-OHDA unilateral striatal lesion and experimental design

127 The mice were randomly distributed into four groups and anesthetized with an  
128 intraperitoneal (i.p.) administration of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine  
129 (10 mg/kg), followed by stereotactic surgery (Gasparotto et al., 2017). A single solution  
130 of 6-OHDA (4 µg 6-OHDA in 0.02% ascorbic acid/ 2 µL of sterile 0.9% saline) or sterile

131 ascorbate saline (0.02% ascorbic acid/ 2  $\mu$ L of sterile 0.9% saline) was injected into  
132 the right dorsomedial striatum. The coordinates used according to the Allen Mice Brain  
133 Atlas in Stereotaxic Coordinates (Allen Institute for Brain Science, 2010) were as  
134 follows: anteroposterior (AP), 0 mm from the bregma; mediolateral (ML), 2.0 mm from  
135 the midline; and dorso-ventral (DV), -3.5 mm from the skull. The solutions were  
136 injected at a flow rate of 0.5  $\mu$ L/min for 2 min, and the syringe was held immobile for  
137 another 2 min to ensure complete delivery of the entire volume. The animals were  
138 removed from the stereotaxic frame and housed for 2 h on heating pads to recover,  
139 and then re-grouped into their respective cages.

140 Three animals died during anesthesia, and one died a week after surgery (male *TLR4*-  
141 */-* mice, 6-OHDA). The total experimental *n* and groups considering surviving animals  
142 were: i) Group I (Saline WT), 7 male and 7 female who received an intrastriatal  
143 injection of saline solution; ii) Group II (6-OHDA WT), 6 male and 7 female who  
144 received an intrastriatal injection of 6-OHDA; iii) Group III (Saline *TLR4*-*/-*), 8 male and  
145 8 female who received an intrastriatal injection of saline; and iv) Group IV (6-OHDA  
146 *TLR4*-*/-*), 6 male and 9 female mice that received an intrastriatal injection of 6-OHDA.  
147 The detailed timeline of the experiment is shown in Fig. 1. The performance of animals  
148 in the behavioral tasks was evaluated seven days after surgery. On the seventh day  
149 after surgery, mice were subjected to the open field, rotarod, tail suspension, and  
150 elevated plus maze tests. Further, Y maze test, splash test, cylinder test, the second  
151 round of open field and rotarod tests, the third round of rotarod test, pole test, the  
152 fourth round of rotarod test, and an apomorphine-induced rotational test were  
153 performed on the 12<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 22<sup>nd</sup>, 28<sup>th</sup>, and 29<sup>th</sup> day, respectively. Finally,  
154 euthanasia was performed on the 30<sup>th</sup> day. Animals were perfused and  
155 immunofluorescence staining was performed.

156

157

### 2.3. Behavior tasks

158

Behavioral experiments were conducted between 9 am and 5 pm. Tests were

159

performed in an observatory room where the mice had been habituated for at least 1 h

160

before the beginning of the experiments. All behaviors were monitored using a video

161

camera positioned above the apparatuses, and the images were analyzed with

162

AnyMaze® video tracking (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) by an experienced

163

experimenter who was blinded to the animal condition.

164

165

#### 2.3.1. Tail suspension test

166

Tail suspension test was performed by isolating a mouse and suspending it 50 cm

167

above the floor using an adhesive tape fixed approximately 1.5 cm from the tail tip

168

(Schamne et al., 2018). The total time of immobility was recorded and evaluated for

169

approximately 5 min. Immobility behavior was considered only when the mice

170

remained hanged passively or completely motionless and was used to evaluate

171

depression-related behavior (Lucien et al., 1985).

172

173

#### 2.3.2. Elevated plus-maze

174

On the 9<sup>th</sup> day after surgery, we conducted the elevated plus maze test that is used to

175

assess anxiety-related behavior in rodent models of the CNS disorders. Briefly, the

176

apparatus consisted of four arms (length 18 cm × weight 6 cm) connected by a central

177

platform (6×6 cm) and placed 60 cm above the floor. Two opposite arms were closed,

178

surrounded by 6 cm high walls, and the other two arms were open. For the test, a

179

mouse was individually placed in the center of the maze facing a closed arm, and its

180

behavior was monitored for 5 min (Rial et al., 2014). The number of entries in the arms

181 and the time spent in the arms was evaluated. Anxiogenic-like effects were defined by  
182 the preference for selecting closed arms over open arms. If a mouse placed all four  
183 paws in an arm, it was considered an entry.

184

185

### **2.3.3. Y maze**

186 Y maze was used to measure rodents' willingness to explore new environments, 12  
187 days after administration of 6-OHDA. The apparatus consists of a platform with three  
188 arms (A, B, and C) oriented at a 120° angle. Each mouse is placed in arm A and left  
189 free to explore the arms for 8 min. If the animal selects a different arm than the one it  
190 arrived from, the choice is called an alternation, which is considered a correct  
191 response (hit); whereas, returning to the previous arm is considered an error. The total  
192 number of arm entries and the sequence of entries are recorded to calculate the  
193 percentage of alternation (Momeni et al., 2015).

194

195

### **2.3.4. Splash test**

196 Thirteen days after surgery, mice were subjected to a splash test. Briefly, mice were  
197 placed individually in a Plexiglas box (9 × 7 × 11 cm). A 10% sucrose solution was  
198 squirt on animal's back coat that evoked self-cleaning (grooming) behavior. The total  
199 time of grooming during 6 min was measured as an index of motivational and self-care  
200 behavior, while latency to grooming was used to measure depressive-like behavior,  
201 such as apathetic behavior (Isingrini et al., 2010).

202

203

### **2.3.5. Open field test**

204 Spontaneous locomotor activity and stress levels were recorded on the seventh and  
205 14<sup>th</sup> day after administration of 6-OHDA and surgery in a 40 cm wide × 40 cm deep ×

206 30 cm high square arena, where the mice were allowed to freely explore it for 5 min.  
207 The total distance traveled was measured (ANYmaze® software; Stoelting, USA). The  
208 apparatus was cleaned with 20% ethanol between consecutive animals to avoid  
209 olfactory cues (Mack et al., 2018).

210

211

### **2.3.6. Rotarod**

212 The rotarod test was performed to evaluate possible impairment in motor function,  
213 coordination, and balance. Basal rotarod performance was determined once in a week  
214 in a session under continuous acceleration to allow homogeneous distribution of mice  
215 in the different experimental groups. The test started at 5 rpm that was increased by  
216 0.1 rps (de Oliveira et al., 2017). The first week was considered as a training session  
217 for adaptation. The latency for the first fall from the rod was recorded. The cutoff time  
218 was 300 s.

219

220

### **2.3.7. Cylinder test**

221 The cylinder test is used to assess support asymmetry of the front legs after creating  
222 unilateral lesions in the nuclei in the CNS responsible for motor functions (Mabandla  
223 and Russell, 2010). The animals were placed in a transparent cylinder (diameter 24  
224 cm x height 30 cm) to record the contacts of the front legs to the cylinder wall for 5  
225 min. We measured the touching of the ipsilateral and contralateral feet to the injury  
226 and both legs simultaneously to the cylinder wall.

227

228

### **2.3.8. Pole test**

229 Pole test is a useful method to evaluate the rodents' movement disorder or motor  
230 impairments, including bradykinesia, associated with depletion of striatal dopamine

231 (Matsuura et al., 1997). After 22 days of administration of 6-OHDA, the mice were  
232 head-upward placed on the top of a vertical rough-surfaced pole (diameter 8 mm ×  
233 height 55 cm), and the time until they descended to the floor and turned was recorded,  
234 with a maximum test duration of 180 s. The longer the latency to turn and descend, the  
235 greater was the motor deficit measured.

236

237

### **2.3.9. Apomorphine-induced rotation test**

238 The apomorphine-induced rotational behavior is used as an index of dopaminergic  
239 responsiveness. Apomorphine (Sigma-Aldrich -MA, USA) was subcutaneously (s.c.)  
240 injected at a dose of 0.6 mg/kg (dissolved in a 0.2 mg/mL ascorbic acid /0.9% saline  
241 solution), and the animals were tested for 30 min (Aguiar et al., 2016). The animals  
242 were habituated for 10 min in the cylinder rotameter (19 cm diameter × 22 cm high)  
243 before starting rotations. The increased turns to the left (contralateral) indicated  
244 successful hemilateral dopaminergic denervation induced by 6-OHDA.

245

246

### **2.4. PFA perfusion and immunofluorescence**

247 Thirty days after surgery, mice were anesthetized with ketamine and xylazine mixture  
248 (100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively; i.p.) and were perfused via the vascular  
249 system with the descending aorta clamped. Sterile saline was administered for 5 min,  
250 followed by perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS, pH 7.4, for  
251 additional 5 min. The brains were carefully recovered in 4% PFA for 72 h at 4 °C. The  
252 brains were then transferred to 15% sucrose solution for 48 h at 4 °C, followed by  
253 immersion in 30% sucrose for additional 24 h at 4 °C. The brains were then frozen by  
254 immersion in chilled isopentane and stored in a freezer (−80° C) for later analyses.  
255 The SN was sectioned to 50 µm thick slices on the coronal plane using a cryostat at

256 -20 °C (Jung Histoslide 2000R; Leica; Heidelberg, Germany) (Fig. 1). The coronal  
257 sections were collected in PBS containing 0.2% triton and 0.02% azide (0.2% Triton-  
258 PBS). The free-floating SN were blocked with 5% fetal bovine serum (FBS) diluted in  
259 0.2% Triton-PBS. Further, the sections were incubated for 48 h at 4°C with primary  
260 antibodies (diluted in 0.2% Triton-PBS): anti-TH (1:500; sc-25269, Santa Cruz  
261 Biotechnology, USA), anti-Iba-1 (1:500; 019-19741, Wako Chemicals, USA,); and anti-  
262 GFAP (1:500; G4546, Sigma-Aldrich, USA). After washing with 0.2% Triton-PBS for  
263 four times, the tissue sections were incubated with the following secondary antibodies  
264 that were diluted to 1:500 in 0.2% Triton-PBS containing 2% FBS: anti-rabbit Alexa  
265 488 or 555; anti-mouse Alexa 488 or 555; and anti-goat Alexa 555 (Cell Signaling  
266 Technology®, USA). After incubating for 2 h at room temperature, the sections were  
267 washed three times with 0.2% Triton-PBS and incubated with DAPI (nucleic acid  
268 staining, 1:500; D9542; Sigma-Aldrich, USA) for 5 min. After washing three times with  
269 0.2% Triton-PBS, the coronal sections were transferred to gelatinized slides,  
270 assembled with assembling medium, and covered with coverslips. The fluorescent  
271 images were acquired using EVOS® FL Auto Imaging System Microscopy  
272 (AMAFD1000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Quantification of fluorescence  
273 intensity of the SN images (10× magnification) was performed using ImageJ software.

274  
275

## 2.5. Statistical analysis

276 We first performed the Levene's test to determine the homogeneity of variances. The  
277 outcomes of behavior and immunofluorescence experiments were analyzed using  
278 three-way ANOVA, followed by Newman-Keuls *post hoc* comparisons. A  $p < 0.05$   
279 was considered as statistically significant. Bars represent mean  $\pm$  SD. Statistical  
280 analysis was performed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad, San Diego,

281 CA, USA) and Statistica software version 13.0 (StatSoft Inc., La Jolla, CA, USA).

282

283

### 3. Results

284

285

#### 3.1. Male *TLR4*<sup>-/-</sup> mice do not display early non-motor deficits after administration of 6-OHDA

286

287

288

289

290

291

292

One-week after unilateral injection of 6-OHDA into the striatum, *TLR4*<sup>-/-</sup> male mice that received 6-OHDA were protected against depressive-like behavior in the tail suspension test ( $p = 0.0362$ ). *WT* male mice exposed to toxin had a higher mean value in immobility time in tail suspension test compared to *WT* mice that received saline injection, but the  $p$ -value was 0.0608 (Fig. 2A). No significant differences in immobility time were observed in the female mice regardless of the treatment and condition (Fig. 2A).

293

294

295

296

297

298

299

300

The mice were evaluated in the elevated plus maze on the same day, leaning towards anxiogenic-like behavior due to 6-OHDA. *WT* male mice treated with 6-OHDA spent more time in closed arms ( $p = 0.0217$ , Fig. 2B), while 6-OHDA *WT* female mice had fewer entries in the open arms ( $p = 0.007$ , Fig. 2C) than their respective control *WT* mice. Saline-treated *TLR4*<sup>-/-</sup> female mice had more entries into the open arms than the saline-treated *WT* female mice ( $p = 0.0189$ ). However, the differences in the time and entries in the open arms relative to entries and permanence in total arms did not show a  $p$ -value lower than 0.05 (Fig. 2D and E).

301

302

303

304

Two-weeks after administration of 6-OHDA, the self-cleaning behavior at the splash test was assessed. *WT* female mice displayed decreased self-cleaning time than *WT* male mice ( $p = 0.040$ , Fig. 2F). Animals exposed to 6-OHDA tended to exhibit a higher self-cleaning latency (Fig. 2G), although not statistically significant.

305

Further, *WT* male mice exhibited impaired spatial learning and memory in the Y-maze

306 task 12-days after administering 6-OHDA considering the number of hits ( $p = 0.0074$ ,  
307 Fig. 2H). Interestingly, *TLR4*<sup>-/-</sup> male mice were resistant to this cognitive deficit induced  
308 by 6-OHDA ( $p = 0.0078$ , Fig. 2H), suggesting a protective role of TLR4 knocking-out;  
309 while the percentage of hits was similar in *TLR4*<sup>-/-</sup> male mice that received 6-OHDA or  
310 saline. In contrast, female mice in both *WT* and *TLR4*<sup>-/-</sup> groups exhibited normal Y-  
311 maze performance after administering 6-OHDA (Fig. 2H and I). Additionally, the  
312 percentage of hits of *WT* male mice that received 6-OHDA was lower than in *WT*  
313 females that received 6-OHDA ( $p = 0.0096$ , Fig. 2H), while *WT* female groups  
314 presented more entries in arms than respective males ( $p = 0.0186$  in saline and  $p =$   
315  $0.0150$  in 6-OHDA injected groups); these results indicate a better cognitive  
316 performance of females compared to males. Finally, we observed a significant  
317 increase in the total number of entries in the *TLR4*<sup>-/-</sup> male mice than that in *WT* male  
318 mice ( $p = 0.0044$ , Fig. 2I), indicating once again an involvement of TLR4 in male  
319 cognitive impairment.

320  
321

### 322 **3.2. Investigation of motor performance of WT and *TLR4*<sup>-/-</sup> male and female mice after receiving 6-OHDA**

323 The OFT was used to analyze motor performance of mice in the experimental groups.  
324 After one-week of administering 6-OHDA, *TLR4*<sup>-/-</sup> male and female mice traveled  
325 lesser distance than respective controls ( $p = 0.0476$  and  $p = 0.0095$ , respectively; Fig.  
326 3A). In the second week after exposure to 6-OHDA, the locomotion of mice showed no  
327 significant differences in the OFT (Fig. 3B). In the third week, the performance of the  
328 mice was not significantly different in the cylinder test in terms of the three factors -  
329 sex, genotype, and treatment- although administration of 6-OHDA tended to decrease  
330 the number of paws used to elevate the body in the cylinder by both male and female

331 WT mice (Fig. 3C). Important to note, the *TLR4*<sup>-/-</sup> males mice that received 6-OHDA  
332 did not use left paw in the cylinder test (Fig 3D); although not significant, this shows  
333 the motor effects triggered by the injury on the contralateral side of the animals. In the  
334 fourth week, the mice were subjected to the pole test. The administration of 6-OHDA  
335 had no significant effect on the time to turn to orient downward and traverse the pole,  
336 regardless of the strain and sex of the mice (Fig. 3E).

337 The rotarod test showed no significant alterations in the motor balance and  
338 coordination in the first three weeks after injecting 6-OHDA (data not shown). In the  
339 fourth week, the analyses indicated that the *WT* male mice injected with 6-OHDA  
340 presented a decreased latency to fall when compared to those males injected with  
341 saline ( $p = 0.036$ ), and also to *WT* females injected with 6-OHDA ( $p = 0.004$ , Fig. 3F).  
342 Regarding genotype, saline injected *TLR4*<sup>-/-</sup> mice presented a decreased latency to fall  
343 compared to *WT* mice in males ( $p = 0.0156$ , Fig. 3F) and females ( $p = 0.003$ , Fig. 3F).  
344 The *TLR4*<sup>-/-</sup> female mice injected with 6-OHDA displayed a decreased latency to fall  
345 than *WT* female mice that received the same treatment ( $p = 0.0504$  Fig. 3F) and to the  
346 control that received saline ( $p = 0.0021$  Fig. 3F).

347 Finally, the apomorphine-induced rotational behavior test was performed on the day  
348 before euthanasia (Fig. 3G). All the male and female mice that received a unilateral  
349 intrastriatal injection of 6-OHDA displayed increased contralateral (left) rotations.  
350 Moreover, despite differences in the *WT* mice injected with saline and 6-OHDA ( $p$   
351  $=0.0479$ , male mice;  $p = 0.0003$ , female mice), the motor damage caused by 6-OHDA  
352 in the *TLR4*<sup>-/-</sup> mice was also evident ( $p = 0.0031$ , male mice;  $p = 0.0001$ , female mice)  
353 and more pronounced in female when considering the genotype contribution ( $p$   
354  $=0.0498$ , Fig. 3G).

355

356 3.3. **Dopaminergic denervation by 6-OHDA in the substantia nigra (SN) is**  
357 **prevented by ablation of *TLR4* in only female mice**

358 Immunofluorescence analysis of TH content in the SN in mice was performed using  
359 coronal sections from the brains obtained 30-days after administration of 6-OHDA and  
360 surgery (Fig. 4). The exposure to 6-OHDA led to dopaminergic denervation in the SN  
361 in *WT* male and female mice ( $p = 0.0025$  and  $p = 0.0023$ , respectively; Fig. 4B). We  
362 also found depletion of TH<sup>+</sup> neurons in the dorsal striatum due to administration of 6-  
363 OHDA (data not shown).

364 Furthermore, female *TLR4*<sup>-/-</sup> mice exposed to 6-OHDA failed to show a significant  
365 decrease in the TH immunoreactivity in the SN than in those injected with saline (Fig.  
366 4A and B). However, in male mice, a lack of *TLR4* was not protective against the 6-  
367 OHDA-induced decrease in TH immunoreactivity ( $p = 0.005$  in *TLR4*<sup>-/-</sup> and  $p = 0.0004$   
368 in *WT* mice who received saline).

369  
370 3.4. **Exposure to 6-OHDA increases Iba-1 immunoreactivity in the SN in**  
371 **female mice in a *TLR4*-dependent manner**

372 As *TLR4* is a critical molecule in the proinflammatory signaling, we evaluated the  
373 numbers of the microglial and astrocyte cells by assessing Iba-1 and GFAP  
374 immunoreactivity, respectively, in the SN. The 6-OHDA injection significantly increased  
375 Iba-1 immunoreactivity in the SN in *WT* female mice (Fig 5C,  $p = 0.0005$ ), but not in  
376 the SN in *TLR4*<sup>-/-</sup> female mice, than saline administered in respective control mice (Fig.  
377 5B and 5C). The enhanced Iba-1 immunoreactivity in the *WT* female mice exposed to  
378 6-OHDA was primarily observed in the SNc (Fig. 6C). Additionally, these animals  
379 presented with altered microglial morphology, i.e., exposure to 6-OHDA led to a  
380 change in morphology of the Iba-1-positive cells to an amoeboid phenotype (Fig. 6C

381 and 6D, M6-detailed). In contrast, no significant changes in microglial density and  
382 morphology were observed after 6-OHDA injection in *WT* and *TLR4*<sup>-/-</sup> male mice (Fig.  
383 5A, B, and Fig. 6A, B, respectively).

384 Further, no alterations in the GFAP immunoreactivity were observed, indicating no  
385 changes in the density of astrocytes in the experimental groups (Fig. 5A, 5B and 5D).  
386 However, altered astrocyte morphology was observed in groups treated with 6-OHDA,  
387 with characteristics of a reactive profile -thicker projections and increased cell size-  
388 (Fig. 6B, A2 and A4-detailed, 6D, A6-detailed), which are apparently milder in *TLR4*<sup>-/-</sup>  
389 females (Fig 6D, A8-detailed).

390 Finally, we failed to observe differences in Iba1 or GFAP fluorescence in the dorsal  
391 striatum and cortex (data not shown). All together, these results indicate that 6-OHDA  
392 increases Iba-1 immunoreactivity in the SN in female mice in a TLR4-dependent  
393 manner.

394  
395

#### 4. Discussion

396 The PD is a complex neurodegenerative disease and its pathogenesis remains  
397 unclear. However, the importance of neuroinflammation in the development and  
398 progression of PD is established. Convergent evidences suggest that TLRs represent  
399 a link between PD and inflammation; TLR4 is associated in mediating  
400 neuroinflammation and cell death in the Parkinson's model (Campolo et al., 2019;  
401 Noelker et al., 2013; Shao et al., 2019). For instance, alterations in the regulation of  
402 TLR4 are associated with the pathogenesis of  $\alpha$ -synucleinopathies (Fiebich et al.,  
403 2018). Considering the existence of relevant gender-related differences in the  
404 incidence, prevalence, and clinical features of PD, we evaluated the impact of animals'  
405 sex and TLR4 deficiency on the outcomes of 6-OHDA exposure. Furthermore, we

406 compared the extent of development of motor and non-motor impairments and  
407 neuroinflammation in *WT* and *TLR4*<sup>-/-</sup> male and female mice.

408 The 6-OHDA is an easily oxidisable analogue of dopamine, and when assimilated by  
409 DATs, causes oxidative damage selectively to the catecholaminergic neurons  
410 (Hernandez-Baltazar et al., 2017). We injected 6-OHDA into the right dorsomedial  
411 striatum region that is innervated by neurons originating from the SNc, VTA, frontal  
412 cortical area, and limbic system (Kirik et al., 1998). Thus, administration of 6-OHDA  
413 can trigger unilateral and partial damage to the DA neurons in the SNc, causing a slow  
414 and gradual motor deficit that makes it a more representative experimental tool for  
415 disease progression (Tieu, 2011). In the early phases of PD, a majority of the motor  
416 symptoms remain underrepresented, despite the neuronal damage and neurochemical  
417 alterations (Bonito-Oliva et al., 2014; McDowell and Chesselet, 2012; Willard et al.,  
418 2015; Zeng et al., 2018).

419 The findings in our study indicate that the behavior deficits in mice four-weeks after  
420 receiving 6-OHDA were associated with decreased number of TH-positive cells in the  
421 ST and SN, primarily in the SNc. Moreover, we found that the dopaminergic  
422 denervation induced by 6-OHDA in the SN was prevented by ablation of TLR4 in  
423 female, but not in male, mice.

424 The male and female *WT* mice administered with 6-OHDA failed to show significant  
425 motor alterations in the OFT, cylinder, and pole test. It is worthy to note that our model  
426 was designed to study the early stages of the neurodegenerative process, which can  
427 be inferred from the only ~30% loss of TH positive neurons in Fig. 4B. Thus, it is  
428 possible that neurodegeneration-dependent motor alterations would require longer  
429 time points after 6-OHDA injection than those evaluated herein, and more depletion of  
430 TH-positive cells in order to display major changes in motor phenotypes. Even so, we

431 observed only few motor alterations in the rotarod in the 4<sup>th</sup> week and marked changes  
432 in apomorphine test, in mice injected with 6-OHDA in both WT and *TLR4*<sup>-/-</sup> groups.  
433 The apomorphine rotation is the most sensitive test for detecting early, partial lesions  
434 in the nigrostriatal system, since significant rotation can be detected from 30–50% loss  
435 of DA cell bodies in the SN (Kirik et al., 1998). Even though the neuronal loss caused  
436 by 6-OHDA was lower in female *TLR4*<sup>-/-</sup> (approximately 17% of neuronal death)  
437 compared to WT (approximately 30% cell death), this damage was able to induce  
438 rotational alterations, and also falls in the rotarod test. Physical condition, balance  
439 coordination, and motor-planning were also impaired in the rotarod test, which does  
440 not always correlate with dopaminergic loss, as previously described (Liu et al., 2008).  
441 We observed that the performance on the apomorphine and rotarod test did not  
442 correlate well with relative TH loss, especially considering the *TLR4*<sup>-/-</sup> mice, which had  
443 a poor performance compared with WT even when not treated with 6-OHDA. These  
444 can be explained by two factors, the TH quantification and the *TLR4* knockout  
445 intrinsic effect. First, we hypothesize that it is more likely that this lack of correlation  
446 may result from the fact that TH staining quantification is presented here as a ratio  
447 between ipsilateral and contralateral side of the SN of each individual. This  
448 assessment of TH staining gives a more accurate picture of the relative loss of TH-  
449 positive cells in each individual, but differences in the dopaminergic content between  
450 untreated *TLR4*<sup>-/-</sup> animals are not comparable. Besides, we did not assess TH staining  
451 in motor brain areas that could be more affected than the SN itself, in which such a  
452 correlation could be observed. These questions remain to be further elucidated.  
453 Furthermore, the lack of *TLR4* itself triggers motor deficits. It is reported that *TLR4*<sup>-/-</sup>  
454 mice present impaired motor coordination associated to cerebellum thickness (Zhu et  
455 al., 2016) and loss in general locomotion influenced by age and gender (specifically

456 young female mice) (Potter et al., 2019). In the present work, the genotype *TLR4*<sup>-/-</sup> is  
457 contributing to locomotor damage in PD model.

458 The non-motor symptoms, including cognitive and neuropsychiatric symptoms,  
459 emerge earlier than motor features in PD patients. In the present study, the animals  
460 exposed to 6-OHDA presented depressive-like behavior and spatial memory  
461 impairments before the motor modifications, consistent with results of previous studies  
462 (Campos et al., 2013; Slaughter et al., 2001). Moreover, all such early non-motor  
463 changes occurred mainly in male mice injected with 6-OHDA.

464 Animals lacking TLR4 failed to display non-motor impairments when exposed to 6-  
465 OHDA, in both sexes. Consistent with these data, a recent work has shown that *TLR4*<sup>-/-</sup>  
466 mice were protected from mood depression by MPTP exposure (Campolo et al.,  
467 2019) and TLR4 deficiency resulted in beneficial effects on spatial learning and/or  
468 memory in both males and females (Potter et al., 2019).

469 The neuronal injury caused by 6-OHDA is associated with neuroinflammation, i.e.,  
470 microgliosis and astrogliosis (Gasparotto et al., 2017; Walsh et al., 2011). Here, apart  
471 from altered astrocytes morphology, no density alterations in GFAP were observed.  
472 The administration of 6-OHDA led to microgliosis only in the female mice; no glial  
473 reactivation was observed in WT or *TLR4*<sup>-/-</sup> male mice who received the toxin.

474 Therefore, we postulated that male mice underwent a rapid oxidative damage induced  
475 by 6-OHDA that activated an early immune response and triggered neuronal  
476 impairment, as revealed by the behavior deficits in the first two-weeks after injecting 6-  
477 OHDA. However, in male mice, TLR4 was partly involved in the 6-OHDA neuropathy,  
478 as its knocking-out prevented the initial non-motor deficit, but was unable to stop the  
479 progression of damage and the subsequent motor loss or neuronal death. After 30-  
480 days, the glial cells in male mice had probably lost reactivity, and neuronal damage

481 had already been established.

482 In turn, female mice had an increase microglial reactivity in the SNc due to 6-OHDA  
483 after 30 days; moreover, the lack of TLR4 protected female mice against  
484 neuroinflammation and neuronal death. Female mice had dopaminergic neuron death  
485 similar to that in male mice, but females did not display early depressive-like behavior  
486 and memory impairment within the first few weeks after toxin administration. Women  
487 with PD are reported to show an increased susceptibility to depressive-like behaviors  
488 (Slaughter et al., 2001), but it is possibly a treatment side-effect (Pavon et al., 2010).  
489 Depressive women with PD have a pronounced depletion of BDNF and GDNF  
490 (Schamne et al., 2018), which is also influenced by reduction in estrogen levels at  
491 menopause (Walf and Frye, 2006). However, we have analyzed effects in adult female  
492 mice without interference by drugs or estrogen cycling.

493 Females have more robust and potentially protective humoral and cell-mediated  
494 immune responses after antigenic challenge than their male counterparts. Estrogen  
495 regulates antioxidant and neuroprotective mechanisms (Moosmann and Behl, 1999)  
496 that enhance the ability of macrophages to produce inflammatory mediators and  
497 cytokines upon subsequent TLR activation (Calippe et al., 2010), and also increase  
498 surface expression of TLR4 (Rettew et al., 2009). Estrogen can also alter the  
499 expression of DAT and reuptake of dopamine (Jurado-Coronel et al., 2018), and is  
500 related to higher circulating dopamine levels in females (Joniec et al., 2009),  
501 conferring lower susceptibility to PD. However, the incidence of PD increases due to  
502 menopause in women (van Dijkman et al., 2018), although estrogen replacement  
503 therapy protects from the development of dementia in PD (Marder et al., 1998). In  
504 ovariectomized mice challenged with 6-OHDA (Murray et al., 2003) and MPTP (Miller  
505 et al., 1998), estrogen supplementation attenuates dopamine depletion. Zarate et al.

506 have indicated differences in sex in inhibiting endoplasmic reticulum stress, exclusively  
507 in female mice, as estradiol protects the DA neurons from death (Zarate et al., 2020).  
508 Therefore, we postulate that in females, estrogen may activate antioxidant responses,  
509 exerting a primary neuronal protection against 6-OHDA. As estrogen also activates  
510 TLR4, triggering strong microglial reactivity and a robust immune response, in the  
511 absence of this receptor, microgliosis and dopaminergic denervation are prevented.  
512 These are interesting perspectives for future studies involving investigation of estrogen  
513 levels related to inflammatory and oxidative status in PD.

514

## 5. Conclusion

515 We described the influence of sex on 6-OHDA-induced neuroinflammation and  
516 neurodegeneration mediated by TLR4. The receptor plays a pivotal role in regulating  
517 neuroinflammation and consequent dopaminergic denervation, primarily in female  
518 mice. Moreover, male mice show an early response to 6-OHDA damage, presenting  
519 with depression-like behavior and memory impairments in the first two weeks; this  
520 condition is attenuated by *TLR4*<sup>-/-</sup>. The TLR4 may be necessary for regular motor  
521 activity, as knockout mice that received 6-OHDA and/or saline had more impaired  
522 locomotion than WT mice. Thus, TLR4 appears to have a dual effect on the  
523 pathogenesis of PD. Additionally, we found substantial differences in immune  
524 responses and behavior alterations between male and female mice to dopaminergic  
525 denervation, that reveal a resistance of females to the 6-OHDA neurotoxicity related to  
526 TLR4, reinforced the existence of sex-biased alterations in PD.

527 However, further studies are needed to understand the effects on glial and neuronal  
528 cells in both sexes during development of neuroinflammation and neurodegeneration  
529 in dopaminergic denervation, by evaluating the cell profiles at the beginning of the  
530 damage until establishment of locomotor losses. A better understanding of hormonal

531 parameters and monitoring of the disease stages could be essential to define the  
532 different approaches related to sex and time of intervention. Finally, we believe that an  
533 understanding of the involvement of TLR4 in pathophysiology of PD is a crucial factor  
534 for developing therapeutic tools, primarily to intervene in the molecular basis of non-  
535 motor alterations in this immune-mediated neurodegenerative disease.

536

### 537 **Acknowledgments**

538 We would like to thank Brazilian public universities and Brazilian science and research  
539 agencies that funded this project. We also thank Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for  
540 English language editing.

541

### 542 **Funding**

543 This work was supported by funds from the Brazilian research agencies Conselho  
544 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) #408435/2018  
545 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)  
546 #17/2551-0000984-3 and #16/2551-0000499-4, Propesq-UFRGS and Coordenação  
547 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

548

### 549 **Declaration of competing interest**

550 Declarations of competing interest: None

### 551 **Author contributions**

552 NS carried out the experimental planning, surgical procedure, immunofluorescence,  
553 data analysis and manuscript writing; SCL carried out the behavioral tests and their  
554 data collection; JG carried out the surgical procedure, tissue collection,  
555 immunofluorescence and provided revisions to scientific content of manuscript; RMG

556 carried out animal handling and care, participated in surgery and euthanasia; CTR  
557 carried out surgical procedure, tissue collection and preparation; DO participated in  
558 immunofluorescence procedure and data collection; POB carried out animal perfusion;  
559 CBP participated in the behavior tests and conducted their data collection; JPA  
560 participated in the surgical procedure; LS participated in the data analysis; JO helped  
561 to data analysis and draft the manuscript; FS provided the animals; JCFM provided  
562 funding and discussed design conceiving; AZF provided access to crucial research  
563 components and revisions to scientific content of manuscript; RDP provided access to  
564 crucial research components and revisions to scientific content of manuscript; DPG  
565 provided funding, convinced of the study, coordinated its design and reviewed the  
566 manuscript.

567

568

## 6. References

569

570 ©2010 Allen Institute for Brain Science. Allen Human Brain Atlas. Available  
571 from: [human.brain-map.org](http://human.brain-map.org)

572 Aguiar, A., Duzzioni, M., Remor, A., Tristão, F., Matheus, F., Raisman-Vozari, R.,  
573 Latini, A., Prediger, R., 2016. Moderate-Intensity Physical Exercise Protects Against  
574 Experimental 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism Through Nrf2-  
575 Antioxidant Response Element Pathway. *Neurochemical research* 41.

576 Ahmad, A., Crupi, R., Campolo, M., Genovese, T., Esposito, E., Cuzzocrea, S., 2013.  
577 Absence of TLR4 Reduces Neurovascular Unit and Secondary Inflammatory Process  
578 After Traumatic Brain Injury in Mice. *PloS one* 8.

579 Bonito-Oliva, A., Masini, D., Fisone, G., gilberto.fisone@ki.se, 2014. A mouse model of  
580 non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions  
581 targeting affective dysfunctions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8.

582 Calippe, B., Douin-Echinard, V., Delpy, L., Laffargue, M., Lélou, K., Krust, A., Pipy, B.,  
583 Bayard, F., Arnal, J.-F., Guéry, J.-C., Gourdy, P., 2010. 17 $\beta$ -Estradiol Promotes TLR4-  
584 Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor  $\alpha$   
585 Signaling in Macrophages In Vivo.

586 Campolo, M., Paterniti, I., Siracusa, R., Filippone, A., Esposito, E., Cuzzocrea, S.,  
587 2019. TLR4 Absence Reduces Neuroinflammation and Inflammasome Activation in  
588 Parkinson's Diseases in Vivo Model. *Brain, behavior, and immunity* 76.

589 Campos, F., Carvalho, M., Cristovão, A., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A., Kim, Y.,  
590 Sousa, N., 2013. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor  
591 symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7.

592 Chaudhuri, K., L, Y., Martinez-Martin, P., 2005. The Non-Motor Symptom Complex of  
593 Parkinson's Disease: A Comprehensive Assessment Is Essential. *Current neurology*  
594 *and neuroscience reports* 5.

595 Colombo, D., Abbruzzese, G., Antonini, A., Barone, P., Bellia, G., Franconi, F., Simoni,  
596 L., Attar, M., Zagni, E., Haggiag, S., Stocchi, F., 2015. The "Gender Factor" in  
597 Wearing-Off among Patients with Parkinson's Disease: A Post Hoc Analysis of DEEP  
598 Study. *ScientificWorldJournal* 2015.

599 de Oliveira, P., Ben, J., Matheus, F., Schwarzbald, M., Moreira, E., Rial, D., R, W.,  
600 Prediger, R., 2017. Moderate Traumatic Brain Injury Increases the Vulnerability to  
601 Neurotoxicity Induced by Systemic Administration of 6-hydroxydopamine in Mice.  
602 *Brain research* 1663.

603 Fiebich, B., Batista, C., Saliba, S., Yousif, N., de Oliveira, A., 2018. Role of Microglia  
604 TLRs in Neurodegeneration. *Frontiers in cellular neuroscience* 12.

605 Fuzzati-Armentero, M.T., Cerri, S., Blandini, F., 2019. Peripheral-Central  
606 Neuroimmune Crosstalk in Parkinson's Disease: What Do Patients and Animal Models  
607 Tell Us? *Front Neurol* 10, 232.

608 Gasiowski, K., Brokos, B., Echeverria, V., Barreto, G.E., Leszek, J., 2018. RAGE-  
609 TLR Crosstalk Sustains Chronic Inflammation in Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*  
610 55, 1463-1476.

611 Gasparotto, J., Ribeiro, C., Bortolin, R., Somensi, N., Rabelo, T., Kunzler, A., Souza,  
612 N., Pasquali, M., Moreira, J., Gelain, D., 2017. Targeted Inhibition of RAGE in  
613 Substantia Nigra of Rats Blocks 6-OHDA-induced Dopaminergic Denervation.  
614 *Scientific reports* 7.

615 Haaxma, C.A., Bloem, B.R., Borm, G.F., Oyen, W.J.G., Leenders, K.L., Eshuis, S.,  
616 Booij, J., Dluzen, D.E., Horstink, M., 2007. Gender differences in Parkinson's disease,  
617 *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Vol. 78, pp. 819-824.

618 Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L., Villanueva-Olivo, A., 2017. The 6-  
619 hydroxydopamine Model and Parkinsonian Pathophysiology: Novel Findings in an  
620 Older Model. *Neurologia (Barcelona, Spain)* 32.

621 Hirsch, E.C., Standaert, D.G., 2020. Ten Unsolved Questions About  
622 Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord*.

623 Ibrahim, Z.A., Armour, C.L., Phipps, S., Sukkar, M.B., 2013. RAGE and TLRs:  
624 relatives, friends or neighbours? *Mol Immunol* 56, 739-744.

625 Isingrini, E., Camus, V., Le Guisquet, A., Pingaud, M., Devers, S., Belzung, C., 2010.  
626 Association Between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS)  
627 Procedures With a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. *PloS one*  
628 5.

629 Joniec, I., Ciesielska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I., Przybylkowski, A., Czlonkowska,  
630 A., Czlonkowski, A., 2009. Age- And Sex-Differences in the Nitric Oxide Synthase  
631 Expression and Dopamine Concentration in the Murine Model of Parkinson's Disease  
632 Induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain research* 1261.

633 Jurado-Coronel, J., Cabezas, R., Ávila Rodríguez, M., Echeverria, V., García-Segura,  
634 L., Barreto, G., 2018. Sex Differences in Parkinson's Disease: Features on Clinical  
635 Symptoms, Treatment Outcome, Sexual Hormones and Genetics. *Frontiers in*  
636 *neuroendocrinology* 50.

637 Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A., 1998. Characterization of Behavioral and  
638 Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine  
639 System Induced by Intrastratial 6-hydroxydopamine in the Rat. *Experimental*  
640 *neurology* 152.

641 Liu, Y., Qin, L., Wilson, B., Wu, X., Qian, L., Granholm, A.C., Crews, F.T., Hong, J.S.,  
642 2008. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and  
643 motor behavioral deficits. *Neurotoxicology* 29, 864-870.

644 Lucien, S., Raymond, C., Bernard, T., Pierre, S., 1985. The tail suspension test: A new  
645 method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.

646 Mabandla, M., Russell, V., 2010. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of  
647 6-hydroxydopamine in maternally separated rats. *Behavioural brain research* 211.

648 Mack, J., Moura, T., Lanznaster, D., Bobinski, F., Massari, C., Sampaio, T., Schmitz,  
649 A., Souza, L., Walz, R., Tasca, C., Poli, A., Doty, R., Dafre, A., Prediger, R., 2018.  
650 Intranasal Administration of Sodium Dimethyldithiocarbamate Induces Motor Deficits  
651 and Dopaminergic Dysfunction in Mice. *Neurotoxicology* 66.

652 Marder, K., Tang, M.X., Alfaro, B., Mejia, H., Cote, L., Jacobs, D., Stern, Y., Sano, M.,  
653 Mayeux, R., 1998. Postmenopausal estrogen use and Parkinson's disease with and  
654 without dementia. *Neurology* 50, 1141-1143.

655 Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H., N, O., 1997. Pole Test Is a Useful Method for  
656 Evaluating the Mouse Movement Disorder Caused by Striatal Dopamine Depletion.  
657 *Journal of neuroscience methods* 73.

658 McDowell, K., Chesselet, M., 2012. Animal models of the non-motor features of  
659 Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 46.

660 Miller, D., Ali, S., O'Callaghan, J., Laws, S., 1998. The Impact of Gender and Estrogen  
661 on Striatal Dopaminergic Neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*  
662 844.

663 Momeni, S., Segerström, L., Roman, E., 2015. Supplier-dependent differences in  
664 intermittent voluntary alcohol intake and response to naltrexone in Wistar rats. *Front*  
665 *Neurosci* 9.

666 Moosmann, B., Behl, C., 1999. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens  
667 and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl*  
668 *Acad Sci U S A* 96, 8867-8872.

669 MT, F.-A., S, C., F, B., 2019. Peripheral-Central Neuroimmune Crosstalk in  
670 Parkinson's Disease: What Do Patients and Animal Models Tell Us? *Frontiers in*  
671 *neurology* 10.

672 Murray, H., Pillai, A., McArthur, S., Razvi, N., Datla, K., Dexter, D., Gillies, G., 2003.  
673 Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the  
674 nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in  
675 males and females. *Neuroscience* 116.

676 Nilsson, F.M., Kessing, L.V., Sorensen, T.M., Andersen, P.K., Bolwig, T.G., 2002.  
677 Major depressive disorder in Parkinson's disease: a register-based study. *Acta*  
678 *Psychiatr Scand* 106, 202-211.

679 Noelker, C., Morel, L., Lescot, T., Osterloh, A., Alvarez-Fischer, D., Breloer, M.,  
680 Henze, C., Depboylu, C., Skrzydelski, D., Michel, P.P., Dodel, R.C., Lu, L., Hirsch,  
681 E.C., Hunot, S., Hartmann, A., 2013. Toll like receptor 4 mediates cell death in a  
682 mouse MPTP model of Parkinson disease. *Sci Rep* 3, 1393.

683 Okun, E., Griffioen, K.J., Lathia, J.D., Tang, S.C., Mattson, M.P., Arumugam, T.V.,  
684 2009. Toll-Like Receptors in Neurodegeneration. *Brain Res Rev* 59, 278-292.

685 Pajares, M., A, I.R., Manda, G., Bosca, L., Cuadrado, A., 2020. Inflammation in  
686 Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells* 9.

687 Pavon, J.M., Whitson, H.E., Okun, M.S., 2010. Parkinson's disease in women: a call  
688 for improved clinical studies and for comparative effectiveness research. *Maturitas* 65,  
689 352-358.

690 Potter, O.V., Giedraitis, M.E., Johnson, C.D., Cox, M.N., Kohman, R.A., 2019. Young  
691 and aged TLR4 deficient mice show sex-dependent enhancements in spatial memory  
692 and alterations in interleukin-1 related genes. *Brain Behav Immun* 76, 37-47.

693 Rettew, J., Huet, Y., Marriott, I., 2009. Estrogens Augment Cell Surface TLR4  
694 Expression on Murine Macrophages and Regulate Sepsis Susceptibility in Vivo.  
695 *Endocrinology* 150.

696 Rial, D., Castro, A., Machado, N., Garção, P., Gonçalves, F., Silva, H., Tomé, A.,  
697 Köfalvi, A., Corti, O., Raisman-Vozari, R., Cunha, R., Prediger, R., 2014. Behavioral  
698 phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of  
699 Parkinson's disease. *PloS one* 9.

700 Riedel, O., Klotsche, J., Spottke, A., Deuschl, G., Forstl, H., Henn, F., Heuser, I.,  
701 Oertel, W., Reichmann, H., Riederer, P., Trenkwalder, C., Dodel, R., Wittchen, H.U.,  
702 2010. Frequency of dementia, depression, and other neuropsychiatric symptoms in  
703 1,449 outpatients with Parkinson's disease. *J Neurol* 257, 1073-1082.

704 Roh, J.S., Sohn, D.H., 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory  
705 Diseases. *Immune Netw* 18.

706 Schamne, M., Mack, J., Morett, i.M., Matheus, F., Walz, R., Lanfumey, L., Prediger,  
707 R., 2018. The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on  
708 Anhedonic- And Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: The Role of  
709 Neurotrophic Factors. *Neurotoxicity research* 34.

710 Shao, Q., Chen, Y., Li, F., Wang, S., Zhang, X., Yuan, Y., Chen, N., 2019. TLR4  
711 Deficiency Has a Protective Effect in the MPTP/probenecid Mouse Model of  
712 Parkinson's Disease. *Acta pharmacologica Sinica* 40.

713 Slaughter, J.R., Slaughter, K.A., Nichols, D., Holmes, S.E., Martens, M.P., 2001.  
714 Prevalence, Clinical Manifestations, Etiology, and Treatment of Depression in  
715 Parkinson's Disease.

716 Tieu, K., 2011. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold  
717 Spring Harbor perspectives in medicine* 1.

718 Troncoso-Escudero, P., Parra, A., Nassif, M., Vidal, R.L., 2018. Outside in: Unraveling  
719 the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease. *Front Neurol*  
720 9, 860.

721 Van Den Eeden, S., Tanner, C., Bernstein, A., Fross, R., Leimpeter, A., Bloch, D.,  
722 Nelson, L., 2003. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and  
723 Race/Ethnicity. *American journal of epidemiology* 157.

724 van Dijkman, S., de Jager, N., Rauwé, W., Danhof, M., Della, P., O, 2018. Effect of  
725 Age-Related Factors on the Pharmacokinetics of Lamotrigine and Potential  
726 Implications for Maintenance Dose Optimisation in Future Clinical Trials. *Clinical  
727 pharmacokinetics* 57.

728 Vriend, C., Pattij, T., van der Werf, Y.D., Voorn, P., Booij, J., Rutten, S., Berendse,  
729 H.W., van den Heuvel, O.A., 2014. Depression and impulse control disorders in  
730 Parkinson's disease: two sides of the same coin? *Neurosci Biobehav Rev* 38, 60-71.

731 Walf, A.A., Frye, C.A., 2006. A review and update of mechanisms of estrogen in the  
732 hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior.  
733 *Neuropsychopharmacology* 31, 1097-1111.

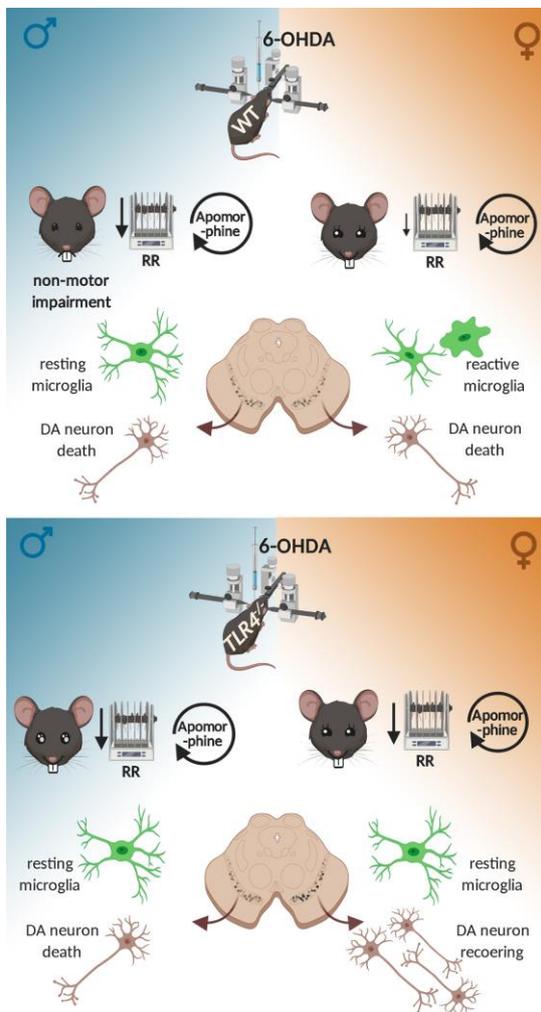
734 Walsh, S., Finn, D., Dowd, E., 2011. Time-course of Nigrostriatal Neurodegeneration  
735 and Neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced Axonal and Terminal  
736 Lesion Models of Parkinson's Disease in the Rat. *Neuroscience* 175.

737 Wang, Q., Liu, Y., Zhou, J., 2015. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Its  
738 Potential as Therapeutic Target. *Translational neurodegeneration* 4.

739 Willard, A., Bouchard, R., Gittis, A., 2015. Differential degradation of motor deficits  
 740 during gradual dopamine depletion with 6-hydroxydopamine in mice. *Neuroscience*  
 741 301.  
 742 Zarate, S., Pandey, G., Chilukuri, S., Garcia, J., Cude, B., Storey, S., Salem, N.,  
 743 Bancroft, E., Hook, M., Srinivasan, R., 2020. Cytisine is neuroprotective in female but  
 744 not male 6-hydroxydopamine lesioned parkinsonian mice and acts in combination with  
 745 17- $\beta$ -estradiol to inhibit apoptotic endoplasmic reticulum stress in dopaminergic  
 746 neurons. *Journal of neurochemistry*.  
 747 Zeng, X.S., Geng, W.S., Jia, J.J., 2018. Neurotoxin-Induced Animal Models of  
 748 Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment, *ASN Neuro*. Vol. 10.  
 749 Zhu, J.W., Li, Y.F., Wang, Z.T., Jia, W.Q., Xu, R.X., 2016. Toll-Like Receptor 4  
 750 Deficiency Impairs Motor Coordination. *Front Neurosci* 10, 33.  
 751

752  
 753

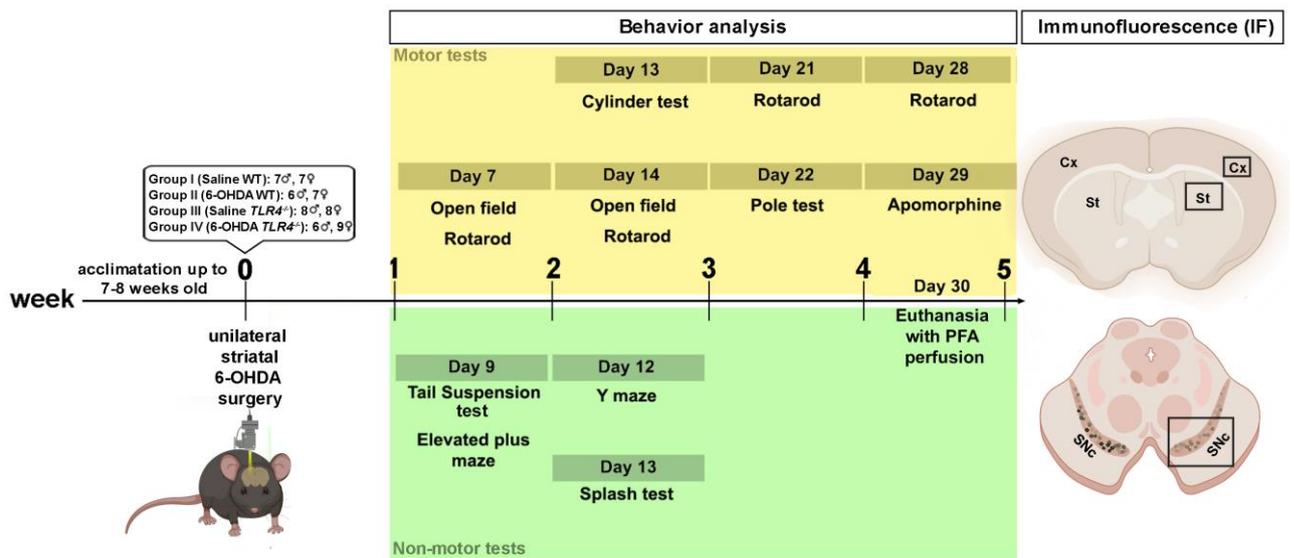
## 7. Figure Captions



754

## 755 Graphical Abstract

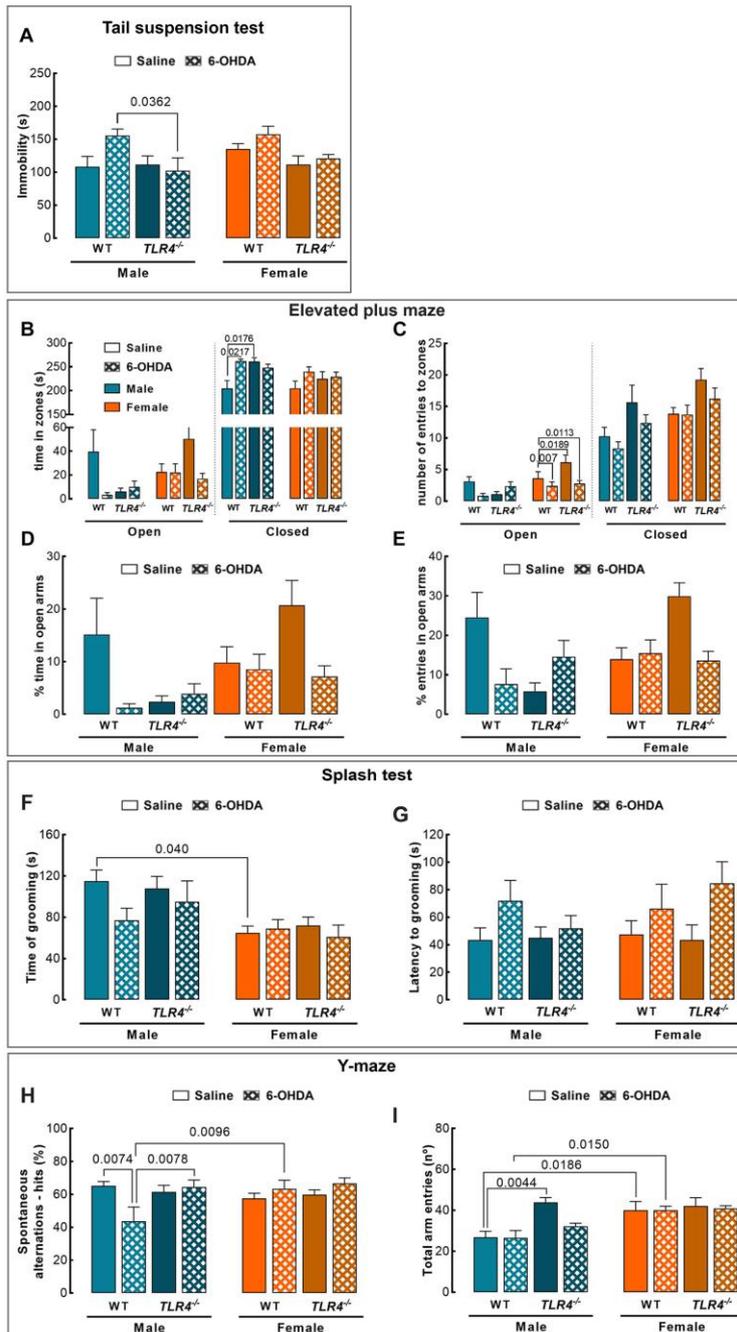
756 Created with BioRender.com.



757

758 **Fig. 1. Experimental timeline.** Adult C57BL/6 mice are separated into four groups  
 759 according to genotype—13 wildtype (*WT*) male, 14 *WT* female, 13 *TLR4*-knockout  
 760 (*TLR4*<sup>-/-</sup>) male, and 16 *TLR4*<sup>-/-</sup> female mice—and intrastriatal saline or 6-OHDA  
 761 treatment is administered post stereotaxic surgery. During the 30 days following  
 762 surgery, different behavioral tests are performed, and brain samples are isolated on  
 763 the 30<sup>th</sup> day after 6-OHDA injection for immunofluorescence analysis.

764



765

766

767

768

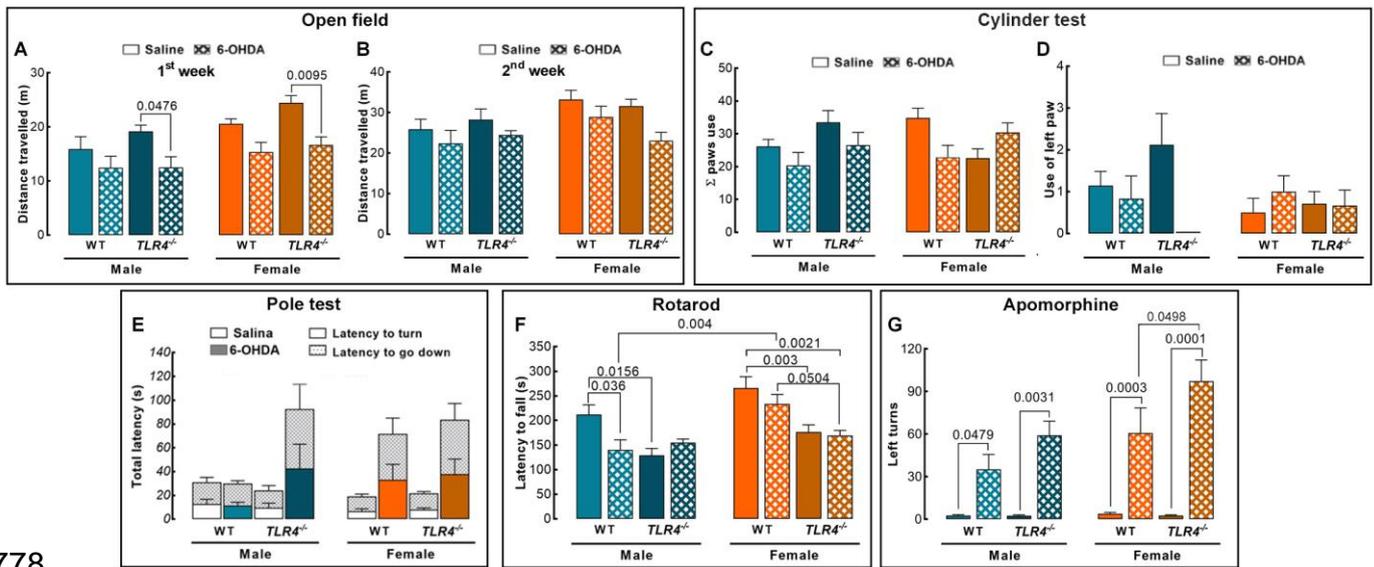
769

770

771

**Fig. 2. Evaluation of non-motor alterations in the first two-weeks after injecting 6-OHDA in male and female WT and TLR4<sup>-/-</sup> mice.** (A) The immobility time during 5 min of tail suspension test is evaluated seven days after 6-OHDA treatment. In the elevated-plus maze test, the (B) time spent in open zones, (C) number of entries to zones, (D) percent time spent in open arms, and (E) percent entries in open arms are evaluated. The splash test helped evaluate the (F) total time of self-cleaning during 6

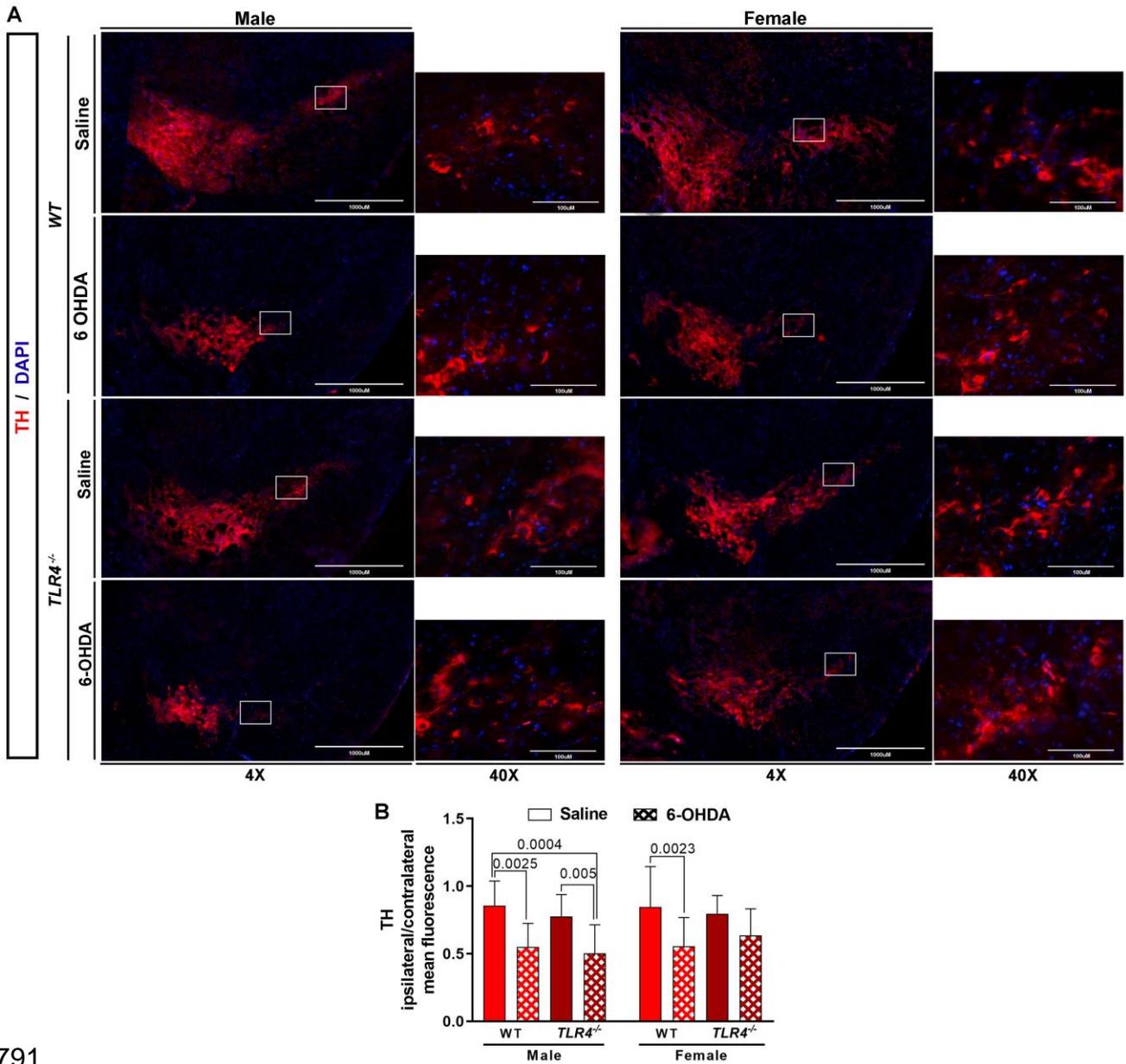
772 min and (G) latency to grooming. The Y-maze test helped monitor the (H) percentage  
 773 of hits in spontaneous alternations and (I) total arm entries. Statistical analysis were  
 774 performed by three-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post-hoc* test ( $p < 0.05$   
 775 values between groups are shown). Group I: 7 males and 7 females; group II: 6 males  
 776 and 7 females; group II 8 males and 8 females; group IV: 6 males and 9 females.  
 777



778  
 779 **Fig. 3. Evaluation of locomotor and motor alterations by the intranigral injection**  
 780 **of 6-OHDA in male and female *WT* and *TLR4*<sup>-/-</sup> mice.** The total distance travelled  
 781 (m) during 5 min in the Open Field Test (OFT) are evaluated at the (A) 7<sup>th</sup> day- 1<sup>st</sup>  
 782 14<sup>th</sup> day- 2<sup>nd</sup> week after surgery. The Cylinder test helped analyze the  
 783 sum of (C) use of all paws and (D) contralateral (left) paw. (E) The Pole test helped  
 784 evaluate the latency to turn and descend the pole. (F) The latency to fall from the  
 785 Rotarod is evaluated. (G) The evaluation of animal rotational behavior induced by  
 786 apomorphine injection. Statistical analysis were performed by three-way ANOVA  
 787 followed by Newman-Keuls *post-hoc* test ( $p < 0.05$  values between groups are shown).  
 788 Group I: 7 males and 7 females; group II: 6 males and 7 females; group II 8 males and

789 8 females; group IV: 6 males and 9 females.

790



791

792 **Fig. 4. Effect of administering 6-OHDA on immunofluorescence staining of**

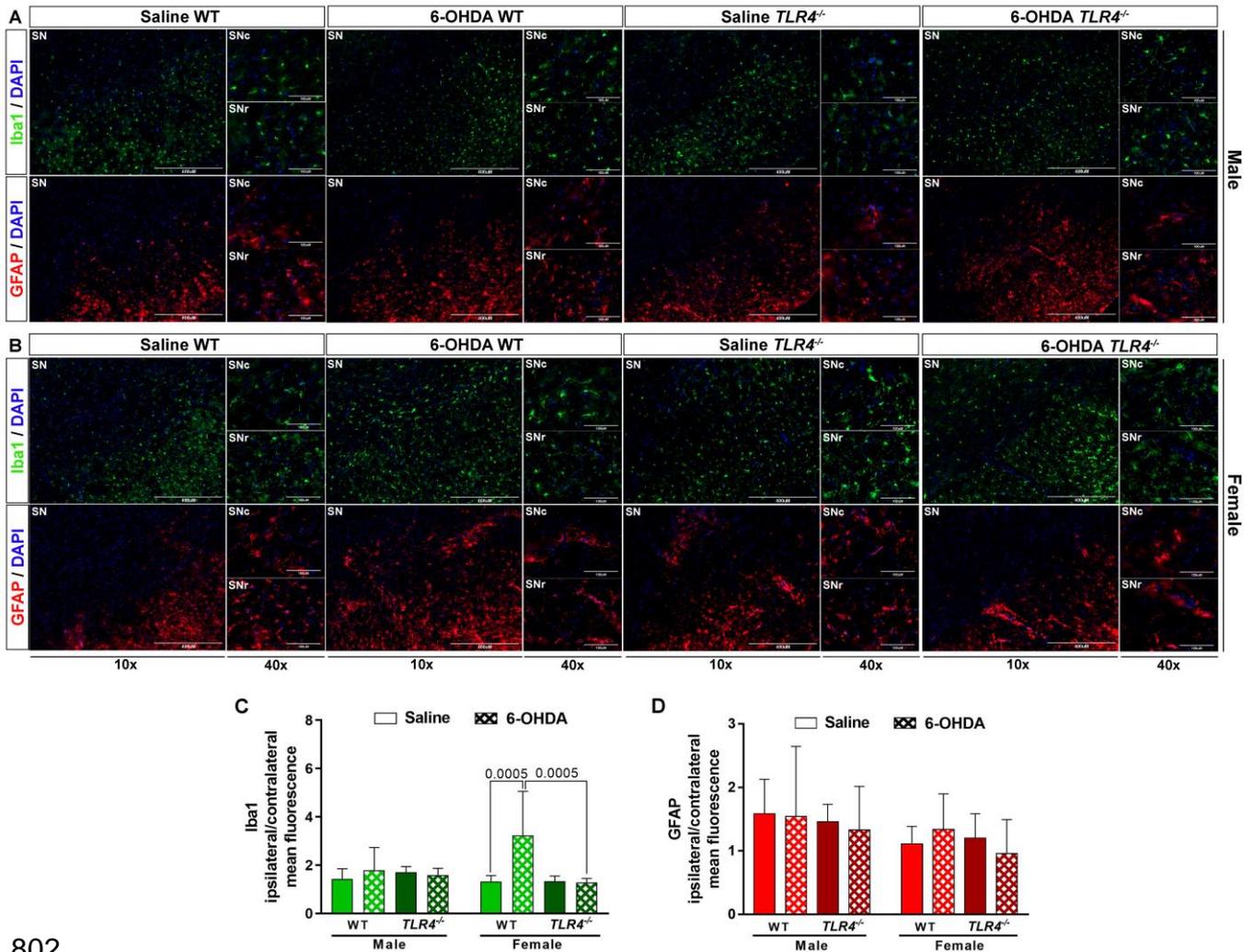
793 **tyrosine hydroxylase (TH) in the substantia nigra in the *WT* or *TLR4*<sup>-/-</sup> male and**

794 **female mice. Representative images of (A) male and (B) female mice are shown at**

795 **different magnifications (4x in the left panels and 40x in right, smaller panels). (C) The**

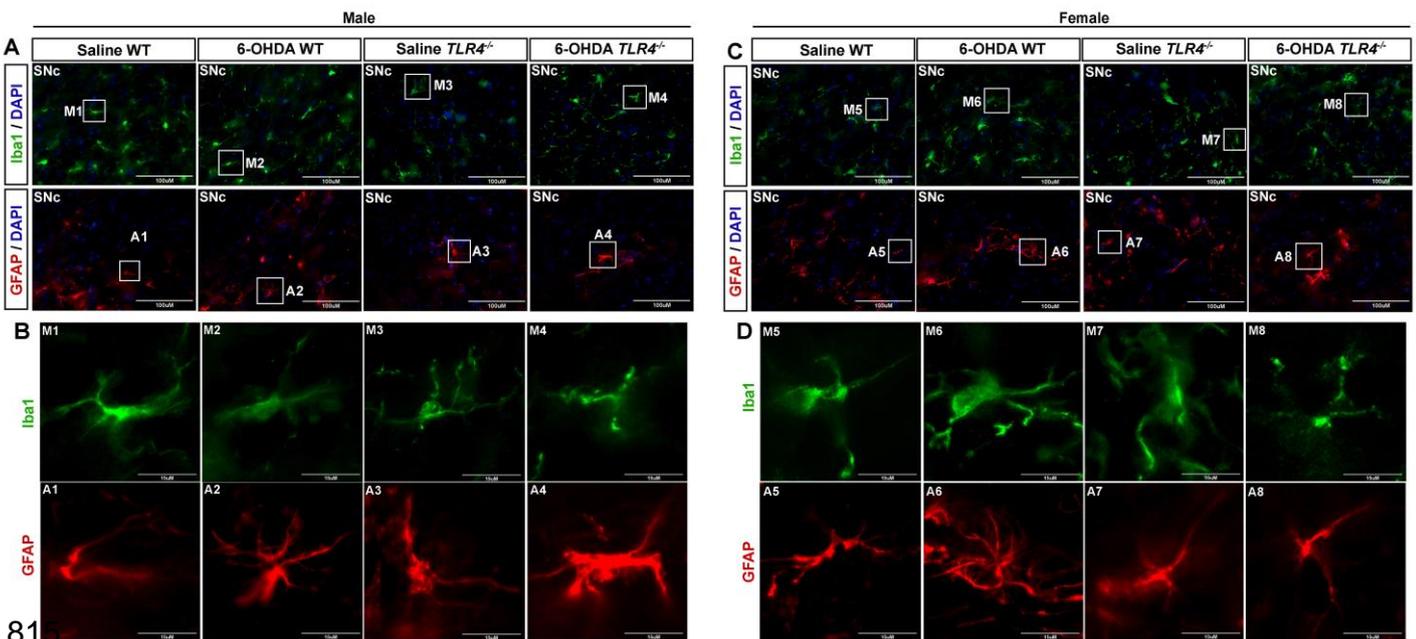
796 **mean fluorescence quantification of the ipsilateral in relation to contralateral side.**

797 Statistical analysis were performed by three-way ANOVA followed by Newman-Keuls  
 798 *post-hoc* test ( $p < 0.05$  values between groups are shown). Group I: 7 males and 7  
 799 females; group II: 6 males and 7 females; group III: 8 males and 8 females; group IV: 6  
 800 males and 9 females.  
 801



802  
 803 **Fig. 5. Effect of administering 6-OHDA on immunofluorescence staining of Iba-1**  
 804 **and GFAP in the substantia nigra in WT or TLR4<sup>-/-</sup> male and female mice.**  
 805 Representative images of the complete substantia nigra region in (A) male and (B)  
 806 female mice are shown at 10x magnification, along with details of the substantia nigra  
 807 reticulata (SNr) and substantia nigra pars compacta (SNc) at 40x magnification. (C)

808 The mean fluorescence quantification of the ipsilateral in relation to contralateral sides  
 809 of Iba-1 and GFAP. Statistical analysis were performed by three-way ANOVA followed  
 810 by Newman-Keuls *post-hoc* test ( $p < 0.05$  values between groups are shown). It was  
 811 evaluated two slices of each animal in group I: 5 males and 5 females, group II: 5  
 812 males and 5 females, group III 5 males and 5 females and group IV: 5 males and 5  
 813 females.  
 814



816 **Fig. 6. Effect of administering 6-OHDA on the morphology of astrocytes and**  
 817 **microglial cells in the SNc in WT and TLR4<sup>-/-</sup> male and female mice.** (A) The male  
 818 ipsilateral SNc microglia (Iba-1, green) and astrocytes (GFAP<sup>+</sup>, red) are shown at 40x  
 819 magnification. (B) The microglia M1-M4 and astrocytes A1-A4 cells. (C) The female  
 820 ipsilateral SNc microglia and astrocytes are shown in 40x magnification; (D) The  
 821 microglia M5-M8 and astrocytes A5-A8 cells.

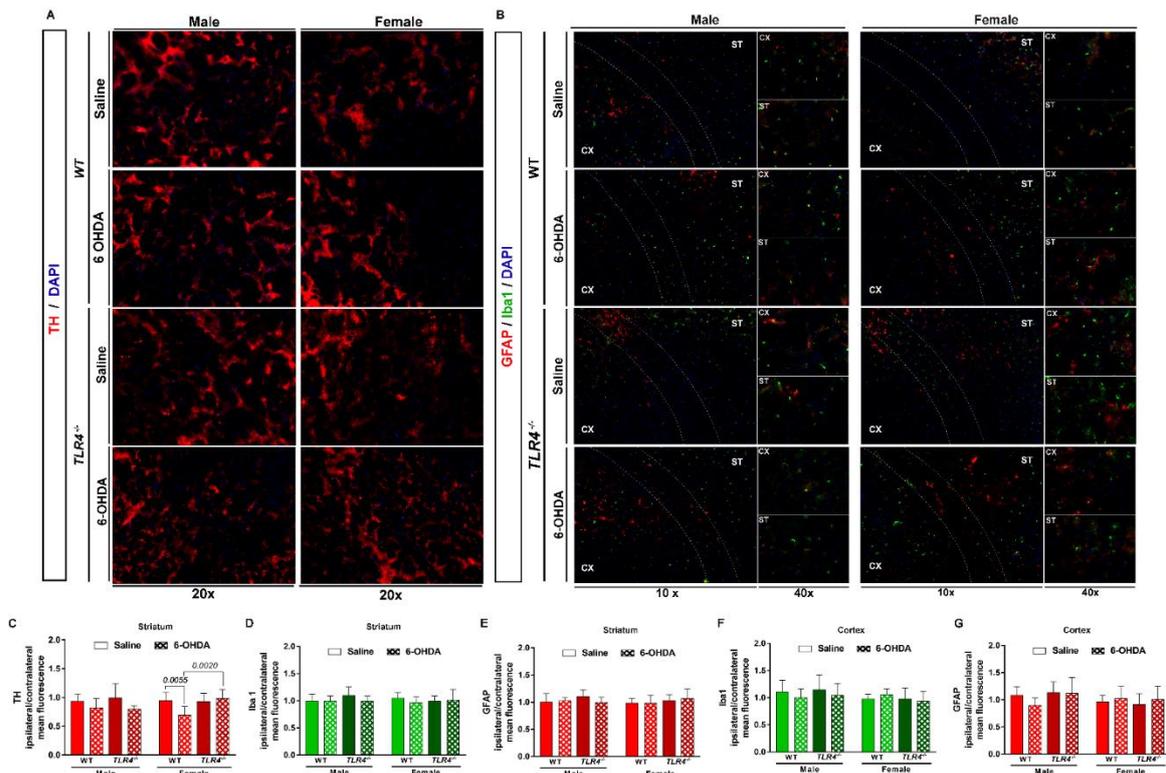
822

823

## Resultados complementares ao artigo, não publicados

### *Avaliação de neurônio dopaminérgicos, micróglias e astrócitos no estriado*

Após 30 dias da administração intraestriatal de 6-OHDA avaliamos o conteúdo de neurônios dopaminérgico no estriado dos animais. A imunofluorescência de TH não foi alterada significativamente no estriado de camundongos machos, enquanto que nas fêmeas selvagens (WT) houve diminuição neuronal dopaminérgica induzida por 6-OHDA. Fêmeas nocaute para o gene TLR4 que receberam a toxina (6-OHDA TLR4<sup>-/-</sup>) foram protegidas contra a denervação dopaminérgica, aumentando o imunoconteúdo de TH em relação aos animais 6-OHDA WT (Figura complementar 1 A e C. Através de microscopia também acessamos a imunofluorescência de Iba1 e GFAP, a fim de avaliar as micróglias e astrócitos, respectivamente, no estriado e córtex dorsal dos camundongos. Não encontramos nenhuma diferença significativa na quantidade de fluorescência nem na morfologia das células (Figura complementar 1 B, D- G).

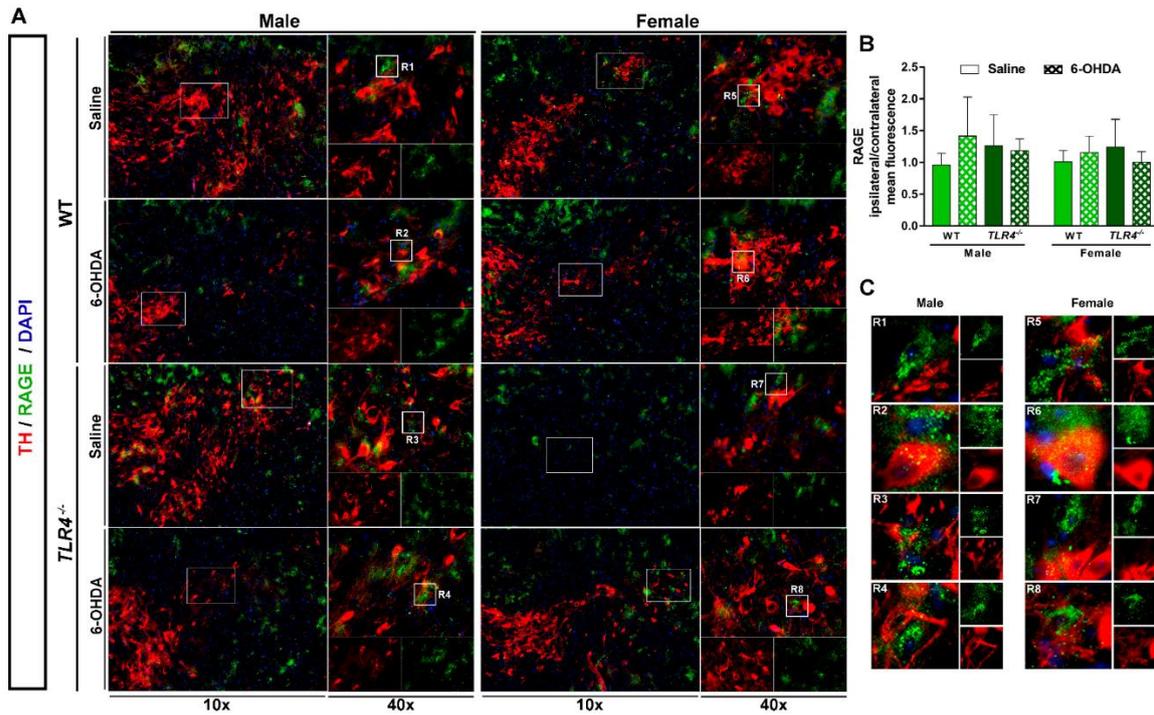


**Figura Complementar 1. Neurônios dopaminérgicos, micróglia e astrócitos não são alterados no estriado dorsal e no córtex anterior dorsal.** (A) Imunofluorescência de neurônios dopaminérgicos (TH, vermelho) num aumento de 20x. (B) Imunofluorescência de micróglia (Iba1 +, verde) e astrócito (GFAP +, vermelho) no estriado ipsilateral (ST, esquerda e abaixo das linhas tracejadas) e córtex (CX, direita e acima das linhas tracejadas) de machos (esquerda) e fêmeas (à direita) são mostrados em ampliação de 10x; entre as linhas estão o corpo caloso. Em detalhes, o córtex (CX) para cima e o estriado (ST) para baixo são mostrados em uma ampliação de 40x. Quantificação da fluorescência média (ipsilateral em relação ao lado contralateral) de (C) TH, (D) Iba1 e (E) GFAP no estriado de camundongos. Quantificação da fluorescência média de (F) Iba1 e (G) GFAP cortical. A análise estatística ANOVA de duas vidas seguida pelo pós-teste de Tukey não mostrou diferença estatística ( $p < 0.05$ ), utilizando  $n = 5$  animais / grupo e média de 2 cortes / animal.

*Expressão de RAGE na SN não é alterada pela 6-OHDA ou TLR4<sup>-/-</sup>*

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) está envolvido com a perda dopaminérgica e processos inflamatórios no modelo 6-OHDA. Sabendo que o RAGE é capaz de atuar juntamente ao TLR4, avaliamos sua presença no SN de camundongos.

O RAGE não mudou significativamente em número devido ao dano dopaminérgico (Fig. Complementar 2 B). Contudo, aparentemente, os camundongos que receberam 6-OHDA tiveram alterações no tipo de célula RAGE-positivo. Em machos e fêmeas selvagens que receberam salina (Saline WT) o RAGE não está em neurônios, mas em células características da micróglia e endotelial. Já com o tratamento com 6-OHDA, a expressão de RAGE parece ser alterada, principalmente em machos: neurônios dopaminérgicos começam a expressar RAGE, confirmado pela co-localização de TH e RAGE (detalhes da Fig. Complementar. 2 C, R2 e R6). O nocaute alterou essa expressão apenas em fêmeas (6-OHDA TLR4<sup>-/-</sup>), em que a expressão de RAGE é semelhante ao controle (Saline WT), enquanto que os machos parecem expressar RAGE em neurônios.



**Figura Complementar 2. Expressão de RAGE em neurônios dopaminérgicos de animais injetados com 6-OHDA.** (A) Imunofluorescência de neurônios TH + (vermelho), RAGE (verde) e núcleo DAPI (azul) na SN ipsilateral de machos (esquerdo) e fêmeas (direito), mostrado em aumento de 10x (esquerdo); detalhes em ampliação de 40x (direita) e também separados por canais de cores (vermelho e verde, para baixo). (B) Quantificação da fluorescência média de RAGE (lado ipsilateral / contralateral). (C) Células R1-R4 detalhadas de camundongo macho (esquerda) e camundongo fêmea (direita), também separadas por canais de cores (acima RAGE em verde e abaixo TH em vermelho). Análise estatística ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, com  $n = 6-8$  animais / grupo e 2 fatias / animal (uma para cada anticorpo), não mostrou diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

### 4.3 Capítulo III

#### O papel de TLR4 e RAGE na resposta pró e anti-inflamatória de macrófagos *in vitro*

Resultados de um estudo *in vitro* com linhagem de monócitos U937, diferenciados a macrófagos, onde foi avaliado o papel de RAGE e TLR4 na polarização e atividade celular.

## **Introdução**

O sistema imunológico está em constante diálogo com nosso ambiente, tolerando certas exposições ou antígenos enquanto responde a outros. Respostas imunes desreguladas levam à doença, como por exemplo a hiper-reatividade a um antígeno inofensivo, que pode causar alergia. O sistema imunológico inato desempenha um papel fundamental no início da inflamação em resposta a antígenos conservados ou sinais de morte celular, tais como bactérias ou liberação de citocinas inflamatórias de células lesionadas, respectivamente. O sistema imune inato ativado irá então induzir uma resposta imune adaptativa, que é específica, direcionada e altamente potente contra os antígenos presentes no meio da região inflamada (KANNARKAT; BOSS; TANSEY, 2013).

Macrófagos são células do sistema imune inato capazes de se comunicar com o sistema imune adaptativo, uma vez que processam os antígenos e apresentam para os mesmos. Além disso, macrófagos ativados possuem uma característica peculiar no sistema imune inato, que é bem característico de células adaptativas: são capazes de se diferenciar e promover reações anti e pró-inflamatórias em resposta a antígenos específicos, sendo adequadas para modular a inflamação no contexto de certas exposições ambientais e disfunção neuronal. A doença de Parkinson é uma doença progressiva multissistêmica, com contribuição inflamatória e neuroinflamatória para o estabelecimento da patologia, em que o sistema imunológico pode desempenhar um papel na propagação da disfunção e patologia neuronal no sistema nervoso central (SNC).

Os receptores de membrana RAGE e TLR4 desempenham papel fundamental na resposta celular de macrófagos. Eles são capazes de reconhecer moléculas em comum e também compartilham vias de sinalização para induzir a inflamação

(PRANTNER; NALLAR; VOGEL, 2020). TLR4 e RAGE, bem como seus ligantes, têm sido implicados na patogênese de várias doenças, incluindo a DP, e propostos como potenciais alvos de direcionamento terapêutico (ANDERSSON; YANG; HARRIS, 2018; CAMPOLO; PATERNITI; SIRACUSA; FILIPPONE et al., 2019; GASPAROTTO; RIBEIRO; BORTOLIN; SOMENSI; RABELO et al., 2017; PAUDEL; ANGELOPOULOU; PIPERI; OTHMAN et al., 2020; SATHE; MAETZLER; LANG; MOUNSEY et al., 2012).

Apesar de serem classicamente descritos como mediadores de eventos pró-inflamatórios, que incluem a ativação de NF- $\kappa$ B (JUDY R. VAN BEIJNUM, 2008), estudos prévios, incluindo os apresentados anteriormente nesta tese, nesta tese, mostram um envolvimento múltiplo dos receptores e seus ligantes na resposta inflamatória, incluindo a resposta anti-inflamatória (LIU; XIANG; PENG; DORAN *et al.*, 2019; SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017). A contribuição relativa dos diferentes receptores e ligantes é provável que difira entre os tipos de células e condições patológicas. Essa interação, frente a estímulos inflamatórios, pode modular a intensidade da resposta imunológica e desencadear diferentes desfechos em células.

Para melhor entender a contribuição de cada receptor para a resposta imunológica, utilizamos um modelo celular de macrófagos diferenciados e polarizados a perfis pró ou anti-inflamatórios, intervindo na expressão/ação de TLR4 e/ou RAGE, através de silenciamento, bloqueio, ou até mesmo estimulação da atividade dos receptores. As respostas inflamatórias avaliadas foram: produção de citocinas e óxido nítrico, ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e atividade de fagocitose.

## **Metodologia**

### *Modelo celular*

Monócitos da linhagem U937 foram cultivados em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, e mantidos em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os monócitos dessas linhagens foram cultivados entre 17 e 21 passagens em garrafas de cultura celular e semeados ao atingirem confluência máxima, contados e preparados para diferenciação.

### *Diferenciação e polarização*

As células foram estimuladas com PMA e LPS ou IL-4 a fim de gerar a ativação dos mesmos através da via clássica (pró-inflamatória) e alternativa (anti-inflamatória) de acordo com a metodologia já descrita com algumas adequações (BECKER; DE BASTIANI; PARISI; GUMA et al., 2015). Basicamente, as células foram cultivadas até atingirem confluência necessária. Em seguida, adicionou-se PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 10 nM em meio RPMI 10% por 48h, a fim de diferenciar os monócitos a macrófagos; para polarizar os macrófagos, retirou-se meio com PMA e adicionou-se LPS (100 ng/mL) ou IL-4 (20 ng/mL) em meio RPMI 1% por mais 24 horas.

### *Silenciamento/Inibição dos receptores*

Para avaliar o papel de TLR4 e RAGE nos macrófagos e nos perfis fenotípicos, as células tiveram a expressão dos genes diminuída ou a ação dos receptores bloqueada através dos seguintes métodos:

### *Silenciamento gênico*

A expressão dos receptores foi atenuada *in vitro* através do ensaio de “silenciamento” de RNA mensageiro por RNA interferente (siRNA, do inglês: *small interference RNA*). As células foram incubadas em meio OPTI-men contendo agente transfectante RNAi Max (Invitrogen) e oligonucleotídeos de RNA resistentes à degradação por nucleases (siRNA) específicos na concentração de 50µM. O silenciamento foi validado por PCR em tempo real, utilizando os genes normalizadores GNB2L e B2M (SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017).

### *Inibição farmacológica*

Bloqueadores específicos para os receptores foram utilizados a fim de inibir suas ações nas células. Antagonista de RAGE (FPS-ZM1) foi utilizado em uma concentração de 1 µg/mL *in vitro* (SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017) e inibidor farmacológico de TLR4 (CLI-O95) em uma concentração de 1µM *in vitro* (ZHAO; ZHANG; ZHAO; MA *et al.*, 2016).

### *Ensaio de gene repórter*

Transfecções transientes foram usadas para quantificar a atividade transcricional NF-κB dependente. O ensaio de gene repórter acopla a expressão da enzima luciferase uma região promotora do gene de interesse, o NF-κB. Basicamente, as células foram transfectadas com o vetor contendo o promotor de NF-κB fusionado ao gene da luciferase e complexados com Lipofectamina 3000 (Invitrogen), de acordo com protocolo padrão do fabricante. Após 24h, as células foram tratadas, e ao final dos tratamentos foi adicionado o substrato DualGlo

(Promega) ao meio, e a emissão de luminescência quantificada.

#### *Mediadores inflamatórios por PCR quantitativo em Tempo Real*

A expressão gênica nas células foi avaliada pela quantificação do mRNA por RT-PCR quantitativo seguindo procedimento adotado em nosso laboratório (de Bittencourt Pasquali, Gelain et al. 2013). O RNA total foi extraído com TriZol (Invitrogen) e os cDNAs foram sintetizados com kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) utilizando 1 µg de RNA total. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata para cada amostra em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com kit PowerUp SYBR Green PCR (Applied Biosystems). Analisamos a expressão dos genes *TLR4*, *AGER* e dos marcadores pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , STAT-1, CXCL10, CXCL9, IL-10, e anti-inflamatórios ALOX 15 e CCL13.

#### *Ensaio de fagocitose*

O processo de fagocitose pode ser quantificado em macrófagos usando biopartículas de *E. coli* marcadas com sondas fluorescentes. Quando internalizadas pelos macrófagos, as partículas emitem fluorescência que pode ser quantificada. Para tal, as células passaram pelos tratamentos e foram submetidas ao ensaio de fagocitose com o kit Vybrant Phagocytosis Assay Kit (Thermo Fischer Scientific). Os procedimentos foram executados de acordo com as instruções fornecidas pelo protocolo do ensaio. As fluorescências foram quantificadas em um espectrofotômetro de fluorescência (i5 Softmax- Molecular Devices, EUA).

#### *Produção de óxido nítrico (NO)*

A produção de óxido nítrico no meio extracelular foi quantificada através da reação de Griess, em que uma alíquota do meio de cultura é diluída no reagente de Griess na proporção de 1:1 e após 15 minutos de incubação, a absorbância (proporcional à quantidade de nitrito) é quantificada em 540 nm (D J STUEHR, 1989; ZANIN; BRAGANHOL; BERGAMIN; CAMPESATO et al., 2012).

#### *Análise estatística*

O GraphPad 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) foi usado para analisar os dados e criar os gráficos. Teste estatístico ANOVA de duas vias foi utilizado para avaliar a influência de mais de uma variável seguido de pós-teste de Tuckey. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **Resultados**

#### *Diferenciação celular de linhagem de monócitos e silenciamento dos receptores*

Os monócitos da linhagem U937 foram diferenciados a macrófagos, e estes submetidos ao ensaio de silenciamento gênico através do uso de pequenos RNAs de interferência para os genes do RAGE e TLR4. Foi avaliada a morfologia celular através de microscopia óptica e validada a eficácia da atenuação da expressão dos genes através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Ao estimularmos os monócitos a se diferenciarem em macrófagos, uma vez que aqueles são células em suspensão, passam a se aderir na superfície do plástico, e também aumentam o tamanho do corpo e das projeções celulares (Figura 1 A); a expressão dos receptores RAGE e TLR4 aumentou quando os monócitos são diferenciados a macrófagos, como quantificado por RT-qPCR (Figura 7 B). Ao adicionar a sequência

de RNA embaralhado (scr siRNA, do inglês “scramble”) e os níveis de RAGE e TLR4 continuaram iguais aos níveis de controle (U937 PMA). Ao adicionar os siRNAs para RAGE ou TLR4, ou até mesmo os dois conjuntamente, a expressão dos respectivos genes foi atenuada significativamente, chegando a níveis basais similares aos monócitos U937, validando dessa forma a técnica de silenciamento gênico em nosso modelo.

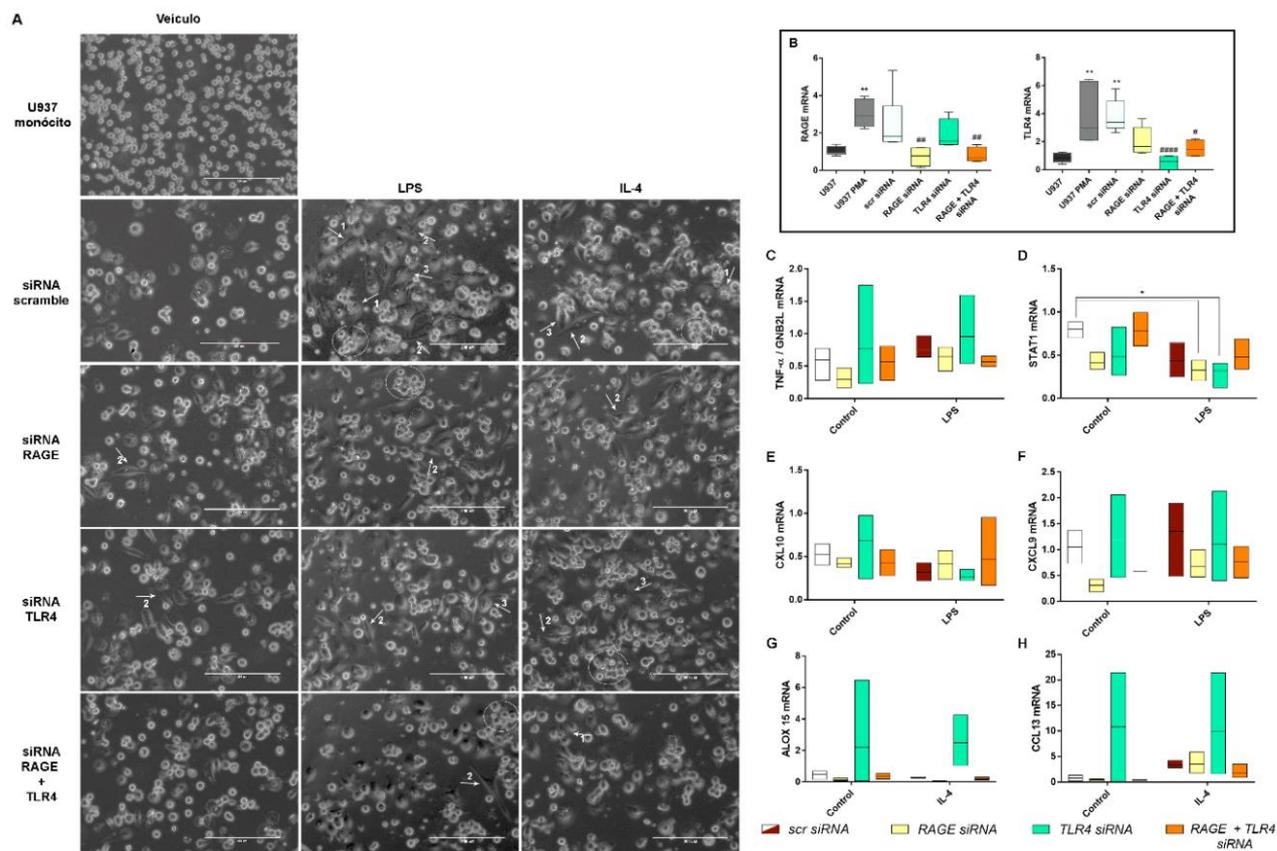
*Papel do RAGE e TLR4 na diferenciação dos macrófagos: Perfil pró-inflamatório, estimulado por LPS, ou anti-inflamatório, estimulado por IL-4.*

A fim de avaliar a relevância dos receptores na polarização e respostas inflamatórias, os macrófagos U937 controles, ou seja, que receberam RNA embaralhado (scr siRNA) ou macrófagos silenciados para RAGE e/ou TLR4, foram estimulados com LPS ou IL-4 por 24h a fim de diferenciá-los para um perfil do tipo pro-inflamatório M(LPS) ou anti-inflamatório M(IL-4), respectivamente (Figura 1 A, C-H).

Ao avaliarmos a morfologia celular por microscopia óptica podemos verificar que o LPS aumenta o número de vesículas (flecha 1) e precipitados celulares, projeções de membrana (flecha 2), bem como o tamanho do corpo (flecha 3) e agregação celular (círculo), características de um perfil de macrófago ativado. As células estimuladas com a IL-4 apresentaram características de ativação mais brandas do que o induzido por LPS, mas diferentes do controle. Quando estas células silenciadas para RAGE são estimuladas com LPS, é estimulado um maior contato entre células e formação de agregados. O silenciamento de TLR4 aumenta as projeções celulares, com perfil similar quando adicionado LPS; a IL-4 estimula o aumento do corpo celular e a agregação celular. O silenciamento conjunto de RAGE

e TLR4 nos macrófagos, na presença de LPS e IL4 conduziram a uma maior formação de precipitados celulares, e projeções no caso do LPS.

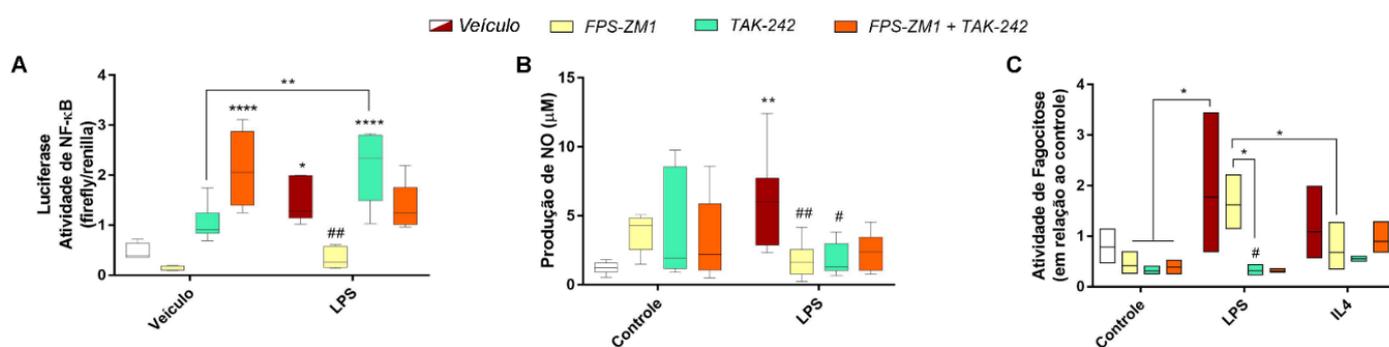
Avaliamos os perfis pró e anti-inflamatórios através da expressão gênica por RT-qPCR, de acordo com o descrito por Becker e colaboradores (BECKER, M.; DE BASTIANI, M. A.; PARISI, M. M.; GUMA, F. T. *et al.*, 2015). Os genes pró-inflamatórios são TNF- $\alpha$  (Fig. 1C), STAT1 (Fig. 1 D), CXCL10 (Fig. 1 E), CXCL9 (Fig. 1 F), e anti-inflamatórios ALOX15 (Fig. 1 G) e CCL13 (Fig. 1 H). Encontramos alterações apenas na expressão gene STAT-1 quando comparamos o grupo controle (sem tratamento) em relação aos silenciados para RAGE e TLR4 na presença de LPS. Apesar disso, os estímulos de LPS e IL-4 não foram capazes de alterar significativamente a expressão de genes pró e anti-inflamatórios, não sendo possível estabelecer os perfis de polarização. Ainda, os receptores RAGE e TLR4 não se mostraram relevantes neste ensaio.



**Figura 1. Morfologia celular e expressão gênica de células submetidas a tratamento pró e anti-inflamatório.** Os macrófagos derivados de monócitos da linhagem U937 foram silenciados e posteriormente estimulados com LPS ou IL4 por mais 24h. As células foram capturadas por microscopia óptica em aumento de 20x (A); a flecha 1 indica as vesículas, a flecha 2 indica as projeções de membrana, flecha 3 indica aumento do corpo celular e o círculo indica agregação celular. RT-qPCR foi realizado para os genes pró-inflamatórios TNF- $\alpha$  (B), STAT-1 (C), CXCL10 (D), CXCL9 (E), e anti-inflamatórios ALOX 15 (F), CCL13 (G). Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Tukey: \* $<0,05$  em relação ao grupo indicado; \*\*  $p<0,01$  em relação ao grupo U937 (monócito); #  $p<0,05$  e ##  $p<0,01$  em relação ao grupo U937 PMA (macrófago).

Posteriormente, realizou-se um novo ensaio com pré-tratamento das células com os inibidores farmacológicos de RAGE (FPS-ZM1) e TLR4 (TAK-242). Após 15 minutos do bloqueio dos receptores, adicionamos LPS ou IL-4 (Figura 2). Passadas 6h, avaliamos a produção de óxido nítrico (Fig. 2 A) e a atividade de fagocitose (Fig. 2 B); após 24h, avaliamos a atividade transcricional de NF- $\kappa$ B (Fig.2 A). Aqui, os macrófagos apresentaram responsividade ao LPS no que diz respeito às respostas

pró-inflamatórias sendo atenuado pelo bloqueio de RAGE, mas não por TLR4 sozinho ou associado. Já quando avaliamos o envolvimento dos receptores na atividade de NF- $\kappa$ B, o bloqueio conjunto de RAGE e TLR4 ativou o fator de transcrição. A produção de óxido nítrico aumentou significativamente frente ao tratamento com LPS e os receptores demonstraram estar envolvidos com esse efeito no período analisado; já o bloqueio de TLR4 ou o conjunto de RAGE e TLR4, não apresentaram efeito sinérgico na produção de óxido nítrico. No ensaio de fagocitose, apesar de não apresentar diferença significativa em relação ao grupo controle, o LPS aumentou a atividade fagocítica quando comparado às células controles bloqueadas para os receptores, mas não ao grupo controle em si; a inibição de RAGE foi capaz de diminuir significativamente o efeito fagocítico estimulado pelo LPS. Em relação ao estímulo por IL-4, não encontramos efeitos na fagocitose.



**Figura 2: Atividade inflamatória regulada por RAGE e TLR4.** Os macrófagos tiveram a atividade de RAGE e TLR4 bloqueadas pelos inibidores farmacológicos FPS-ZM1 e TAK-242, respectivamente. Essas células foram desafiadas com LPS e foi analisada a atividade transcricional de NF- $\kappa$ B após 24h (A), produção de NO após 6h (B); as células também foram desafiadas com IL-4 e avaliada a atividade de fagocitose (C). Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Tukey: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao grupo veículo controle (macrófago sem nenhum estímulo) ou em relação ao grupo indicado (linhas); #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  em relação ao grupo LPS controle.

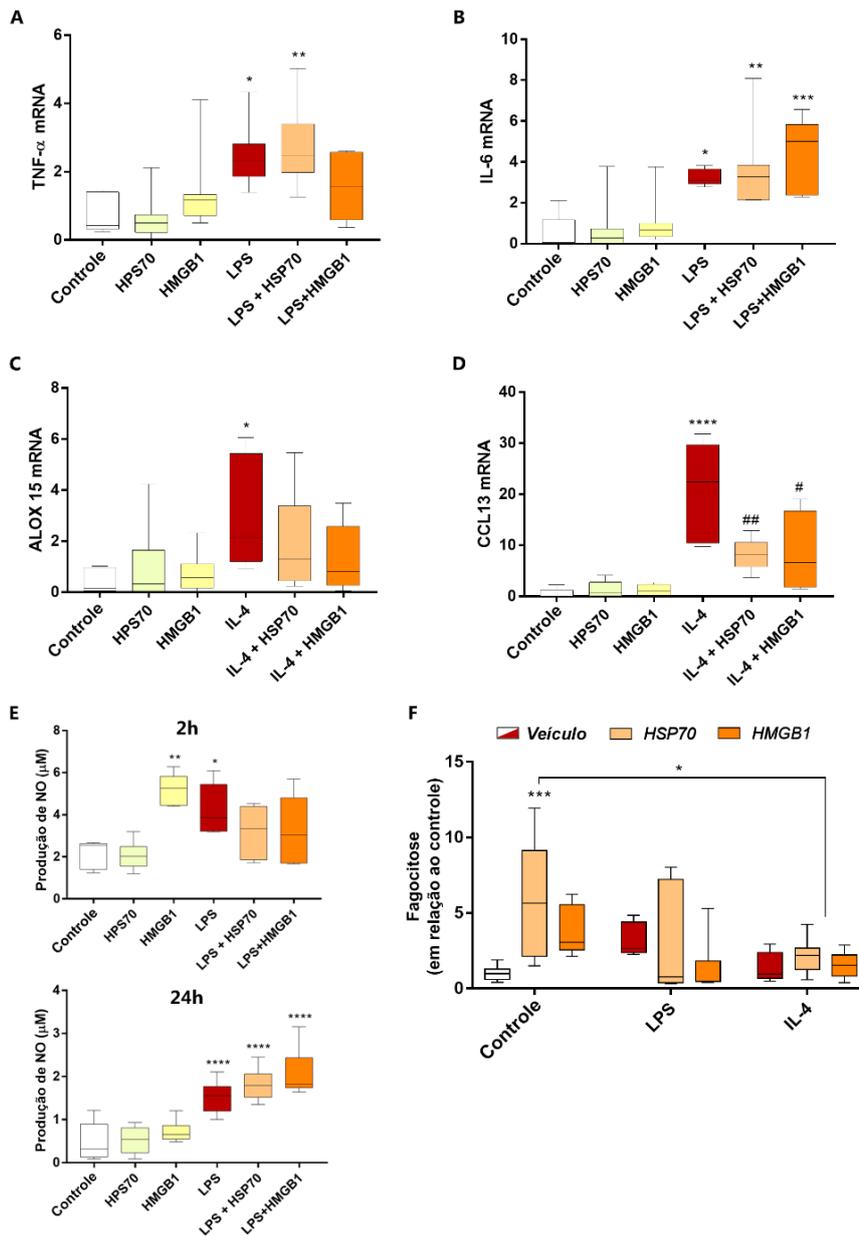
## *Papel inflamatório dos agonistas de RAGE e TLR4 sobre a polarização e ativação de macrófagos*

Já é descrito na literatura que HSP70 e HMGB1 extracelulares são capazes de ativar respostas inflamatórias através da ligação a receptores de membrana, como em RAGE e TLR4, atuando dessa forma como DAMPs (ASEA; REHLI; KABINGU; BOCH *et al.*, 2002; JUDY R. VAN BEIJNUM, 2008; LIANG; HOU; KONG; WEN *et al.*, 2015; QIN; DAI; TANG; ZHANG *et al.*, 2009; ROJAS; DELGADO-LOPEZ; PEREZ-CASTRO; GONZALEZ *et al.*, 2016; SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017).

Em seguida, desejamos investigar os efeitos dos DAMPs na resposta imunológica pró e anti-inflamatória. As células U937-PMA foram desafiadas com IL-4 ou LPS e após 15 minutos adicionamos HSP70 ou HMGB1. Avaliamos a expressão de marcadores pró- inflamatórios (Fig 3 A e B) e anti-inflamatórios (Fig. 3 C e D), produção de óxido nítrico (Fig. 3 E) e atividade de fagocitose (Fig. 3 F). Em 24h, o LPS aumentou a expressão dos genes pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6, bem como quando combinado com HSP70; a HMGB1 juntamente com LPS aumentou apenas a produção de IL-6 significativamente, mas não aumentou em relação ao LPS sozinho. Em contraste, HSP70 e HMGB1 foram capazes de atenuar o perfil anti-inflamatório, diminuindo significativamente a expressão do gene CCL13 uma vez estimulado por IL-4. As proteínas HSP70 e HMGB1 por si só não foram capazes de aumentar a expressão dos genes inflamatórios em macrófagos U937.

Avaliamos a produção de NO em um tempo curto e prolongado de exposição ao LPS e/ou HSP70 e HMGB1; em 2h a HMGB1 aumentou a produção de NO, bem como LPS, de forma significativa; após 24h a produção de NO já havia diminuído devido à HMGB1, mas o LPS sozinho ou combinado com as proteínas foi capaz de

manter elevada essa resposta inflamatória. Avaliamos a resposta de fagocitose após 2h de estímulo, uma vez que é uma resposta fisiológica rápida de macrófagos; contudo, não encontramos nenhuma alteração significativa nesse parâmetro.



**Figura 3. Papel inflamatório da HSP70 e HMSGB1 sobre a polarização e ativação de macrófagos derivados de monócitos da linhagem U937.** As células foram tratadas com LPS ou IL-4 seguido das proteínas HSP70 e HMGB1. Após 24h foi avaliado a expressão de TNF-α (A), IL-6 (B), ALOX 15 (C), CCL13 (D) através de

RT-qPCR. Após 2h e 24h foi investigada a produção de NO (E) e após 2h a atividade de fagocitose (F). Análise estatística ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Tukey: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle veículo ou em relação ao grupo indicado (linhas); #  $p < 0,01$ , ##  $p < 0,01$  em relação ao grupo LPS ou IL4.

## **Discussão**

Os monócitos são células em suspensão presentes fisiologicamente na corrente sanguínea; quando diferenciados a macrófagos, ocorre uma ativação celular e aumento das proteínas de superfície, responsáveis pela adesão e de reconhecimento celular. No presente estudo, quando estimulamos os monócitos da linhagem celular U937 com PMA, os mesmos diferenciaram-se a macrófagos, com aumento da expressão dos receptores TLR4 e RAGE. Dessa forma, estabelecemos um bom modelo para estudar estes receptores.

O TLR4 e o RAGE são receptores celulares que atuam como importantes mediadores da resposta inflamatória. Eles compartilham alguns agonistas e, quando ativados, são capazes de acionar vias de sinalização a jusante convergentes, e até mesmo vias em comum. Dessa forma, são capazes de atingir um amplo espectro de efeitos celulares (Ibrahim et al., 2013; Gasiorowski et al., 2018).

No modelo de polarização de macrófagos a um perfil tipicamente pró-inflamatório, conseguimos identificar que o LPS induziu alteração fenotípica das células, o que foi confirmado pela ativação de NF- $\kappa$ B, produção de NO e atividade de fagocitose; apesar disso, a expressão de citocinas pró-inflamatórias não foi alterada significativamente após 24h. Paralelamente, quando avaliamos os macrófagos polarizados a um perfil anti-inflamatório, a IL-4 também desencadeou uma resposta nos macrófagos, alterando sua morfologia, porém sem alterações das citocinas/quimiocinas anti-inflamatórias.

Quando avaliamos o silenciamento dos receptores, foi possível observar alterações na morfologia das células, mas sem trazer alterações na expressão gênica. O bloqueio de RAGE se mostrou relevante, uma vez que foi capaz atenuar os efeitos do LPS; já o bloqueio de TLR4 apresentou resultados controversos. O bloqueio associado dos receptores não apresentou alterações contundentes.

Posteriormente, estimulamos os macrófagos com LPS ou IL-4 associados aos agonistas dos receptores HSP70 e HMGB1. Estas proteínas atuam como DAMPs e são comumente associadas a um quadro pró-inflamatório; contudo, uma vez que são capazes de atuar sobre um amplo espectro de moléculas, há casos em que ativam respostas anti-inflamatórias (SON; PORAT; HE; SUURMOND *et al.*, 2016). Aqui, os agonistas mostraram ser importantes na perpetuação do quadro pró-inflamatório previamente induzido pelo LPS, sobretudo quando observamos a expressão de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO. Paralelamente, nos macrófagos anti-inflamatórios, as proteínas HSP70 e HMGB1 foram capazes de atenuar a expressão do gene CCL13, e a HSP70 diminuiu a atividade de fagocitose induzida por IL-4.

Os resultados preliminares obtidos através desse estudo sugerem uma contribuição relevante do RAGE e principalmente da HSP70 nas respostas pró-inflamatórias de macrófagos U937. Como no primeiro ensaio de polarização não obtivemos resultados consistentes em nível de expressão gênica de genes pró e anti-inflamatórios, será necessário repetir o experimento; avaliaremos, então, se os resultados observados são um viés experimental, ou se é necessário um tempo maior de estimulação, ou mais indutores (como, por exemplo, INF- $\gamma$  para o perfil M1), para obter um modelo polarização de macrófagos secretores funcionais.

Além disso, encontramos uma variação muito grande nas respostas das células frente aos estímulos. Apesar de se tratar de um estudo com linhagem celular,

as células podem apresentar respostas heterogêneas, compondo populações de células com perfis distintos dentro de um mesmo grupo experimental (FILIPPI-CHIELA; BUENO E SILVA; THOME; LENZ, 2015). Portanto, torna-se necessário aumentar o número experimental; ainda, tornar-se-ia interessante realizar avaliações individuais, célula a célula, a fim de avaliar os fenótipos populacionais presentes.

Apesar das nossas limitações, alguns objetivos foram traçados para poderemos explorar melhor a contribuição relativa e conjunta de TLR4 e RAGE nos processos inflamatórios desencadeados na resposta inflamatória de macrófagos.

### **PARTE III**

## 5 Discussão

Desde o início da inflamação, desenvolvimento da neuroinflamação, até o estabelecimento da neurodegeneração, os receptores TLR4 e RAGE atuam como importantes intermediadores da resposta imunológica e inflamatória. A causa da neurodegeneração nigral na doença de Parkinson e seus mecanismos subjacentes permanecem indefinidos; entretanto, postula-se que o envolvimento de eventos inflamatórios e neuroinflamatórios contribuem para a perda neuronal (SU; FEDEROFF, 2014)(SU; FEDEROFF, 2014). Nesta tese, evidenciamos a relevância da inflamação periférica nos estágios iniciais e progressão da DP, incluindo o desenvolvimento de sintomas não motores, que constituem a fase pré-clínica da doença (HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2010).

No primeiro capítulo, foi demonstrado que os pacientes diagnosticados com Parkinson apresentam uma prevalência de perfil sérico anti-inflamatório, quando comparado aos controles, e o mesmo é alternado para pró-inflamatório após um ano. Já dentre os ligantes solúveis de TLR4 e/ou RAGE, os AGEs 4-HNE e CML diminuem no soro de pacientes; dentre os DAMPs, a concentração da proteína S100B diminui com o passar do tempo, enquanto que a HSP70 aumenta.

Encontramos na literatura trabalhos que descrevem a neurodegeneração associada a S100B, sendo mediada principalmente pela via RAGE/TNF- $\alpha$  (SATHE; MAETZLER; LANG; MOUNSEY *et al.*, 2012). Em altas concentrações, a S100B é capaz de desencadear a apoptose de neurônios, astrócitos e micróglia (SORCI; BIANCHI; RIUZZI; TUBARO *et al.*, 2010), sendo um potencial marcador da DP no cérebro (SCHULZ; KRUSE; GERA; KREMER *et al.*, 2021). Além disso, a regulação positiva de S100B e RAGE é fundamental para o início do dano neuronal por MPTP no estriado, porém os níveis das proteínas decaem com o passar do tempo. (JIANG;

WANG; TUO; MA *et al.*, 2018). Aqui também encontramos diminuição de S100B, mas no soro dos pacientes DP. Estes dados podem sugerir que a interação das proteínas S100B e RAGE não desempenham papel central no estresse crônico.

No que diz respeito á HSP70, um estudo prévio do nosso grupo mostrou que esta proteína extracelular é capaz de se ligar ao RAGE e ativar respostas pró-inflamatórias em cultura celular (SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017). Fazendo um paralelo entre estes resultados e os obtidos no estudo *in vitro* do Capítulo III, em que HSP70 e HMGB1 intensificam respostas pró-inflamatórias de macrófagos, o aumento crônico da HSP70 sérica em pacientes com DP pode estar relacionado com a transição de status inflamatório.

As alterações não motoras observadas nos pacientes revelam disfunção cognitiva, depressão e, surpreendentemente, melhora em uma escala de avaliação do sono, mas que é revertida com o tempo. Já nos comportamentos avaliados pela escala UPDRS exclusivamente em pacientes com DP, encontramos alterações longitudinais apenas no comportamento psicótico, indicado pela escala UPDRS I.II (psicose), que apresentou piora significativa após um ano e é acompanhada pelo aumento de S100B. Já os comportamentos motores não apresentaram evolução dentro do período de um ano. Nós atribuímos isso ao curto prazo avaliado; contudo, é um dado interessante, uma vez que a evolução dos sintomas na DP, principalmente os motores, ocorre posteriormente às alterações moleculares.

Nós também avaliamos como se correlacionavam as características clínicas e comportamentais dos pacientes com as variáveis séricas. Em sua maioria, estas não são acompanhadas de alterações não motoras, motoras e estadiamento da doença. Uma exceção é a citocina com papel anti-inflamatório IL-10, que se correlaciona negativamente com sintomas não motores (UPDRS II), depressão (BDI) e

estadiamento da doença (Hoen and Yar HY,) na avaliação dos pacientes. A citocina IL-4, anti-inflamatória, também se correlacionou negativamente com UPDRS, na escala total ou nas parciais. Ou seja, a piora referente a comportamentos não motores totais, psicose e constipação, mas não discinesia, é acompanhada por diminuição da IL-4 sérica. Paralelamente aos nossos resultados, um estudo recente mostrou que níveis mais altos de IL-4 e baixos de IFN- $\gamma$  eram capazes de prever tremores mais graves em pessoas com DP (DIAZ; KOHUT; RUSSELL; STEGEMOLLER, 2022).

Estes resultados confirmam a prevalência de um status anti-inflamatório no primeiro ano da avaliação. Hipotetizamos que estas citocinas, IL-10 e IL-4, estejam diretamente correlacionadas com o desenvolvimeto da sintomologia da doença, principalmente no que diz respeito aos sintomas não motores.

Já dentre os DAMPs, a nitrotirosina (um AGE agonista de RAGE) e S100B (agonista de RAGE e TLR4), apresentaram correlação positiva com UPDRS total e negativa com MoCA, respectivamente; ou seja, quando há uma piora no quadro geral da doença, também há aumento de nitrotirosina sérica, e quando há perda cognitiva, os níveis séricos de S100B estão elevados. Esses resultados sugerem que RAGE e TLR4 podem estar envolvidos no estado pró-inflamatório periférico e evolução da DP.

Através das análises de bioinformática pudemos extrair mais informação sobre os perfis dos pacientes e avaliar o poder preditivo das amostras séricas. Nos testes de clusterização encontramos dois ou três perfis distintos de pacientes com relação inversa dos DAMPs/ligantes de RAGE/TLR4 e as citocinas (enquanto aqueles se encontravam em maior concentração, estes estavam diminuídos). Além disso, através das ferramentas de aprendizado de máquina identificamos conjuntos

de variáveis, incluindo tanto citocinas quanto os DAMPs/ligantes de RAGE/TLR4, capazes de prever a doença em duas escalas. Um conjunto de 13 analitos avaliados foi o que apresentou os maiores valores de acurácia para “Hoehn e Yahr”, que ocorreu majoritariamente na escala 2; o conjunto de 14 variáveis foi o que apresentou maior acurácia na predição de “UPDRS total”. Apesar do baixo resultado preditivo, esses conjuntos conseguiram prever a doença com maior poder do que os analitos separadamente, e em estágios iniciais da doença.

Os resultados obtidos neste ensaio clínico são interessantes, porém deixam algumas questões em aberto para explorarmos. Quando estudamos pacientes com Parkinson, é importante levarmos em consideração as peculiaridades de cada indivíduo que podem interferir nas análises, principalmente por se tratar de uma doença multifatorial. Excluímos da análise pacientes com características que poderiam apresentar viés em nossas avaliações imunológicas/inflamatórias, contudo, alguns interferentes são inevitáveis. Todos os pacientes recrutados estavam sob tratamentos anti-parkinsonianos, majoritariamente de reposição dopaminérgica, o que visa mitigar os sintomas e retardar a evolução da doença. Além de interferir nas avaliações clínicas, principalmente as motoras, também é descrito na literatura que medicamentos específicos usados para o tratamento da DP podem influenciar subconjuntos de linfócitos, ativação e os níveis de citocinas. O tratamento pode influenciar o sistema imunológico a longo prazo, por meio de efeitos diretos nos linfócitos ou nas células apresentadoras de antígenos (ROCHA; ASSIS; SCALZO; VIEIRA *et al.*, 2018).

No entanto, as alterações imunológicas observadas na DP podem resultar de outros motivos, como a inflamação devido à desregulação das vias inflamatórias (associada a questões hormonais sexuais, envelhecimento ou vulnerabilidade

genética), patógenos (por exemplo, infecção bacteriana ou viral), toxinas ambientais (por exemplo, pesticidas) e agregados de proteínas, como a  $\alpha$ -sinucleína (SU; FEDEROFF, 2014).

Agregados proteicos são característicos de doenças neurodegenerativas e demências e, particularmente em demências com corpos de Lewy e Doença de Parkinson, emaranhados de  $\alpha$ -sinucleína mutante são predominantes. Nós investigamos as concentrações séricas tanto de  $\alpha$ -sinucleína quanto do peptídeo  $\beta$ -amiloide, outra proteína que tem o mesmo perfil de agregação e é encontrada em processos neurodegenerativos, com predominância na Doença de Alzheimer. Ao compararmos os grupos controle e DP, os indivíduos do nosso estudo não apresentaram alterações séricas dessas proteínas.

É descrito na literatura que presença de  $\alpha$ -sinucleína no soro de pacientes com DP é menor do que no plasma, e ainda menor quando comparado a indivíduos sem a doença (CHANG; YANG; YANG; CHANG *et al.*, 2019), o que pode explicar a ausência de significância dessa proteína. Já o peptídeo  $\beta$ -amiloide apresentou correlação com S100B na avaliação de pacientes, e também se mostrou importante na predição de UPDRS total. Nós não tivemos acesso às amostras de líquido dos pacientes, o que poderia nos trazer informações diferentes, já que há predominância desses agregados insolúveis no cérebro. Ademais, essas proteínas não foram avaliadas após período de um ano, pois infelizmente não tivemos novo acesso aos kits ELISA de detecção.

Outro fator importante a ser levado em consideração na DP é o sexo, uma vez que a prevalência é maior em homens. Esse dado foi confirmado aqui, onde tivemos maior número de pacientes homens, em contraste com maior proporção de mulheres no grupo controle. Com exceção da pressão diastólica, em que homens

apresentaram menor valor do que as mulheres, não encontramos diferença estatística levando em consideração a variável “sexo” (utilizamos teste estatístico ANOVA de 2 vias, seguido de pós-teste de Tukey). Portanto, decidimos não realizar análises pareadas por sexo, o que traria perda de valor e significância nas análises. Contudo, sabe-se que peculiaridades relativas ao gênero, como hormônios sexuais, regulam diretamente processos imunológicos e inflamatórios(Y; H; Q; Y *et al.*, 2016). O estudo *in vivo* presente nesta tese revela resultados interessantes relativos ao sexo, neuroinflamação e neurodegeneração, que serão discutidos em seguida.

O envelhecimento também é um importante fator para a inflamação na DP, tanto nas formas genéticas quanto na esporádica da doença (SU; FEDEROFF, 2014). Os pacientes do nosso estudo possuíam idade mais avançada em comparação aos controles; contudo não encontramos diferença significativa ao considerarmos essa variável em nossas análises (utilizamos ANOVA de 2 vias, seguido de pós-teste de Tukey), o que também nos levou a não realizar análises pareadas por idade. Contudo, sabe-se que o envelhecimento está associado à inflamação sistêmica crônica e evidências recentes sugerem que o cérebro envelhecido reside em um estado crônico de neuroinflamação, caracterizado pelo aumento da reatividade após estímulo imunológico, com micróglia predominantemente do tipo M1(EG; E; FR; HW *et al.*, 2012). A ativação do sistema imunológico periférico acentua a resposta inflamatória central em cérebros envelhecidos ou com predisposição genética. Ou seja, esses fatores podem atuar como um estímulo preparador da micróglia, e após um evento secundário (por exemplo, toxina ambiental ou infecção viral), a micróglia “preparada” (do inglês “primed microglia”) libera quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias que conduzem à neurodegeneração (SU; FEDEROFF, 2014).

Isso torna mais evidente a fluidez da comunicação entre o sistema nervoso central e a periferia. Ambas as vias neurais e humorais mediam a comunicação do local da inflamação periférica para o cérebro. A neuroinflamação tem sido proposta como um importante contribuinte para a neuropatologia da DP e desempenha um papel no desenvolvimento de sintomas motores e não motores (SU; FEDEROFF, 2014). Os sintomas não motores são associados à imunidade inata exacerbada, como observado em um estudo de Viana e colaboradores, em que encontraram um aumento de RAGE, TLR5, TLR7 e da subunidade p22-NADPH oxidase no córtex frontal de murinos, sugerindo o recrutamento de mecanismos compensatórios para conter a inflamação inata (VIANA ; PITA; LEMOS; RIAL et al., 2017).

No Capítulo II estão presentes os resultados do trabalho *in vivo* realizado com camundongos machos e fêmeas nocautes para o gene *TLR4*, desafiados com um indutor de dano dopaminérgico estriatal, a 6-OHDA. Durante quatro semanas avaliamos a evolução de danos não motores e motores decorrentes da denervação dopaminérgica induzida por 6-OHDA. Após 30 dias avaliamos danos cerebrais por imunofluorescência de microscopia, a fim de avaliar processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos regulados pelo TLR4 e influenciados pelo sexo.

A 6-OHDA é um análogo da dopamina usada como modelo de denervação dopaminérgica e, quando administrada intracerebral, é transferida pelo transportador de dopamina (DAT) para os neurônios dopaminérgicos e se acumula nas mitocôndrias, inibindo a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (GLINKA; TIPTON; YODIM, 1996). Quando injetada no corpo estriado, a 6-OHDA induz dano retrógrado, progressivo e parcial aos neurônios dopaminérgicos, induzindo a lesão progressiva (até 3 semanas) menos aguda, o que é mais relevante para DP (BECKER; DEMIRBAS; JOHANN; ZENDEDEL *et al.*, 2018). Conforme

vinculado por Zeng e colaboradores, existem mais duas vantagens de usar o modelo intraestriatal 6-OHDA: aumentar a taxa de sucesso em camundongos devido à grande estrutura do corpo estriado e, além de induzir danos motores, produz sintomas não motores de DP (ZENG; GENG; JIA, 2018), incluindo disfunção cognitiva, psiquiátrica e gastrointestinal (Zeng et al., 2018). Dessa forma, nas duas primeiras semanas após insulto com 6-OHDA avaliamos comportamentos não motores nos camundongos selvagem e nocaute para o gene TLR4.

Em nossas avaliações de testes de comportamento não motores encontramos alteração dos sintomas no sexo masculino, que se mostrou mais afetado no início da lesão da 6-OHDA. A depressão é a condição psiquiátrica mais comum na DP (SLAUGHTER; SLAUGHTER; NICHOLS; HOLMES *et al.*, 2001), presente nos pacientes do nosso estudo clínico, e também desencadeada pela 6-OHDA em nosso modelo animal, principalmente em camundongos machos: comportamento semelhante à depressão ligado a menores alternâncias nos braços do labirinto em Y, maior imobilidade no teste de suspensão da cauda e menor limpeza no teste de borrifada de sacarose na cauda. O TLR4 provou ser importante nas duas primeiras semanas, especialmente em machos, apresentando papel protetor. Na literatura já foi demonstrado que a ativação do TLR4 provoca sintomas semelhantes à depressão em modelos animais, tanto comportamentais quanto fisiologicamente, subjacentes à atividade imune induzida por estresse (LIU; BUISMAN-PIJLMAN; HUTCHINSON, 2014)

Injetamos 6-OHDA na região dorsomedial do estriado, que desencadeia um efeito geral na locomoção no decorrer do tempo (HERNANDEZ-BALTAZAR; ZAVALA-FLORES; VILLANUEVA-OLIVO, 2017). No final da quarta semana encontramos déficit de desempenho no teste de poste, principalmente no sexo

masculino, e comportamento de rotação induzido pela apomorfina. O teste da apomorfina é o mais sensível para a detecção de lesões parciais no sistema nigroestriatal; o animal demonstra alterações comportamentais a partir de 30% de perda de corpos neuronais dopaminérgicos na substância negra (SN), que foi confirmada por fluorescência da proteína tirosina hidroxilase (TH+). A resposta exacerbada induzida à apomorfina revelou lesão no sistema dopaminérgico em camundongos machos e fêmeas, e  $TLR4^{-/-}$  não foi funcionalmente capaz de prevenir a perda neuronal dopaminérgica para projeções corticais. Curiosamente, os comportamentos mostram que o TLR4 apresenta papel importante na locomoção: os animais  $TLR4^{-/-}$  tratados com 6-OHDA apresentaram um déficit motor quando comparados aos tratados com salina, ou até mesmo aos selvagens.

Alguns autores afirmam que o teste de apomorfina é um indicador pobre da extensão geral da morte de células nigrais ou denervação do estriado no modelo de lesão unilateral (KIRIK; ROSENBLAD; BJÖRKLUND, 1998). Postulamos que esse efeito pode estar ocorrendo em nosso modelo, uma vez que o marcador de neurônios dopaminérgicos diminuiu no corpo estriado com injeção de 6-OHDA em mulheres, mas nos homens essa perda não foi significativa. Ao mesmo tempo, não vimos qualquer neuroinflamação gerada por 6-OHDA ou nocaute de TLR4 no estriado de camundongos machos e fêmeas, uma vez que não houve mudança na população glial residente, como será discutido em seguida. Esses resultados podem explicar o desempenho nas avaliações motoras, uma vez que não encontramos comprometimento completo em todos os parâmetros comportamentais analisados.

Avaliando os resultados teciduais, a 6-OHDA induziu morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc) de machos e fêmeas em até 40%, quando comparamos o lado ipsilateral (em que foi injetada a droga) em

relação ao contralateral. Já no estriado, vimos morte neuronal significativa apenas em fêmeas. Estruturalmente, a SNpc é responsável por emitir projeções de neurônios dopaminérgicos para o corpo estriado, onde será regulada a ação dos neurônios inibidores do globo pálido externo (GPe), inibindo movimentos involuntários pela via indireta e facilitando os movimentos realizados pela via direta. A morte neuronal acentuada tem como consequência direta danos locomotores progressivos em modelos e pacientes. Acreditamos que um acompanhamento mais prolongado desses animais será capaz de detectar danos dopaminérgicos e consequentemente motores mais evidentes

Uma hipótese sobre a causa da degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais é que a DP é causada pela morte celular programada (apoptose) devido ao aumento dos níveis de citocinas, proteínas relacionadas à apoptose e/ou diminuição dos níveis de neurotrofinas. Como já discutido nesta tese, muitos estudos relatam tanto aumentos como diminuições nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e neurotrofinas no cérebro de pacientes com DP, sugerindo assim que a neuroinflamação e a apoptose podem contribuir para a patogênese da DP.

Sabe-se que os neurônios dopaminérgicos na SN são relativamente sensíveis ao estresse (JACKSON-LEWIS; SMEYNE, 2005) e que há uma grande população de micróglia no SN em comparação com outras regiões do SNC (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007). No modelo 6-OHDA, verificou-se que a ativação da micróglia ocorre a partir do terceiro dia após a lesão até a terceira semana pós-lesão, precedendo a morte dopaminérgica, enquanto não são encontradas alterações no número de astrócitos (WALSH; FINN; DOWD, 2011). Dessa forma, torna-se evidente o papel da inflamação: um passo crucial na cascata patogênica que leva à neurodegeneração.

Encontramos reatividade microglial majoritariamente na SN de camundongos

fêmeas enquanto que os machos não apresentaram alterações significativas na densidade glial devido à injeção de 6-OHDA, consistente com os resultados da literatura (MITRA; CHAKRABARTI; DUTTA; RAY *et al.*, 2015). Os astrócitos, apesar de não apresentarem alterações no número da população, apresentaram alterações morfológicas na SNpc, potenciais indicadores de sua reatividade. O receptor TLR4, por sua vez, mostrou ter um papel importante na neuroinflamação, uma vez que em animais *TLR4*<sup>-/-</sup> o perfil de reatividade glial foi atenuado.

O processo inflamatório central (ativação/proliferação de micróglia/astrócitos, secreção de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres) é um importante evento primário que leva ao processo neurodegenerativo. De acordo com um estudo clínico que usou tomografia por emissão de pósitrons para estudar a microglia ativada no cérebro de pacientes com DP idiopática, houve ausência de alterações significativas na ativação da microglia ao longo do tempo, sugerindo que a inflamação cerebral ocorre no início do processo da DP (GERHARD; PAVESE; HOTTON; TURKHEIMER *et al.*, 2006). Acreditamos que é isso que esteja ocorrendo aqui, principalmente quando comparamos a processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos mais brandos em fêmeas nocautes. Os camundongos machos, possivelmente já tiveram um pico de resposta imune anterior às fêmeas, desencadeando danos neuronais (como revelado em comprometimentos não motores nas primeiras duas semanas após a injeção de 6-OHDA); após 30 dias só conseguimos detectar a morte neuronal.

Nossos resultados revelam uma influência relevante do sexo no desenvolvimento da patologia. É relatado que camundongos fêmeas geram respostas imunes humorais e celulares mais robustas e potencialmente protetoras após desafio antigênico do que machos (KLEIN; FLANAGAN). Além disso, os

estrógenos aumentam a expressão da superfície do TLR4 em macrófagos em murinos, desempenhando um papel protetor na resistência a infecções bacterianas (RETTEW; HUET; MARRIOTT, 2009). Os estrógenos também podem induzir a expressão de DAT (transportadores de dopamina) (JURADO-CORONEL; CABEZAS; ÁVILA RODRÍGUEZ; ECHEVERRIA *et al.*, 2018), que estão relacionados a níveis mais elevados de dopamina circulante em mulheres (JONIEC; CIESIELSKA; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA; PRZYBYLKOWSKI *et al.*, 2009), conferindo a elas uma menor suscetibilidade à DP.

Por fim, quando avaliamos como se encontrava o RAGE nesse modelo, verificamos que seu imunoconteúdo não foi alterado pela 6-OHDA e nem por *TLR4*<sup>-/-</sup>; no entanto, parece alterar a expressão para outro tipo celular. Sabe-se que a inflamação sistêmica altera o local da expressão RAGE das células endoteliais para neurônios em diferentes áreas do cérebro (GASPAROTTO; RIBEIRO; DA ROSA-SILVA; BORTOLIN *et al.*, 2019; RABELO; GUIMARÃES; OLIVEIRA; GASPAROTTO *et al.*, 2016). Aqui, a 6-OHDA parece induzir a expressão de RAGE em neurônios de machos e fêmeas, o que nos leva a acreditar que é um importante mediador da morte neuronal, especialmente em machos, porque o nocaute do TLR4 não foi capaz de impedir essa alteração na expressão do tipo celular. Contudo, são resultados preliminares meramente especulativos; mais investigações são necessárias para gerar dados consolidados.

O TLR4 e o RAGE compartilham alguns agonistas e, quando ativados, ambos também podem acionar vias de sinalização à jusante convergentes (ou até as mesmas vias), atingindo um amplo espectro de efeitos após a ativação do receptor (Ibrahim *et al.*, 2013; Gasiorowski *et al.*, 2018). No presente trabalho, descobrimos que a ausência de TLR4 no modelo de denervação dopaminérgica exerceu apenas

uma proteção parcial, que inclui comportamentos não motores em machos, neuroinflamação e degeneração em fêmeas. Assim, as intervenções no *crosstalk* de RAGE e TLR4 podem ser consideradas como um alvo potencial para tratamentos futuros.

A fim de explorar esses mecanismos moleculares por de trás das respostas imunológicas e inflamatórias reguladas por TLR4 e RAGE, desenvolvemos no Capítulo III um modelo celular *in vitro* com macrófagos. Sabe-se que macrófagos são atores-chave na homeostase tecidual devido às ações pleiotrópicas de sinalização, que ocorrem através de receptores de reconhecimento e secreção de citocinas (BECKER; DE BASTIANI; PARISI; GUMA *et al.*, 2015). Portanto, utilizamos uma linhagem celular de monócitos humanos, U937, submetidos a um protocolo de diferenciação celular para macrófagos; através de silenciamento gênico, bloqueio farmacológico, ou estímulo por agonistas, modulamos a expressão e ação de RAGE e TLR4. A partir de então, desejamos avaliar a importância dos receptores na modulação da polarização celular para um perfil pró e anti-inflamatório, através da produção de citocinas específicas, bem como a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, produção de NO e atividade de fagocitose.

Os monócitos são células em suspensão presentes fisiologicamente na corrente sanguínea; quando diferenciados a macrófagos, ocorre uma ativação celular e aumento das proteínas de superfície, responsáveis pela adesão e de reconhecimento celular. Os receptores TLR4 e RAGE tiveram expressão aumentada em macrófagos U937, estabelecendo um bom modelo para estudar estes receptores.

Através da microscopia conseguimos identificar que o LPS induz alteração fenotípica dos macrófagos, confirmado pela ativação de NF- $\kappa$ B, produção de NO e

atividade de fagocitose; já a expressão de citocinas pró-inflamatórias não foi alterada significativamente. Nesse contexto, o RAGE se mostrou relevante, uma vez que o seu silenciamento gênico foi capaz de diminuir os efeitos identificados, principalmente quando silenciado sozinho (associado à inibição de TLR4 não teve efeito sinérgico). A IL-4 também desencadeou uma resposta nos macrófagos, alterando sua morfologia, porém sem alterações dos marcadores inflamatórios. Assim, identificamos o envolvimento evidente dos receptores, majoritariamente do RAGE, nas respostas pró-inflamatórias desencadeadas pelo LPS, mas sem comprovações de sinergismo com o TLR4.

Os agonistas HSP70 e HMGB1, corroborando com a literatura, foram capazes de perpetuar o quadro pró-inflamatório, como visto pela indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO. Paralelamente, diminuíram a resposta alternativa, avaliada pela expressão de genes anti-inflamatórios. Já no experimento de fagocitose, apenas a HSP70 foi capaz de estimular essa resposta celular de macrófagos.

Como a ativação de RAGE nas reações inflamatórias desencadeia um círculo vicioso de retroalimentação positiva, a perpetuação da sinalização de RAGE nas vias reguladas por TLR4 pode ser prejudicial (Gasiorowski et al., 2018). Trabalhos anteriores do nosso grupo mostram que, ao bloquear o RAGE, a maioria de dos danos relacionados à DP são evitados, mas não todos, bem como em modelo celular RAGE está modulando a maioria das respostas ativadas por HPS70 extracelular (SOMENSI; BRUM; DE MIRANDA RAMOS; GASPAROTTO *et al.*, 2017).

Os dados celulares ainda não se encontram conclusivos, porém os resultados obtidos até então nos levam a propor um papel essencial dos receptores na

modulação positiva da resposta pró-inflamatória, mas não diretamente na modulação da atividade anti-inflamatória. Mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos pelos quais o RAGE por si só ou associado ao TLR4 é capaz de mediar o gatilho e perpetuação da resposta imunológica, bem como o agravamento do quadro inflamatório.

## 6 Conclusões

As pesquisas desenvolvidas nesta tese visam elucidar os mecanismos nos quais o RAGE, TLR4 e seus ligantes estão envolvidos durante processos inflamatórios, bem como neuroinflamatórios e neurodegenerativos da Doença de Parkinson. Para isso, utilizamos três modelos de estudo: um clínico, com pacientes diagnosticados com DP, um modelo *in vivo* de denervação dopaminérgica, e um estudo *in vitro* utilizando modelo celular de macrófagos.

Nos estudos desta tese demonstramos que os agonistas de TLR4 e RAGE presentes no soro dos pacientes com Parkinson estão ligados a processos inflamatórios, que possuem alteração de perfil ao longo do tempo. Conjuntamente eles funcionam como bons preditores da doença. Já a ausência do receptor TLR4 no modelo de denervação dopaminérgica exerceu apenas proteção parcial, principalmente no que diz respeito a comportamentos não motores iniciais, neuroinflamação e degeneração em fêmeas. Em macrófagos em cultura, o RAGE se mostrou mais relevante nas respostas pró-inflamatórias, e, a priori, o bloqueio de ambos os receptores não mostrou efeito protetor.

Concluimos que os receptores RAGE e TLR4 são importantes para os desfechos inflamatórios e celulares, como a ativação de células imunológicas, neuroproteção em um quadro de neuroinflamação e desenvolvimento da doença de Parkinson. Mais estudos não necessários para entender o *crosstalk* molecular e celular de RAGE e TLR *in vitro* para poder ser aplicado em ensaios *in vivo* e pesquisa clínica. Assim, poderemos estabelecer como esses receptores são capazes de regular respostas em diferentes contextos, e validar um alvo para o tratamento de processos inflamatórios e neuroinflamatórios.

## 7 Perspectivas

Assim como todo trabalho, possuímos limitações que nos impediram de desenvolver todos os objetivos estabelecidos para a tese. Contudo, devido à situação de calamidade ocasionada pela da pandemia do covid-19, precisamos realizar novos delineamentos e adaptar as pesquisas que estavam em desenvolvimento. No estudo clínico, houve suspensão temporária do acompanhamento dos pacientes para a reavaliação, além da finalização do recrutamento de novos indivíduos. Já no estudo *in vivo*, em que planejávamos realizar duas levas de experimentação animal, conseguimos realizar apenas o primeiro ensaio, ficando com algumas questões em aberto. O estudo *in vitro* foi atrasado e os experimentos estão em andamento.

Portanto, apresentamos algumas perspectivas para cada estudo:

### *Estudo clínico:*

- Finalizar as avaliações séricas em todos os indivíduos do estudo, principalmente na reavaliação, priorizando a dosagem de  $\alpha$ -sinucleína e  $\beta$ -amiloide;
- Avaliar o conteúdo RAGE e TLR4 nas células mononucleares do sangue (PBMCs, do inglês “*peripheral blood mononuclear cells*”) e linfócitos, bem como o imunocónteuódo sérico de RAGE solúvel.

### *Modelo in vivo:*

- Realizar nova experimentação animal utilizando o mesmo o modelo de denervação dopaminérgica intraestriatal em camundongos nocautes para *TLR4*. Deseja-se acompanhar esses animais em diferentes tempos: após uma, quatro e

oito semanas, avaliando os comportamentos juntamente com os imunocorrelatos cerebrais avaliados, a fim de correlacionar esses aspectos na evolução da patologia;

- Nas fêmeas, realizar a dosagem hormonal de estrogênio e ciclagem;
- Avaliar a presença de citocinas e DAMPS/agonistas de TLR e RAGE no soro dos animais, a fim de correlacioná-los com os achados dos pacientes;
- Realizar a dosagem de dopamina e receptores/transportadores de dopamina no estriado e substância negra;
- Detectar o imunocorrelato de proteínas sinalizadoras de vias inflamatórias e apoptóticas no cérebro e sangue dos animais;

Modelo *in vitro*:

- Padronizar os protocolos de polarização e confirmar resultados obtidos, através de dos ensaios de RT-qPCR, ativação de NF- $\kappa$ B, fagocitose e produção de óxido nítrico;
- Mensurar a atividade de fagocitose através de citometria de fluxo, avaliando células individualmente;
- Analisar a atividade da enzima NADPH oxidase e expressão das suas subunidades, como um parâmetro complementar na avaliação da ativação de macrófagos, especialmente através de RAGE;
- Avaliar vias de sinalização inflamatórias e apoptóticas ativadas em nosso modelo;
- Por fim, deseja-se avaliar se meio condicionado com o soro de pacientes com DP é capaz de modular as atividades inflamatórias de macrófagos, e a contribuição de TLR4 e RAGE nestes eventos através do uso dos seus inibidores farmacológicos.

## 8 Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. J.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2015. 536 p.

ANDERSSON, U.; YANG, H.; HARRIS, H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. **Expert Opin Ther Targets**, 22, n. 3, p. 263-277, Mar 2018.

BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C. *et al.* Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Mov Disord**, 21, n. 6, p. 800-808, Jun 2006.

BECKER, M.; DE BASTIANI, M. A.; PARISI, M. M.; GUMA, F. *et al.* Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease. *In: Sci Rep*, 2015. v. 5.

BECKER, M.; DE BASTIANI, M. A.; PARISI, M. M.; GUMA, F. T. *et al.* Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease. **Sci Rep**, 5, p. 13351, Aug 25 2015.

BLATTEIS, C. M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Prog Brain Res**, 91, p. 409-412, 1992.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, 8, n. 1, p. 57-69, Jan 2007.

BONGARZONE, S.; SAVICKAS, V.; LUZI, F.; GEE, A. D. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. **J Med Chem**, 60, n. 17, p. 7213-7232, Sep 14 2017.

BOPP, C.; BIERHAUS, A.; HOFER, S.; BOUCHON, A. *et al.* Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. **Crit Care**, 12, n. 1, p. 201, 2008.

BUCHANAN, M. M.; HUTCHINSON, M.; WATKINS, L. R.; YIN, H. Toll-like Receptor 4 in CNS Pathologies. **J Neurochem**, 114, n. 1, p. 13-27, Jul 2010.

CAMPOLO, M.; PATERNITI, I.; SIRACUSA, R.; FILIPPONE, A. *et al.* TLR4 Absence Reduces Neuroinflammation and Inflammasome Activation in Parkinson's Diseases in Vivo Model. **Brain, behavior, and immunity**, 76, Feb 2019 2019.

CHAUDHURI, K.; HEALY, D.; SCHAPIRA, A. Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease: Diagnosis and Management. **The Lancet. Neurology**, 5, n. 3, 2006 Mar 2006.

CHAVAKIS, T.; BIERHAUS, A.; AL-FAKHRI, N.; SCHNEIDER, D. *et al.* The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. **J Exp Med**, 198, n. 10, p. 1507-1515, Nov 17 2003.

CHEN, X.; WALKER, D. G.; SCHMIDT, A. M.; ARANCIO, O. *et al.* RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. **Curr Mol Med**, 7, n. 8, p. 735-742, Dec 2007.

CHUAH, Y. K.; BASIR, R.; TALIB, H.; TIE, T. H. *et al.* Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **Int J Inflam**, 2013, p. 403460, 2013.

COLOMBO, D.; ABBRUZZESE, G.; ANTONINI, A.; BARONE, P. *et al.* The "Gender Factor" in Wearing-Off among Patients with Parkinson's Disease: A Post Hoc Analysis of DEEP Study. **ScientificWorldJournal**, 2015, 2015.

D, S. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends in neurosciences**, 30, n. 5, 2007 May 2007.

DALFO, E.; PORTERO-OTIN, M.; AYALA, V.; MARTINEZ, A. *et al.* Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 64, n. 9, p. 816-830, Sep 2005.

DILLON, S.; AGRAWAL, S.; BANERJEE, K.; LETTERIO, J. *et al.* Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **J Clin Invest**, 116, n. 4, p. 916-928, Apr 2006.

EG, N.; E, B.; FR, S.; HW, S. *et al.* Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. **Neurobiology of aging**, 33, n. 1, 2012 Jan 2012.

EHRCHEN, J. M.; SUNDERKOTTER, C.; FOELL, D.; VOGL, T. *et al.* The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. **J Leukoc Biol**, 86, n. 3, p. 557-566, Sep 2009.

FILIPPI-CHIELA, E. C.; BUENO E SILVA, M. M.; THOME, M. P.; LENZ, G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, 11, n. 7, p. 1099-1113, 2015.

FRODERMANN, V.; CHAU, T. A.; SAYEDYAHOSSEIN, S.; TOTH, J. M. *et al.* A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis**, 204, n. 2, p. 253-262, Jul 15 2011.

GAO, H. M.; KOTZBAUER, P. T.; URYU, K.; LEIGHT, S. *et al.* Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. **J Neurosci**, 28, n. 30, p. 7687-7698, Jul 23 2008.

GAO, J.; TENG, J.; LIU, H.; HAN, X. *et al.* Association of RAGE gene polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population. **Neurosci Lett**, 559, p. 158-162, Jan 24 2014.

GAO, X.; CHEN, H.; SCHWARZSCHILD, M. A.; ASCHERIO, A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. **Neurology**, 76, n. 10, p. 863-869, Mar 8 2011.

GASIOROWSKI, K.; BROKOS, B.; ECHEVERRIA, V.; BARRETO, G. E. *et al.* RAGE-TLR Crosstalk Sustains Chronic Inflammation in Neurodegeneration. **Mol Neurobiol**, 55, n. 2, p. 1463-1476, Feb 2018.

GASPAROTTO, J.; RIBEIRO, C.; DA ROSA-SILVA, H.; BORTOLIN, R. *et al.* Systemic Inflammation Changes the Site of RAGE Expression From Endothelial Cells to Neurons in Different Brain Areas. **Molecular neurobiology**, 56, n. 5, 2019 May 2019.

GASPAROTTO, J.; RIBEIRO, C. T.; BORTOLIN, R. C.; SOMENSI, N. *et al.* Anti-RAGE antibody selectively blocks acute systemic inflammatory responses to LPS in serum, liver, CSF and striatum. **Brain Behav Immun**, 62, p. 124-136, May 2017.

GASPAROTTO, J.; RIBEIRO, C. T.; BORTOLIN, R. C.; SOMENSI, N. *et al.* Targeted inhibition of RAGE in substantia nigra of rats blocks 6-OHDA-induced dopaminergic denervation. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 8795, Aug 18 2017.

GERHARD, A.; PAVESE, N.; HOTTON, G.; TURKHEIMER, F. *et al.* In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, 21, n. 2, p. 404-412, Feb 2006.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C. *et al.* Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, 140, n. 6, p. 918-934, Mar 19 2010.

GLINKA, Y.; TIPTON, K.; YOUDIM, M. Nature of Inhibition of Mitochondrial Respiratory Complex I by 6-Hydroxydopamine. **Journal of neurochemistry**, 66, n. 5, May 1996.

GOEDERT, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, 2, n. 7, p. 492-501, Jul 2001.

GRUNWALD, M. S.; LIGABUE-BRAUN, R.; SOUZA, C. S.; HEIMFARTH, L. *et al.* Putative model for heat shock protein 70 complexation with receptor of advanced glycation end products through fluorescence proximity assays and normal mode analyses. **Cell Stress Chaperones**, Nov 17 2016.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of neurochemistry**, 97, n. 6, 2006 Jun 2006.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. A timeline for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 16, n. 2, p. 79-84, Feb 2010.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine Model and Parkinsonian Pathophysiology: Novel Findings in an Older Model. **Neurologia (Barcelona, Spain)**, 32, n. 8, Oct 2017 2017.

HIRSCH, E. C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 18 Suppl 1, p. S210-212, Jan 2012.

HUTTUNEN, H. J.; FAGES, C.; RAUVALA, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. **J Biol Chem**, 274, n. 28, p. 19919-19924, Jul 9 1999.

I, S.; C, I. Understanding the Role of Protein Glycation in the Amyloid Aggregation Process. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 12, 06/21/2021 2021.

JACKSON-LEWIS, V.; SMEYNE, R. J. MPTP and SNpc DA neuronal vulnerability: role of dopamine, superoxide and nitric oxide in neurotoxicity. Minireview. **Neurotox Res**, 7, n. 3, p. 193-202, 2005.

JANSSEN-HEININGER, Y. M.; POYNTER, M. E.; BAEUERLE, P. A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. **Free Radic Biol Med**, 28, n. 9, p. 1317-1327, May 1 2000.

JIANG, X.; WANG, X.; TUO, M.; MA, J. *et al.* RAGE and its emerging role in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, 672, p. 65-69, Apr 13 2018.

JONIEC, I.; CIESIELSKA, A.; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I.; PRZYBYLKOWSKI, A. *et al.* Age- And Sex-Differences in the Nitric Oxide Synthase Expression and Dopamine Concentration in the Murine Model of Parkinson's Disease Induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Brain research**, 1261, 03/19/2009 2009.

JUDY R. VAN BEIJNUM, W. A. B. W. G. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) | SpringerLink. **Angiogenesis**, 2008.

JURADO-CORONEL, J.; CABEZAS, R.; ÁVILA RODRÍGUEZ, M.; ECHEVERRIA, V. *et al.* Sex Differences in Parkinson's Disease: Features on Clinical Symptoms, Treatment Outcome, Sexual Hormones and Genetics. **Frontiers in neuroendocrinology**, 50, Jul 2018 2018.

JURANEK, J. K.; DAFFU, G. K.; WOJTKIEWICZ, J.; LACOMIS, D. *et al.* Receptor for Advanced Glycation End Products and its Inflammatory Ligands are Upregulated in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Front Cell Neurosci**, 9, p. 485, 2015.

KANNARKAT, G. T.; BOSS, J. M.; TANSEY, M. G. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis**, 3, n. 4, p. 493-514, 2013.

KLEIN, S.; FLANAGAN, K. Sex differences in immune responses. **Nature reviews. Immunology**, 16, n. 10, 2016 Oct 2016.

KOMOHARA, Y.; DEPARTMENT OF CELL PATHOLOGY, G. S. O. M. S., KUMAMOTO UNIVERSITY, KUMAMOTO, JAPAN; OHNISHI, K.; DEPARTMENT OF CELL PATHOLOGY, G. S. O. M. S., KUMAMOTO UNIVERSITY, KUMAMOTO,

JAPAN *et al.* Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **The Journal of Pathology**, 216, n. 1, p. 15-24, 2016.

LAFLAMME, N.; LACROIX, S.; RIVEST, S. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. **J Neurosci**, 19, n. 24, p. 10923-10930, Dec 15 1999.

LEE, M. S.; KIM, Y. J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. **Annu Rev Biochem**, 76, p. 447-480, 2007.

LEHNARDT, S.; MASSILLON, L.; FOLLETT, P.; JENSEN, F. E. *et al.* Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 14, p. 8514-8519, Jul 8 2003.

LEY, K.; PRAMOD, A. B.; CROFT, M.; RAVICHANDRAN, K. S. *et al.* How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. **Front Immunol**, 7, p. 204, 2016.

LI, J.; SCHMIDT, A. M. Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. 1997-06-27 1997.

LIU, J.; BUISMAN-PIJLMAN, F.; HUTCHINSON, M. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. **Frontiers in Neuroscience**, 8, 2014 2014.

LIU, T.; XIANG, A.; PENG, T.; DORAN, A. C. *et al.* HMGB1-C1q complexes regulate macrophage function by switching between leukotriene and specialized proresolving mediator biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116, n. 46, p. 23254-23263, Nov 12 2019.

LUCAS, K.; MAES, M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. **Mol Neurobiol**, 48, n. 1, p. 190-204, Aug 2013.

LUKIC, I. K.; HUMPERT, P. M.; NAWROTH, P. P.; BIERHAUS, A. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Ann N Y Acad Sci**, 1126, p. 76-80, Apr 2008.

LULL, M. E.; BLOCK, M. L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. **Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, 7, n. 4, 2010 Oct 2010.

MACZUREK, A.; SHANMUGAM, K.; MUNCH, G. Inflammation and the redox-sensitive AGE-RAGE pathway as a therapeutic target in Alzheimer's disease. **Ann N Y Acad Sci**, 1126, p. 147-151, Apr 2008.

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**, 38, n. 8, p. 1285-1291, Aug 1988.

MITRA, S.; CHAKRABARTI, N.; DUTTA, S.; RAY, S. *et al.* Gender-specific Brain Regional Variation of Neurons, Endogenous Estrogen, Neuroinflammation and Glial Cells During Rotenone-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, 292, 04/30/2015 2015.

MORRONE, M. D. S.; SOMENSI, N.; FRANZ, L.; RAMOS, V. M. *et al.* BRCA-1 depletion impairs pro-inflammatory polarization and activation of RAW 264.7 macrophages in a NF-kappaB-dependent mechanism. **Mol Cell Biochem**, 462, n. 1-2, p. 11-23, Dec 2019.

MUNCHAU, A.; BHATIA, K. P. Pharmacological treatment of Parkinson's disease. **Postgrad Med J**, 76, n. 900, p. 602-610, Oct 2000.

NAGATSU, T.; MOGI, M.; ICHINOSE, H.; TOGARI, A. Cytokines in Parkinson's Disease. **Journal of neural transmission. Supplementum**, n. 58, 2000 2000.

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

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; NAVARRETE SANTOS, A. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox biology**, 2, 01/09/2014 2014.

PAUDEL, Y. N.; ANGELOPOULOU, E.; PIPERI, C.; OTHMAN, I. *et al.* Impact of HMGB1, RAGE, and TLR4 in Alzheimer's Disease (AD): From Risk Factors to Therapeutic Targeting. **Cells**, 9, n. 2, Feb 7 2020.

PFEIFFER, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 22 Suppl 1, p. S119-122, Jan 2016.

PRANTNER, D.; NALLAR, S.; VOGEL, S. N. The role of RAGE in host pathology and crosstalk between RAGE and TLR4 in innate immune signal transduction pathways. **FASEB J**, 34, n. 12, p. 15659-15674, Dec 2020.

QIN, L.; WU, X.; BLOCK, M. L.; LIU, Y. *et al.* Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. **Glia**, 55, n. 5, p. 453-462, Apr 1 2007.

RABELO, T. K.; GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. A.; GASPAROTTO, J. *et al.* Shikimic acid inhibits LPS-induced cellular pro-inflammatory cytokines and attenuates mechanical hyperalgesia in mice. **Int Immunopharmacol**, 39, p. 97-105, Oct 2016.

REALE, M.; IARLORI, C.; THOMAS, A.; GAMBI, D. *et al.* Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. **Brain Behav Immun**, 23, n. 1, p. 55-63, Jan 2009.

RETTEW, J.; HUET, Y.; MARRIOTT, I. Estrogens Augment Cell Surface TLR4

Expression on Murine Macrophages and Regulate Sepsis Susceptibility in Vivo. **Endocrinology**, 150, n. 8, 2009 Aug 2009.

SAKAGUCHI, M.; MURATA, H.; YAMAMOTO, K.; ONO, T. *et al.* TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. **PLoS One**, 6, n. 8, p. e23132, 2011.

SANTONI, G.; CARDINALI, C.; MORELLI, M. B.; SANTONI, M. *et al.* Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. **J Neuroinflammation**, 12, p. 21, Feb 03 2015.

SARNICO, I.; BRANCA, C.; LANZILLOTTA, A.; PORRINI, V. *et al.* NF-kappaB and epigenetic mechanisms as integrative regulators of brain resilience to anoxic stress. **Brain Res**, 1476, p. 203-210, Oct 2 2012.

SATHE, K.; MAETZLER, W.; LANG, J. D.; MOUNSEY, R. B. *et al.* S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF-alpha pathway. **Brain**, 135, n. Pt 11, p. 3336-3347, Nov 2012.

SCHMIDT, A. M.; YAN, S. D.; YAN, S. F.; STERN, D. M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **J Clin Invest**, 108, n. 7, p. 949-955, Oct 2001.

SCHULZ, I.; KRUSE, N.; GERA, R. G.; KREMER, T. *et al.* Systematic Assessment of 10 Biomarker Candidates Focusing on alpha-Synuclein-Related Disorders. **Mov Disord**, 36, n. 12, p. 2874-2887, Dec 2021.

SLAUGHTER, J. R.; SLAUGHTER, K. A.; NICHOLS, D.; HOLMES, S. E. *et al.* Prevalence, Clinical Manifestations, Etiology, and Treatment of Depression in Parkinson's Disease. 2001-05-01 2001. research-article.

SOMENSI, N.; BRUM, P. O.; DE MIRANDA RAMOS, V.; GASPAROTTO, J. *et al.* Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF-kB and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells. **Cell Physiol Biochem**, 42, n. 6, p. 2507-2522, 2017.

SON, M.; PORAT, A.; HE, M.; SUURMOND, J. *et al.* C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. **Blood**, 128, n. 18, p. 2218-2228, Nov 3 2016.

SORCI, G.; BIANCHI, R.; RIUZZI, F.; TUBARO, C. *et al.* S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. **Cardiovasc Psychiatry Neurol**, 2010, 2010.

SRIKANTH, V.; MACZUREK, A.; PHAN, T.; STEELE, M. *et al.* Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 32, n. 5, p. 763-777, May 2011.

STREIT, W. J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. **Glia**, 40, n. 2, p. 133-139, Nov 2002.

SU, X.; FEDEROFF, H. J. Immune responses in Parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems. **Biomed Res Int**, 2014, p. 275178, 2014.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, 30, n. 5, p. 244-250, May 2007.

TANG, S. C.; ARUMUGAM, T. V.; XU, X.; CHENG, A. *et al.* Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 34, p. 13798-13803, Aug 21 2007.

TANG, S. C.; LATHIA, J. D.; SELVARAJ, P. K.; JO, D. G. *et al.* Toll-Like Receptor-4 Mediates Neuronal Apoptosis Induced by Amyloid  $\beta$ -Peptide and the Membrane Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal. **Exp Neurol**, 213, n. 1, p. 114-121, Sep 2008.

TANSEY, M. G.; ROMERO-RAMOS, M. Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. **Eur J Neurosci**, 49, n. 3, p. 364-383, Feb 2019.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, 420, n. 6917, p. 853-859, Dec 19-26 2002.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. **Front Immunol**, 11, p. 1066, 2020.

VAN DEN EEDEN, S.; TANNER, C.; BERNSTEIN, A.; FROSS, R. *et al.* Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American journal of epidemiology**, 157, n. 11, 06/01/2003 2003.

VAN NOORT, J. M.; BSIBSI, M. Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. **Prog Brain Res**, 175, p. 139-148, 2009.

VOGEL, S. N.; FITZGERALD, K. A.; FENTON, M. J. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. **Mol Interv**, 3, n. 8, p. 466-477, Dec 2003.

WILLIAMS-GRAY, C. H.; WIJEYEKOON, R.; YARNALL, A. J.; LAWSON, R. A. *et al.* Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). **Mov Disord**, 31, n. 7, p. 995-1003, Jul 2016.

WINK, D.; B HINES, H.; CHENG, R.; SWITZER, C. *et al.* **Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response.** 2011. 873-891 p.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H. O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D. *et al.* Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, 26

Suppl 1, p. S1-58, Jun 2011.

Y, X.; H, S.; Q, B.; Y, W. *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Estrogen Deficiency-Induced Depression- And Anxiety-Like Behavior and Hippocampal Inflammation in Mice. **Brain, behavior, and immunity**, 56, 2016 Aug 2016.

YK, C.; R, B.; H, T.; TH, T. *et al.* Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **International journal of inflammation**, 2013, 2013 2013.

ZHANG, L.; BUKULIN, M.; KOJRO, E.; ROTH, A. *et al.* Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. **J Biol Chem**, 283, n. 51, p. 35507-35516, Dec 19 2008.

ZHAO, X.-D.; WANG, F.-X.; CAO, W.-F.; ZHANG, Y.-H. *et al.* TLR4 signaling mediates AP-1 activation in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. **International Immunopharmacology**, 32, p. 96-102, 2016/03/01/ 2016.

ZHONG, H.; LI, X.; ZHOU, S.; JIANG, P. *et al.* Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. **J Immunol**, 205, n. 3, p. 767-775, Aug 1 2020.

ZONG, H.; MADDEN, A.; WARD, M.; MOONEY, M. H. *et al.* Homodimerization is essential for the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated signal transduction. **J Biol Chem**, 285, n. 30, p. 23137-23146, Jul 23 2010.