

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

Camila Tiefensee Ribeiro

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE HSP70 CONTRA  
DENERVAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA**

Porto Alegre

2020

Camila Tiefensee Ribeiro

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE HSP70 CONTRA  
DENERVAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA**

Dissertação 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 mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pens Gelain  
Coorientador: Dr. Juciano Gasparotto

Porto Alegre

2020

## CIP - Catalogação na Publicação

Tiefensee Ribeiro, Camila  
Efeitos da administração intranasal de HSP70 contra  
denervação dopaminérgica induzida por  
6-hidroxidopamina / Camila Tiefensee Ribeiro. -- 2020.  
84 f.  
Orientador: Daniel Pens Gelain.

Coorientador: Juciano Gasparotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. HSP70 . 2. Tratamento intranasal. 3. 6-OHDA. 4.  
Denervação dopaminérgica. 5. Neuroinflamação. I. Pens  
Gelain, Daniel, orient. II. Gasparotto, Juciano,  
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## Agradecimentos

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Bioquímica, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica e aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES, PROPESQ-UFRGS e FAPERGS por possibilitarem a realização do meu trabalho de mestrado. Ao Centro de Estudos em Estresse Oxidativos, e aos chefes do grupo, Zé Cláudio e Daniel, fica meu agradecimento por possibilitarem a realização deste trabalho, o meu aprendizado e crescimento científico, além de todo o apoio e disponibilidade que me propiciaram em todo tempo que estive inserida no laboratório. Obrigada pela oportunidade de trabalhar em um ambiente tão bom, como é o laboratório 32.

Ao Daniel, como meu orientador, fica o meu profundo agradecimento por toda a orientação ao longo da minha caminhada na vida científica. Obrigada por toda troca de ideias, por toda a disponibilidade, por todas discussões de experimentos, projetos e resultados, por todas as conversas, por toda a parceria. Obrigada por se importar. Foi muito bom ser tua orientada e poder trabalhar contigo. Ao meu coorientador, Juciano, fica o meu profundo agradecimento por todo tempo investido e todo o conhecimento dividido comigo, foi uma honra ter tido a oportunidade de aprender tanto contigo.

Aos meus amigos e colegas do laboratório 32 fica a minha profunda gratidão. Vocês são incríveis, é muito bom poder trabalhar com tanta gente boa e capaz. A realização deste trabalho não seria possível sem vocês. Meu muito obrigada a todos os alunos de iniciação científica que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Daniel Peixoto. Tu é ótimo Dani, obrigada por me ajudar em quase todas etapas da parte experimental e também por sempre me questionar, me ajudando a pensar. Eu não posso deixar de agradecer também ao Lucas e a

Carol, meus amigos queridos, rei e rainha do RTq-PCR, que nunca mediram esforços para me ajudar. E aos meus amigos, Pedro e Alexandre, que estiveram a todo tempo me dando suporte, seja na vida ou na bancada. Eu tenho muita sorte de ter tantos amigos neste laboratório, incluindo os que não foram aqui citados nominalmente, e sou imensamente grata pela nossa convivência, por toda ajuda e por todo apoio que vocês me deram diariamente.

Não menos importante, eu quero agradecer a minha família. Para mim, o conceito de família diz muito mais sobre laços de afeto do que de sangue. Então, estendo esse agradecimento a todos que para mim são tipo família, a todos que me encheram de amor e afeto, me dando suporte para que eu concluísse mais essa etapa. Em especial, agradeço a minha mãe e minha irmã, Marisa e Luísa. Obrigada por sempre estarem perto, acreditando em mim e torcendo pela minha felicidade. Mãe, obrigada por ser amor, carinho, cuidado, colo, compreensão e respeito. Obrigada por tentar entender a minha forma de ver o mundo. Muito obrigada por sempre apostar em mim e proporcionar que eu pudesse viver da pesquisa estes anos, sem ti nada disso seria possível. Eu quero agradecer também ao Lucas, meu namorado, meu amor, meu parceiro de vida, que me ouviu falando sem parar da dissertação por um período que pareceu interminável, sendo sempre compreensivo, me incentivando e me dando muito amor. Amor, a gente está junto nessa. Por último, agradeço também aos amigos maravilhosos que a vida me deu. Muito obrigada a todos vocês por serem parte da minha rede de suporte, por ouvirem minhas lamentações, meus medos e minhas angústias. Obrigada também por vibrarem a cada uma das minhas pequenas vitórias e estarem comigo nessa caminha linda e louca que é a vida. Eu amo muito vocês.

## **Apresentação**

O trabalho apresentado nesta dissertação foi desenvolvido no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Pens Gelain e coorientação do Dr. Juciano Gasparotto. Esta dissertação é apresentada em três partes, onde cada parte é constituída pelos seguintes itens:

### **Parte I**

Resumo, *Abstract* (versão do resumo em inglês), Lista de Abreviaturas, Introdução e Objetivos.

### **Parte II**

Metodologia e resultados são apresentados nesta parte, sendo dispostos em dois capítulos:

Capítulo I - contém um manuscrito de artigo científico, escrito em inglês.

Capítulo II - contém resultados adicionais aos apresentados no capítulo I.

### **Parte III**

Discussão, Conclusão e Perspectivas.

### **Referências**

As referências bibliográficas citadas na dissertação encontram-se numa quarta parte, com exceção das referências citadas no capítulo I.

## Índice

<b>Parte I</b> .....	1
Resumo.....	2
<i>Abstract</i> .....	3
Lista de Abreviaturas .....	4
Introdução .....	5
1. Doença de Parkinson.....	5
2. Proteínas de Choque Térmico .....	7
3. HSP70 e PD.....	8
Objetivos do trabalho .....	11
<b>Parte II</b> .....	12
Capítulo I	
Intranasal HSP70 administration protects against dopaminergic denervation and modulates neuroinflammatory response in 6-OHDA rat model. ....	13
Abstract.....	15
1. Introduction .....	16
2. Methods .....	18
2.1 <i>Ethics Statement</i> .....	18
2.2 <i>Animals and experimental design</i> .....	18
2.3 <i>Intrastriatal injection of 6-OHDA</i> .....	19
2.4 <i>HSP70 treatment</i> .....	20
2.4.1 <i>Recombinant HSP70 expression and purification</i> .....	20

2.4.2	<i>Intranasal administration</i> .....	20
2.5	<i>Behavior tests</i> .....	21
2.5.1	<i>Ladder Rung Walking Test</i> .....	21
2.5.2	<i>Open field test</i> .....	21
2.5.3	<i>Apomorphine-induced rotation test</i> .....	22
2.6	<i>Immunofluorescence</i> .....	22
2.7	<i>Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)</i> .....	23
2.8	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> .....	24
2.9	<i>Statistical analysis</i> .....	24
3.	<i>Results</i> .....	25
3.1	<i>Neuroprotective effect of HSP70 intranasal against 6-OHDA insult</i> .....	25
3.2	<i>HSP70 treatment reduces glial activation induced by 6-OHDA</i> .....	26
3.3	<i>Modulation of proinflammatory cytokines by intranasal HSP70 treatment</i> .....	26
4.	<i>Discussion</i> .....	27
5.	<i>Conclusion</i> .....	30
6.	<i>Conflicts of interest</i> .....	31
7.	<i>Funding Sources</i> .....	31
8.	<i>References</i> .....	31
9.	<i>Tables and Figures</i> .....	38
 Capítulo II		
	<i>Resultados adicionais</i> .....	49



1. Metodologia .....	50
2. Resultados .....	51
3. Figuras e Tabela .....	52
<b>Parte III</b> .....	<b>56</b>
Discussão .....	57
Conclusão .....	67
Perspectivas.....	68
<b>Referências</b> .....	<b>69</b>

## **Parte I**

## Resumo

HSP70 é uma das principais chaperonas moleculares envolvidas na resposta ao estresse celular. Além de sua função como chaperona, a HSP70 pode modular respostas imunes. Quantidades insuficientes da forma induzível da HSP70 são encontradas em neurônios maduros, os tornando mais suscetíveis a alterações no ambiente intra- e extracelular. Por outro lado, a administração de HSP70 exógena demonstrou ter efeitos neuroprotetores em modelos animais de doenças relacionadas ao envelhecimento. Neste trabalho, nós investigamos os efeitos da HSP70 exógena em modelo animal de Doença Parkinson (PD). Após insulto com 6-hidroxidopamina (6-OHDA - injeção intraestriatal unilateral - 20 µg/rato), os animais receberam 15 dias de tratamento com HSP70 recombinante por via intranasal (2 µg/rato/dia). Nossos resultados indicam efeito neuroprotetor da HSP70 intranasal contra a denervação dopaminérgica induzida por 6-OHDA, uma vez que a HSP70 exógena reduziu a perda de neurônios dopaminérgicos e melhorou déficits comportamentais induzidos por 6-OHDA. Além disso, a HSP70 modulou a resposta neuroinflamatória na substância negra, que é uma característica importante da patogênese da PD. Especificamente o tratamento intranasal com HSP70 reduziu a ativação microglial e a astrogliose induzidas por 6-OHDA, bem como reduziu a expressão do mRNA de IL-1 $\beta$  nesta região. Além disso, o tratamento com HSP70 recombinante aumentou o conteúdo de HSP70 na substância negra de ratos induzidos por 6-OHDA. Portanto, nossos resultados indicam que este aumento do conteúdo de HSP70, após o estresse celular, estaria envolvido na proteção dos neurônios dopaminérgicos contra o insulto da 6-OHDA, através de uma modulação da resposta inflamatória.

Palavras-chave: HSP70, tratamento intranasal, 6-OHDA, denervação dopaminérgica, neuroinflamação.

## **Abstract**

HSP70 is one of the main molecular chaperones involved in the cellular stress response. Beside its chaperone action, HSP70 also modulates immune response. Insufficient amounts of inducible HSP70 were observed in adult neurons, which caused an increased susceptibility to toxic insults in intra- and extracellular environment. On the other hand, exogenous HSP70 administration has demonstrated neuroprotective effects in models of age-related disorders. In this study, we investigated the effects of exogenous HSP70 in an animal model of Parkinson's Disease (PD). After the insult with 6-hydroxydopamine (6-OHDA – unilateral intrastriatal injection – 20 µg/rat), the animals received purified recombinant HSP70 through intranasal administration (2 µg/rat/day), during 15 days. Our results indicated a neuroprotective effect of intranasal HSP70 against dopaminergic denervation induced by 6-OHDA, since exogenous HSP70 reduced the loss of dopaminergic neurons and improved behavior impairments induced by 6-OHDA. Moreover, HSP70 modulated neuroinflammatory response in the *substantia nigra*, which is an important event in PD pathogenesis. Specifically, intranasal treatment reduced microglial activation and astrogliosis induced by 6-OHDA, as well reduced IL-1 $\beta$  mRNA expression in this region. In addition, HSP70 treatment increased the content of HSP70 in the *substantia nigra* of rats induced by 6-OHDA. Therefore, our results indicate that this increase in HSP70 content, after cellular stress, would be involved in the protection of dopaminergic neurons against the insult of 6-OHDA, through a modulation of the inflammatory response.

Key-words: HSP70, intranasal treatment, 6-OHDA, dopaminergic denervation, neuroinflammation.

## Lista de Abreviaturas

**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina | *6-hydroxydopamine*

**$\alpha$ -syn:** alfa-sinucleína | *alpha-synuclein*

**BBB:** barreira hematoencefálica | *blood-brain barrier*

**CNS:** sistema nervoso central | *central nervous system*

**CSF:** líquido cefalorraquidiano | *cerebrospinal fluid*

**DA:** dopaminérgico (os)(a)(as) | *dopaminergic*

**ELISA:** ensaio de imunoabsorção enzimática | *enzyme-linked immunosorbent assay*

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial | *glial fibrillary acidic protein*

**HSPs:** Proteínas de Choque Térmico | *Heat Shock Proteins*

**HSP70:** proteína de choque térmico de 70 kDa | *70 kDa heat shock protein*

**Iba1:** molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 | *ionized calcium-binding adapter molecule 1*

**IL-1 $\beta$ :** interleucina -1beta | *interleukin-1beta*

**IL-6:** interleucina-6 | *interleukin-6*

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

**PD:** Doença de Parkinson | *Parkinson's disease*

**SNpc:** substância negra *pars compacta* | *substantia nigra pars compacta*

**Tat:** Transativador de transcrição | *trans-activator of transcription*

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral -alpha | *tumor necrosis factor – alpha*

**TH:** tirosina hidroxilase | *tyrosine hydroxylase*

## Introdução

### 1. Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (PD) é uma desordem neurodegenerativa progressiva relacionada ao envelhecimento. Esta doença é rara abaixo dos 50 anos, mas sua prevalência vai aumentando com a idade, afetando mais de 1% da população mundial acima de 60 anos. De particular importância, a prevalência de PD pode chegar a mais de 3% da população acima de 80 anos (Poewe *et al.* 2017; de Lau & Breteler 2006). No Brasil, há em torno de 200 mil casos de PD (Dorsey *et al.* 2007), número que tende a crescer ainda mais com o envelhecimento populacional. A PD é caracterizada por sintomas motores, tais como tremores, rigidez, bradicinesia, instabilidade postural, equilíbrio e coordenação prejudicados. Estes sintomas são decorrentes da morte progressiva de neurônios dopaminérgicos (DA) na substância negra *pars compacta* (SNpc), levando à depleção de dopamina no estriado (Dauer & Przedborski 2003). Também são observados sintomas não-motores, os quais podem aparecer anos antes do diagnóstico da doença. Estes sintomas incluem comprometimento cognitivo, disfunção autonômica, distúrbios do sono, depressão e hiposmia (Poewe *et al.* 2017).

O diagnóstico para a PD é clínico, por meio de uma interpretação dos seus sintomas, i.e., não existem marcadores ou testes que facilitem este diagnóstico. Quando os sintomas motores se manifestam, já há uma perda neuronal de 60-80% dos neurônios DA (Dauer & Przedborski 2003). Os tratamentos existentes para doença tratam os sintomas, não revertendo ou desacelerando a morte neuronal. Desta forma, não existe uma cura para PD e os medicamentos para o seu tratamento são de uso contínuo e de alto custo (Dexter & Jenner 2013). No Brasil, o Sistema Único de Saúde provém fármacos para o tratamento da PD (Ministério

da Saúde 2017). Considerando o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento da população, se torna cada vez maior o impacto social e financeiro desta doença.

Na neuropatologia da PD, além da morte dos neurônios DA no eixo nigroestriatal, é também observada agregação de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn) mal empacotada, que se acumula em inclusões intraneuronais conhecidas como Corpos de Lewy (Goedert 2001). Estes agregados  $\alpha$ -syn induzem ativação da imunidade inata e adaptativa na PD. É sugerido que a agregação proteica e a neuroinflamação participem de um ciclo de auto agravamento, uma vez que a neuroinflamação também promove o mal empacotamento da  $\alpha$ -syn (Poewe *et al.* 2017). A neuroinflamação é um evento essencial para a patogênese da PD. Neste contexto, a ativação sustentada da micróglia parece contribuir para toxicidade aos neurônios DA, por meio de regulação positiva na expressão de citocinas pró-inflamatórias (Wang *et al.* 2015).

Devido ao impacto da PD, diversos modelos animais vêm sendo utilizados para estudar novas opções de tratamento para a PD, bem como para melhor entender os mecanismos envolvidos em sua neuropatologia (Gasparotto *et al.* 2017; Tiefensee Ribeiro *et al.* 2019; Qin *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007; Bové & Perier 2012; Klucken *et al.* 2004). Dentre eles, a injeção intraestriatal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) tem sido amplamente utilizada como modelo de PD, uma vez que destrói terminais catecolaminérgicos mimetizando os efeitos causados pela perda de neurônios DA que se projetam da SNpc para o estriado (Lima *et al.* 2012; Tieu 2011). Este modelo de denervação dopaminérgica foi utilizado recentemente para explorar o papel neuroprotetor da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70). A administração de HSP70 fusionada à transativador de transcrição (Tat-HSP70),

por via intraestriatal, demonstrou proteção aos neurônios DA em animais induzidos por 6-OHDA (Tunesi *et al.* 2019).

## **2. Proteínas de Choque Térmico (HSPs)**

HSPs ou chaperonas moleculares compreendem um grupo heterogêneo, o qual é classificado em diferentes famílias com base em seu peso molecular. As chaperonas moleculares podem ser de expressão constitutiva ou induzível. As HSPs de expressão constitutiva facilitam a translação proteica, atuam no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas e na translocação de proteínas entre compartimentos celulares. Já as HSPs de expressão induzível são induzidas em condições de estresse celular, sendo ele químico ou físico. Estas chaperonas moleculares induzidas em resposta ao estresse, são críticas para a manutenção da homeostase proteica. Elas atuam na prevenção e/ou reversão do erro de enovelamento ou agregação de proteínas; na estabilização de elementos do citoesqueleto; têm efeitos anti-apoptóticos e controlam a atividade de proteínas regulatórias (Ebrahimi-Fakhari *et al.* 2011).

A família HSP70 é uma das principais chaperonas moleculares envolvidas na resposta ao estresse celular, atuando como um componente-chave da maquinaria de proteção celular. Essas proteínas são altamente conservadas em função e estrutura, de procariontes a eucariotos (Radons 2016). HSP70 na forma constitutiva e na forma induzível, interagem com segmentos peptídicos hidrofóbicos de proteínas, através da ligação de ATP e posterior hidrólise (Witt 2010). HSP70 atua no processo de enovelamento, auxiliando no renovelamento ou no descarte seguro de proteínas parcialmente ou mal enoveladas (Mayer & Bukau 2005). Além disso, HSP70 possui várias funções não relacionadas a sua ação como chaperona, as quais contribuem para a proteção celular, através da interação com células imunes,



redução do estresse oxidativo e inibição de cascatas de morte celular apoptótica (Dukay *et al.* 2019).

Células liberam HSP70 de forma ativa e seletiva para o meio extracelular. Essa liberação ocorre por meio de vesículas extracelulares, mais especificamente por meio de balsas lipídicas e exossomos (Lyon & Milligan 2019). Em condições homeostáticas, a transmissão de HSPs entre células pode contribuir para a manutenção da proteostase normal. Todavia, a liberação de HSPs para o meio extracelular é exacerbada em condições de estresse. HSPs extracelulares estão envolvidas na regulação da resposta imune e na liberação de citocinas, podendo induzir a expressão de moléculas pró- ou anti-inflamatórias. O fator determinante para a indução de um perfil pró ou anti-inflamatório parece estar relacionado com o estado celular ao liberar HSPs para o meio extracelular e com quais receptores estas HSPs interagem (Dukay *et al.* 2019).

### **3. HSP70 e PD**

A atividade da HSP70 endógena parece ser insuficiente em vários estados patológicos, como em condições de inflamação e degeneração (Radons 2016; Calderwood & Murshid 2017; Murshid *et al.* 2013). No processo de envelhecimento, há um desequilíbrio das funções homeostáticas com predominância do estado pró-inflamatório e com aumento da carga de estresse proteotóxico (Sparkman & Johnson 2008; Ebrahimi-Fakhari *et al.* 2011). Em adição, a expressão e a funcionalidade do HSP70 induzível estão diminuídas no envelhecimento do tecido cerebral e em distúrbios neurodegenerativos (Magrané *et al.* 2004). O papel neuroprotetor da administração exógena de HSP70 foi demonstrado em diferentes modelos animais de distúrbios neurodegenerativos (Bobkova *et al.* 2014; Gifondorwa *et al.* 2007; Pastukhov *et al.* 2014).

No que diz respeito a PD, a depleção da HSP70 pode exacerbar a toxicidade da  $\alpha$ -syn e a neurodegeneração (Ebrahimi-Fakhari *et al.* 2011). De fato, o papel neuroprotetor da HSP70 já havia sido demonstrado em diferentes modelos animais de PD (Klucken *et al.* 2004; Li *et al.* 2019; Nagel *et al.* 2008; Tunesi *et al.* 2019; Pastukhov *et al.* 2014). Klucken *et al.* demonstrou que a superexpressão da HSP70 é protetora contra a agregação anormal de  $\alpha$ -syn em camundongos transgênicos para  $\alpha$ -syn (Klucken *et al.* 2004). Li *et al.* demonstraram um efeito protetor do HSP70 contra a neuroinflamação induzida por rotenona em SH-SY5Y, inibindo NF- $\kappa$ B e STAT3 (Li *et al.* 2019). Tat-HSP70 teve um efeito protetor contra a perda de neurônios DA nos modelos de metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e 6-OHDA (Nagel *et al.* 2008; Tunesi *et al.* 2019). Efeitos neuroprotetores da HSP70 foram observados em modelos de PD com ou sem agregação de  $\alpha$ -syn, indicando envolvimento de funções da HSP70 que não necessariamente estariam relacionadas a sua função de chaperona.

Apesar de seu potencial neuroprotetor, a HSP70 é muito grande para atravessar livremente barreira hematoencefálica (BBB). Então, uma abordagem eficiente de administração de medicamentos precisa ser adotada para explorar o potencial terapêutico da HSP70 nos distúrbios do sistema nervoso central (CNS). A administração intranasal foi apontada em animais e seres humanos como uma abordagem não invasiva eficaz para administrar medicamentos de tamanho grande diretamente no CNS (Ying 2007). Bobkova *et al.* demonstraram que HSP70 marcada com fluorescência é detectada em várias estruturas cerebrais, três horas após a administração intranasal (Bobkova *et al.* 2014). Além disso, trabalhos anteriores demonstram efeito neuroprotetor para a administração de HSP70 intranasal em modelos animais de envelhecimento e de desordens

neurodegenerativas (Bobkova *et al.* 2014; Bobkova *et al.* 2015; Pastukhov *et al.* 2014). Dessa forma, neste trabalho nós hipotetizamos que o tratamento com a HSP70 por via intranasal teria ação neuroprotetora contra a denervação DA induzida por 6-OHDA.

## **Objetivos do trabalho**

Considerando: i) o papel neuroprotetor da HSP70 exógena em modelos de doenças neurológicas; ii) a baixa expressão da forma induzível de HSP70 em neurônios maduros; iii) a interação da HSP70 com moléculas do sistema imune; iv) a relevância da modulação pró-inflamatória na morte neuronal e na progressão da PD; v) a necessidade por novas terapias pra a PD, que visem reverter a morte neuronal e não somente tratar os sintomas, o presente trabalho tem como objetivo geral **investigar os efeitos da administração intranasal de HSP70 exógena na denervação DA induzida por 6-OHDA.**

Para atingir tal objetivo, iremos avaliar os efeitos da administração intranasal de HSP70 exógena:

- a) na morte de neurônios DA na SNpc
- b) em parâmetros comportamentais
- c) na modulação da ativação da micróglia e dos astrócitos na SNpc
- d) na expressão de citocinas pró-inflamatórias na SNpc, no soro e no líquido cefalorraquidiano (CSF)
- e) na modulação do conteúdo de HSP70 na SNpc

de ratos induzidos por 6-OHDA.

## Parte II

## Capítulo I

Intranasal HSP70 administration protects against dopaminergic denervation and modulates neuroinflammatory response in 6-OHDA rat model

A metodologia e os resultados desta dissertação são apresentados neste capítulo, em formato de um manuscrito de artigo científico, o qual será submetido ao periódico “*Journal of Neurochemistry*”.

**Intranasal HSP70 administration protects against dopaminergic denervation and modulates neuroinflammatory response in 6-OHDA rat model.**

Camila Tiefensee Ribeiro<sup>a\*</sup>, Daniel Oppermann Peixoto<sup>a</sup>, Lucas dos Santos da Silva<sup>a</sup>, Carolina Saibro Girardi<sup>a</sup>, Pedro Ozorio Brum<sup>a</sup>, Flávio Gabriel Carazza Kessler<sup>a</sup>, Nauana Somensi<sup>a</sup>, Luiza Marques Prates Behrens<sup>a</sup>, Reykla Ramon Bittencourt<sup>a</sup>, Laíssa Santos Soares<sup>a</sup>, Alexandre KleberSilveira<sup>a</sup>, José Cláudio Fonseca Moreira<sup>a</sup>, Juciano Gasparotto<sup>a</sup>, Daniel Pens Gelain<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS – Brazil;

\*Correspondence adress: Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308-5577, Fax: +55 51 3308-5535. E-mail: camilatiefensee@gmail.com

## Abstract

HSP70 is one of the main molecular chaperones involved in the cellular stress response. Beside its function as chaperone, HSP70 also modulates immune response. Insufficient amounts of inducible HSP70 were observed in adult neurons, which caused an increased susceptibility to toxic insults in intra- and extracellular environment. In addition, exogenous HSP70 administration has demonstrated neuroprotective effects in experimental models of age-related disorders. In this study, we investigated the effects of exogenous HSP70 in an animal model of Parkinson's Disease (PD). After, the insult with 6-hydroxydopamine (6-OHDA – unilateral intrastriatal injection – 20 µg/rat), the animals received recombinant HSP70 via intranasal (2 µg/rat/day), during 15 days. Our results indicate a neuroprotective effect of intranasal HSP70 against dopaminergic denervation induced by 6-OHDA. Exogenous HSP70 reduced the loss of dopaminergic neurons and improve behavior impairments induced by 6-OHDA. Moreover, HSP70 modulated neuroinflammatory response in the *substantia nigra*, which is an important factor in PD pathogenesis. Specifically, intranasal treatment reduced microglial activation and astrogliosis induced by 6-OHDA, as well reduced IL-1 $\beta$  mRNA expression in this region. Therefore, our results indicate that HSP70 neuroprotective action in 6-OHDA model is related to modulation of inflammatory response.

Key-words: HSP70, intranasal treatment, 6-OHDA, dopaminergic denervation, neuroinflammation.



## 1. Introduction

Heat shock proteins (HSPs) or molecular chaperones constitute a heterogeneous group classified into different families based on their molecular weight. Molecular chaperones induced in response to cellular stress are critical for maintenance of protein homeostasis (Hartl *et al.* 2011). HSP70 family is one of the main molecular chaperones involved in the response to cellular stress, acting as a key component of cellular protection machinery. These proteins are highly conserved in function and structure, from prokaryotes through eukaryotes (Radons 2016). HSP70 acts on folding process, binding to partially unfolded or misfolded proteins and either assist their refolding or directs them to a safe disposal (Mayer & Bukau 2005). In addition, HSP70 has several non-chaperone functions that contribute to cellular protection, through interaction with immune cells, reduction of oxidative stress and inhibition of apoptotic cell death cascades (Dukay *et al.* 2019).

The activity of endogenous HSP70 appears insufficient in several pathological states, such as in conditions of inflammation and degeneration (Radons 2016; Calderwood & Murshid 2017; Murshid *et al.* 2013). During aging, there is a disbalance of cellular homeostasis with a predominance of pro-inflammatory state and with an increase of proteotoxic stress load (Sparkman & Johnson 2008; Ebrahimi-Fakhari *et al.* 2011). Moreover, the expression and functionality of inducible HSP70 decline in the brain tissue with aging and in neurodegenerative disorders (Magrané *et al.* 2004). The neuroprotective role of exogenous HSP70 administration has been demonstrated in several animal models of age-related neurodegenerative disorders (Bobkova *et al.* 2014; Gifondorwa *et al.* 2007; Pastukhov *et al.* 2014).

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) leading to depletion of dopamine in striatum (Dauer & Przedborski 2003). In PD is observed aggregation of misfolded  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn), which accumulates in intraneuronal inclusions named Lewy bodies (Goedert 2001). With respect to PD, the depletion of HSP70 could exacerbate  $\alpha$ -syn toxicity and neurodegeneration (Ebrahimi-Fakhari *et al.* 2011). The neuroprotective role for HSP70 had already been demonstrated in different animal models of PD (Klucken *et al.* 2004; Li *et al.* 2019; Nagel *et al.* 2008; Tunesi *et al.* 2019; Pastukhov *et al.* 2014). Klucken *et al.* demonstrated that overexpression of HSP70 is protective against abnormal  $\alpha$ -syn aggregation in  $\alpha$ -syn transgenic mice (Klucken *et al.* 2004). Li *et al.* demonstrated a protective effect of HSP70 against neuroinflammation induced by rotenone in SH-SY5Y, inhibiting NF- $\kappa$ B and STAT3 (Li *et al.* 2019). HSP70 displayed a protective effect against DA neuron loss in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Nagel *et al.* 2008; Tunesi *et al.* 2019). HSP70 neuroprotective effects were observed in PD models with or without  $\alpha$ -syn aggregation, indicating an involvement of non-chaperone functions in HSP70 protective action.

Despite its neuroprotective potential, HSP70 is too large to freely cross blood-brain barrier (BBB). An efficient approach of drug delivery needs to be adopted to explore HSP70 therapeutically potential in central nervous system (CNS) disorders. Intranasal administration has been demonstrated on both animals and human subjects as effective noninvasive approach to delivery large sized drugs directly in CNS (Ying 2007). Bobkova *et al.* demonstrated that fluorescently-labeled HSP70 was detected in several brain structures three hours after intranasal administration

(Bobkova *et al.* 2014). Also, the neuroprotective effect of intranasal HSP70 was previously demonstrated in animal models of aging and Alzheimer disease (Bobkova *et al.* 2015; Bobkova *et al.* 2014).

In the present work, we demonstrated neuroprotective effects of HSP70 intranasal administration against DA denervation induced by 6-OHDA injection in the striatum of Wistar rats. Fifteen days of HSP70 treatment (2 µg/rat/day) reduced DA neurons loss and improved behavior impairments induced by 6-OHDA. Also, intranasal HSP70 modulates neuroinflammatory response, through reduction of glial activation and mRNA expression of IL-1β in the SNpc. Therefore, HSP70 intranasal administration shows a neuroprotective activity in the nigrostriatal axis, indicating a potential application in PD and related disorders.

## **2. Methods**

### **2.1 Ethics Statement**

All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory 2011) and Behavior recommendations for animal care. Our research protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brazil (CEUA-UFRGS) under the project number #35627.

### **2.2 Animals and experimental design**

Fifty-days-old male Wistar rats were obtained from CREAL-UFRGS breeding colony. Animals were maintained in a twelve-hour light-dark cycle in a temperature-controlled colony room (21°C). The animals were caged in groups of four animals with free access to water and standard commercial food (Chow Nuvilab CR-1 type; PR, BRA). The rats were randomly distributed into four experimental groups (n = 16

per group): Control, HSP70, 6-OHDA and 6-OHDA+HSP70. The animals were handled for 7 days before the procedures to reduce stress caused by subsequent manipulation. Figure 1 summarizes the experimental design applied in this study. Each rat received an intrastriatal injection of 6-OHDA (20 µg/rat) or vehicle (saline with ascorbic acid) (Pang *et al.* 2016). The animals were habituated with a saline intranasal administration for 5 days after the surgical procedure. Then, each rat received a daily intranasal dose of HSP70 (2 µg/rat) or saline (Bobkova *et al.* 2014) for 15 days. Behavior tests were performed on the last 3 days of treatment. On the 21<sup>th</sup> day after the 6-OHDA lesion, all the animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) via an intraperitoneal injection (i.p.). The animals were euthanized by decapitation, serum was collected for ELISA assay, and the brain was dissected for quantitative reverse transcription PCR (n = 8 per group). The remaining rats were perfused via the vascular system for immunofluorescence microscopy assessment (n = 8 per group).

### **2.3 Intrastriatal injection of 6-OHDA**

6-OHDA was purchased from Sigma-Aldrich® (MO, USA) and prepared as a 10 µg/µL solution in 0.02% ascorbic acid dissolved in sterile saline, protected from heat and light. The animals were anesthetized with xylazine (10 mg/kg; i.p.) and ketamine (100 mg/kg; i.p.) for surgical procedure. The anesthetized rats were immobilized on a stereotaxic apparatus (Insight-EFF 338, SP, BRA) by securing via ear and nose bars. The fur was shaved with a pet clipper (SKU #: 09160-210 – Wahl; IL, USA) and 10% povidone-iodine solution was applied to sterilize the incision site. The skulls were perforated at the appropriate location with a dental drill (3 mm). A single dose (2 µL) of 6-OHDA or vehicle was injected into striatum at the following stereotaxic coordinates: antero-posterior (AP): -0.2 mm from bregma; medio-lateral (ML): 2.5

mm from the midline; dorso-ventral (DV): - 5.0 mm from skull, according to the Rat Brain Atlas in Stereotaxic Coordinates (Paxinos & Watson 2005), using a 10- $\mu$ l Hamilton<sup>®</sup> syringe 701SN, needle size 23s ga (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>; MO, USA). Syringe was inserted into the brain at a rate of 2 mm/min and the injection occurred at a rate of 0.5  $\mu$ L/min. After the injection, the syringe was left in the place for 2 min and then removed at a rate of 2 mm/min. The incision was thoroughly cleaned with povidone-iodine solution and closed using three sutures. Lactated Ringer's solution (1 mL) was injected subcutaneously to replenish electrolytes. Nebacetin<sup>®</sup> (5 mg/g neomycin sulfate and 250 UI/g of bacitracin zinc, Medley; RS, BRA) was applied topically on the incision to prevent infections. The animals were placed in a controlled temperature recovery cage (37 °C) until recovery of consciousness.

## **2.4 HSP70 treatment**

### *2.4.1 Recombinant HSP70 expression and purification*

Recombinant HSP70 was expressed in *E. coli* BL21 and transformed with HSP70 plasmid resistant to ampicillin and chloramphenicol, using IPTG. Purification of the recombinant HSP70 was performed by affinity chromatography, followed by gel filtration chromatography. Endotoxins were removed from the purified HSP70, which was proven using the kit Pierce<sup>™</sup> LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (88282 - Thermo Fisher Scientific; MA, USA).

### *2.4.2 Intranasal administration*

All intranasal administrations of purified recombinant HSP70 were unilateral and carried out with the help of a micropipette in the ipsilateral side. Four  $\mu$ L of solution volume were placed in the left nostril and were inhaled by the animal in the process of normal breathing. All animals were habituated with intranasal administration, receiving a daily dose of saline 0.9% via intranasal for 5 days after the surgical

procedure, and they did not show any signs of stress during inoculation. From day 6 to day 20 the groups HSP70 and 6-OHDA+HSP70 received a daily dose of HSP70 (2 µg/rat) via intranasal, whereas the other groups received a dose of saline solution 0.9% (Bobkova *et al.* 2014).

## **2.5 Behavior tests**

### *2.5.1 Ladder Rung Walking Test*

The ladder rung walking test was performed on day 18 to analyze skilled movements and access motor performance. The procedure was performed as describe by Metz and Whishaw (Metz & Whishaw 2002). The apparatus used was a horizontal ladder made of 2 transparent clear boards joining by metal rungs. A regular pattern of rungs (1 cm apart) was used in 3 training sessions. Then, 3 test trials were performed with an irregular pattern of rungs (1 to 3 cm apart). For each trial the pattern of rungs changed, avoiding animals' adaptation. All trials were video recorded and reviewed to evaluate each limb quality of steps and the errors percentual. Qualitative evaluation was performed for each step using a foot fault scoring system. The system uses a 7-category scale: (0) total miss, (1) deep slip, (2) slight slip, (3) replacement, (4) correction, (5) partial placement and (6) correct placement. Then, the average of scores per animal was measured. The percentual of errors was also measured, counting scores of 0, 1 and 2 as errors.

### *2.5.2 Open field test*

Open field test (OPF) was performed on day 19 to access general locomotor activity. The OPF apparatus consist of a square arena (50 x 50 x 50 cm) with black-painted walls. Each animal was placed in the center of the OPF apparatus and allowed to explore the arena during 5 min (Silva *et al.* 2016; Campos *et al.* 2013).

The total distance travelled (m) and average speed (m/s) were determined using the video tracking system ANY-maze (Stoelting Co.; IL, USA).

### *2.5.3 Apomorphine-induced rotation test*

Apomorphine-induced rotation test was performed on day 20 to assess the supersensitivity in the damaged side after DA denervation caused by the unilateral injection of 6-OHDA (Ungerstedt 1971). Apomorphine (A4393) was purchased from Sigma-Aldrich® (MO, USA). Rats received a subcutaneous injection of apomorphine 0.5 mg/kg (dissolved in a 0.2 mg/mL ascorbic acid in 0.9% saline solution) and allowed to acclimate during 15 min. The animals were recorded over a 30 min session in a circular arena and 360-degree contralateral rotations were quantified.

## **2.6 Immunofluorescence**

On day 21, animals were perfused via the vascular system with descending aorta clamped. In this procedure, sterile saline was administered for 10 min followed by more 10 min of 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS pH 7.4. The brains were carefully extracted and maintained into 4% PFA for 24 h at 4 °C, then were transferred to 15% sucrose solution for 24 h at 4 °C followed by immersion in 30% sucrose for additional 24 h at 4 °C. After lightly dried, brains were frozen at -20 °C. Using a cryostat (Jung HistoSlide 2000R; Leica; Heidelberg, DEU) at -20 °C, the SNpc region was sectioned in slices of 20 µm thickness on the coronal plane, which were collected in PBS containing 0.2% Triton X-100 (PBST). To block nonspecific binding, the sections were incubated with 3% albumin for 1 h at room temperature (21 ± 3 °C). Then, the tissue slices were incubated with primary antibodies for 48 h at 4 °C. The details of the antibody source and dilutions are as follows: anti-TH (1:500; sc-25269) was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (TX, USA); anti-Iba1

(1:500; PTR2404) was from ©FUJIFILM Wako Pure Chemical; anti-GFAP (1:500; G6171) was from Sigma-Aldrich® (MO, USA); all of them diluted in PBST containing 3% bovine serum albumin. The tissue sections were washed four times in PBST and then incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature. The details of the antibody are as follows: anti-mouse Alexa 488, anti-mouse Alexa 555, anti-rabbit Alexa 488 from Invitrogen (CA, USA); all of them diluted 1:500 in PBST. The sections were washed four times in PBST. Then, the tissue slices were incubated for 5 min with DAPI for nucleic acid staining (1:1000; D9542 - Sigma-Aldrich®; MO, USA). The sections were washed several times in PBST transferred to gelatinized slides, mounted with FluorSave™ (345789 - Merck Millipore; MA, USA) and covered with coverslips. The images were obtained using a Microscopy EVOS FL Auto Imaging System (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific; MA, USA). Quantifications were obtained using the software ImageJ measuring the pixels of images from slices with 20 µm thickness of each animal. The quantification of TH content was obtained from images with 10X of magnification and the results were expressed as the ratio of TH staining in ipsilateral side per contralateral side. Quantification of Iba1 and GFAP were obtained from SNpc region in images with 4X of magnification and the results were expressed as percentual to control.

### ***2.7 Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)***

Total RNA was extracted from SN and striatum with TRIzol® reagent (Invitrogen; CA, USA) according to manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry. cDNA was synthesized with High-Capacity cDNA Reverse Transcription® kit (Thermo Fischer Scientific, USA) using 3 µg of total RNA. RT-qPCR reactions were performed in 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems; CA, USA) with PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher



Scientific, USA) following manufacturer's instructions. Results were expressed in relation to constitutive normalization gene ( $\Delta\text{Ct}$ ) and internal control group ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) using the formula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . The primers used for amplification are available in Table 1.

### **2.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) were quantified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum samples were normalized according to protein content (Bradford, 1976) and incubated in an ELISA plate. After 24 h, the plates were washed three times with PBS + 0.05% Tween 20 (PBSTw). To block nonspecific binding, the plates were incubated with 200  $\mu\text{l}$  of 2,5% albumin for 2 h at room temperature. Subsequently, the plates were washed three times with PBSTw and were incubated with 200  $\mu\text{l}$  of primary antibodies 3 h at room temperature. Antibodies utilized in this assay were anti-IL-1 $\beta$  (1:4000; ab9722), anti-TNF- $\alpha$  (1:4000; ab6671) and anti-IL-6 (1:4000; ab6672) from Abcam (Cambridge, UK). The plates were washed three times with PBSTw and were incubated with rabbit IgG peroxidase-linked secondary antibody (1:4000) for 2 h. Anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (#AP132P) was obtained from Merck Millipore (MA, USA). After washing the plate three times with PBSTw, 100  $\mu\text{l}$  of substrate solution (TMB spectrophotometric ELISA detection kit) was added to each well and incubated for 15 min. The reaction was stopped with 50  $\mu\text{l}$  per well of 12 M sulfuric acid, and the plate was read at 450 nm in SpectraMax i3 Multi-Mode Platform<sup>®</sup> (Molecular Devices, USA).

### **2.9 Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data was evaluated by one-way ANOVA followed

by Tukey's Multiple Comparison *post-hoc* test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1 Neuroprotective effect of HSP70 intranasal against 6-OHDA insult**

Immunostaining of tyrosine hydroxylase (TH - DA neuron marker) was performed to analyze the effect of HSP70 intranasal treatment in DA denervation induced by 6-OHDA. The unilateral injection of 6-OHDA induced a loss of DA neurons in the ipsilateral side, without a reduction of these cells in the contralateral side. The ratio of ipsilateral to contralateral TH staining were decreased in 6-OHDA in comparison to all other groups (Fig 2B). Also, no differences on TH staining were observed between Control, HSP70 and 6-OHDA+HSP70 groups. As shown in Fig. 2, TH staining was decreased in the ipsilateral side of 6-OHDA-treated group, while the treatment with HSP70 significantly protected against loss of TH-positive cells caused by 6-OHDA.

We also perform behavior analysis to access the effect of HSP70 treatment in motor impairments induced by unilateral dopaminergic denervation. At the ladder rung walking test, 6-OHDA treated animals presented a decreased index for quality of steps (Fig. 3A) and increased errors percentage (Fig. 3B) when compared to animals of all other groups. Treatment with HSP70 significantly improved both parameters (Fig. 3A and B). At the OPF animals did not present significant differences of total distance travelled (Fig. 3C) and average speed (Fig. 3D). On apomorphine-induced rotation test, animals of 6-OHDA group performed more contralateral rotations than animals of other groups, including the 6-OHDA+HSP70 group (Fig. 3E). Therefore, the intranasal treatment with HSP70 improved all the behavior parameters that were impaired by 6-OHDA.

### ***3.2 HSP70 treatment reduces glial activation induced by 6-OHDA***

Co-immunostaining of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1 – microglial marker) and glial fibrillary acidic protein (GFAP – astrocyte marker) was performed to analyze the effect of HSP70 intranasal treatment in glial activation in SNpc after 6-OHDA unilateral intrastriatal injection. As shown in Fig. 4A and B, an increase in Iba1 immunostaining was induced by 6-OHDA, and this effect was significantly decreased to control levels by intranasal treatment with HSP70. Moreover, the amoeboid morphology associated to Iba1 staining predominantly observed in the 6-OHDA group was replaced by a pattern of branched cell extensions in the 6-OHDA+HSP70 group, indicating that intranasal HSP70 administration was capable to change the microglial phenotype from activated to resting state. Also, as shown in Fig. 4A and C, 6-OHDA group typically presented severe reactive astrogliosis with increase of GFAP staining and formation of glial scars, and such effects were also significantly inhibited to control levels by intranasal treatment with HSP70. Therefore, these results indicate that HSP70 intranasal treatment reduces glial activation induced by 6-OHDA in the SNpc.

### ***3.3 Modulation of proinflammatory cytokines by intranasal HSP70 treatment***

We analyze mRNA expression of proinflammatory cytokines in the substantia nigra through RT-qPCR analysis. Although a significant difference was not detected between control and 6-OHDA groups, we observed that both groups receiving intranasal HSP70 had a significant reduction in IL-1 $\beta$  mRNA expression compared to 6-OHDA treated animals (Fig. 5A). While no significant differences in TNF- $\alpha$  mRNA expression were found between all groups (Fig. 5B), the increase in IL-6 mRNA expression induced by 6-OHDA was not affected by HSP70 intranasal

treatment (Fig. 5C). We also analyze the protein levels of these proinflammatory cytokines in serum through ELISA assay, and no significative differences between experimental groups on IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  or IL-6 serum levels were found (Fig. 5D, E and F).

#### **4. Discussion**

PD is characterized by motor symptoms, which result from progressive death of DA neurons in SNpc, leading to dopamine depletion in the striatum (Dauer & Przedborski 2003). Intrastratial administration of 6-OHDA is widely used as animal model of PD, since lead to DA denervation of nigrostriatal system. After DA denervation, the supersensitivity of ipsilateral DA receptors lead to contralateral rotations when animals are stimulated by dopamine agonists, such as apomorphine (Ungerstedt 1971). In this study we demonstrated neuroprotective effect of HSP70 against DA denervation induced by 6-OHDA, since intranasal treatment reduced the loss of TH+ neurons and apomorphine-induced contralateral rotations. Although no alterations were observed on general locomotor activity in OPF test, it can be concluded that treatment with HSP70 also improved motor performance, since animals treated with HSP70 presented increased quality of steps and decreased errors percentage compared to 6-OHDA group in ladder rung walking test.

The neuroprotective effect of HSP70 had already been demonstrated in 6-OHDA model, where an intrastratial cannula was used to administrated Tat-Hsp70-loaded composites (Tunesi *et al.* 2019). Another study demonstrated neuroprotective action of Tat-HSP70, which was administered intraperitoneally, in MPTP model. Tat fused HSP70, one of the most commonly used penetrating cells peptides, was used to facilitate the translocation of recombinant HSP70 across cell membranes and BBB (Nagel *et al.* 2008). The HSP70 is too large to cross the BBB freely, in addition it has

a short half-life. After intraperitoneal administration, it is not possible to detect HSP70 in the CNS (Lyon & Milligan 2019). And intravenously, exogenous HSP70 is eliminated from the blood within 1 hour after its administration (Evgen'ev et al. 2018). Thus, to explore the therapeutic potential of HSP70 in CNS disorders, it seems to be interesting to use an efficient approach that can directly access the CNS.

Here, we used intranasal approach to administrated HSP70. Intranasal administration is a noninvasive approach of drug delivery, which could deliver large-size drugs directly in CNS bypassing the BBB and minimizing potential systemic side effects (Ying 2007). HSP70 intranasal administration had already been used in a PD model induced by repeated bilateral microinjections of lactacystinin in SNpc. Intranasal HSP70 had reduced the loss of both DA neurons in SNpc and their terminals in the striatum. In addition, labeled HSP70 was found into cytoplasm of DA neurons in the SNpc of rats induced by PD model (Pastukhov *et al.* 2014). *Bobkova et al.* also demonstrated intracellular fluorescently-labeled HSP70 in the olfactory bulbs, neocortex, hippocampus, n.raphe dorsalis, locus coeruleus and cerebellum after intranasal administration (Bobkova *et al.* 2014). Therefore, exogenous HSP70 is capable to penetrate different regions of the brain and its neuronal cells when delivered by intranasal administration.

Differentiated adult neurons have insufficient amounts of intracellular inducible HSP70 form, making them more susceptible to toxic changes in the intra- and extracellular environment (Lyon & Milligan 2019). Accumulation of misfolded proteins and unregulated inflammation contribute to the pathogenesis of age-related neurodegenerative disorders. Beside its chaperone function, HSP70 is involved on modulation of inflammatory response (Dukay *et al.* 2019). DA neurons in SNpc are susceptible to neurotoxic effects of sustained inflammation. As resident innate

immune cells of CNS, microglial activation is the first step of inflammatory response (Perry & Teeling 2013; Gadani *et al.* 2015). Activated microglia assume an amoeboid morphology, whereas microglia in resting stage is characterized by a branched morphology (Nimmerjahn *et al.* 2005; Cho *et al.* 2006; Davalos *et al.* 2005). Uncontrolled activated microglia release proinflammatory mediators and reactive oxygen species, which contribute to a neurotoxic environment (Halliwell & Gutteridge 2016). SNpc has a higher content of microglia compared with other brain structures, whereas DA neurons has lower levels of antioxidants defenses, being more vulnerable to oxidative insults decurrent from microglial activation than most other types of neurons (Lawson *et al.* 1990; Kim *et al.* 2000; Sun *et al.* 2016; Loeffler *et al.* 1994). Reactive astrocytes also contribute to inflammatory response against CNS insults. Pronounced upregulation of GFAP and loss of individual astrocytes domains were characteristics of severe reactive astrogliosis (Sofroniew & Vinters 2010; Sofroniew 2015). In this study, we demonstrated 6-OHDA insult increasing activation of microglia and astrocytes reactivity in SNpc, with a predominance of amoeboid microglia and astrocyte scar formation. Animals treated with HSP70 presented less microglial amoeboid morphology and more preserved astrocytes individual domains. Moreover, intranasal HSP70 decreased Iba1 and GFAP content in these animals. Therefore, HSP70 treatment reduced glial activation induced by 6-OHDA.

The release of proinflammatory mediators can be amplified by synergic activation of astrocytes and microglia, enhancing neurotoxic effects to DA neurons (Wang *et al.* 2015). IL-1 $\beta$  sustained expression in SNpc leads to pronounced DA neuron loss (Leal *et al.* 2013). The induction of this cytokine could lead to loss of DA neurons, regardless of other inflammatory events. Previous work demonstrated that chronic induction of IL-1 $\beta$  expression in SNpc inducing progressive DA neuronal loss,

locomotor deficits and glial activation, similarly to other experimental models of PD (Ferrari et al. 2006). Here, we demonstrated that treatment with intranasal HSP70 decreased IL-1 $\beta$  mRNA expression in the SNpc.

On the other hand, HSP70 treatment did not reduce the increase of IL-6 mRNA expression induced by 6-OHDA. IL-6 is a common proinflammatory cytokine that is involved to degeneration and regeneration of neurons in the central and peripheral nervous system (Gruol & Nelson 1997; Gadiant & Otten 1997). However, the role of IL-6 in PD neuropathology is not well established. Some studies indicated inversed correlation between PD severity and increased IL-6 levels in the nigrostriatal region and in the CSF (Mogi et al. 1996; Nagatsu 2002; Blum-Degen et al. 1995; Müller et al. 1998). On the other hand, another study suggested increased IL-6 levels as a risk marker for mortality in PD (Dufek et al. 2015).

Other proinflammatory cytokine related to DA neuron loss is TNF- $\alpha$  (Yan *et al.* 2014). In our study no differences on TNF- $\alpha$  mRNA expression was found in SNpc. TNF- $\alpha$  is associated with increase of BBB permeability (Tsao *et al.* 2001; Didier *et al.* 2003), which might explain the absence of alterations in serum protein levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. Overall, our results indicate that HSP70 neuroprotective action might be related with its ability to modulate glial activation and reduce IL-1 $\beta$  mRNA expression in the SNpc.

## **5. Conclusion**

Intranasal administration of HSP70 shows neuroprotective actions in the rat model of 6-OHDA-induced DA denervation. The treatment with exogenous HSP70 reduced the loss of DA neurons and improved behavior impairments induced by 6-OHDA intrastriatal injection. Also, HSP70 has modulated neuroinflammatory response, which is an important feature of PD pathogenesis. Intranasal treatment

reduced microglial activation and astrogliosis, which might be leading to the reduction observed in IL-1 $\beta$  mRNA expression after HSP70 administration. Therefore, our results demonstrated a neuroprotective activity in the nigrostriatal axis using a noninvasive delivery approach to administrated HSP70. Finally, our findings indicate that HSP70 neuroprotective action in 6-OHDA model is related to modulation of inflammatory response.

## **6. Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest

## **7. Funding Sources**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) #443514/2014-3, #401260/2014-3 and #408435/2018-6, FAPERGS #16/2551-0000499-4 and #17/2551-0000984-3, Propesq-UFRGS and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **8. References**

- Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H. and Riederer, P. (1995) Interleukin-1 Beta and interleukin-6 Are Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's and De Novo Parkinson's Disease Patients. *Neuroscience letters* **202**.
- Bobkova, N. V., Evgen'ev, M., Garbuz, D. G. et al. (2015) Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 16006-16011.
- Bobkova, N. V., Garbuz, D. G., Nesterova, I. et al. (2014) Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **38**, 425-435.



- Calderwood , S. and Murshid, A. (2017) Molecular Chaperone Accumulation in Cancer and Decrease in Alzheimer's Disease: The Potential Roles of HSF1. *Frontiers in neuroscience* **11**.
- Campos, F. L., Carvalho, M. M., Cristovao, A. C., Je, G., Baltazar, G., Salgado, A. J., Kim, Y. S. and Sousa, N. (2013) Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci* **7**, 175.
- Cho, B., Song, D., Sugama, S., Shin, D., Shimizu, Y., Kim, S., Kim, Y. and Joh, T. (2006) Pathological Dynamics of Activated Microglia Following Medial Forebrain Bundle Transection. *Glia* **53**.
- Dauer, W. and Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D., Dustin, M. and Gan, W. (2005) ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in Vivo. *Nature neuroscience* **8**.
- Didier, N., Romero, I. A., Creminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J. and Mabondzo, A. (2003) Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* **86**, 246-254.
- Dufek, M., Rektorova, I., Thon, V., Lokaj, J. and Rektor, I. (2015) Interleukin-6 May Contribute to Mortality in Parkinson's Disease Patients: A 4-Year Prospective Study. *Parkinsons Dis* **2015**, 898192.
- Dukay, B., Csoboz, B. and Toth, M. E. (2019) Heat-Shock Proteins in Neuroinflammation. *Front Pharmacol* **10**, 920.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L. and McLean, P. J. (2011) Molecular chaperones in Parkinson's disease--present and future. *J Parkinsons Dis* **1**, 299-320.

- Gadani, S. P., Walsh, J. T., Lukens, J. R. and Kipnis, J. (2015) Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* **87**, 47-62.
- Gadient, R. and Otten, U. (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a Molecule With Both Beneficial and Destructive Potentials. *Progress in neurobiology* **52**.
- Gifondorwa, D. J., Robinson, M. B., Hayes, C. D., Taylor, A. R., Prevet, D. M., Oppenheim, R. W., Caress, J. and Milligan, C. E. (2007) Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **27**, 13173-13180.
- Goedert, M. (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **2**, 492-501.
- Gruol, D. and Nelson, T. (1997) Physiological and Pathological Roles of interleukin-6 in the Central Nervous System. *Molecular neurobiology* **15**.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2016) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hartl, F. U., Bracher, A. and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324-332.
- Kim, W., Mohney, R., Wilson, B., Jeohn, G., Liu, B. and Hong, J. (2000) Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**.
- Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T. and McLean, P. J. (2004) Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem* **279**, 25497-25502.

- Lawson, L., Perry, V., Dri, P. and Gordon, S. (1990) Heterogeneity in the Distribution and Morphology of Microglia in the Normal Adult Mouse Brain. *Neuroscience* **39**.
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M. and Pitossi, F. J. (2013) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha: reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? *Front Cell Neurosci* **7**, 53.
- Li, H., Yang, J., Wang, Y., Liu, Q., Cheng, J. and Wang, F. (2019) Neuroprotective effects of increasing levels of HSP70 against neuroinflammation in Parkinson's disease model by inhibition of NF-kappaB and STAT3. *Life Sci* **234**, 116747.
- Loeffler, D., DeMaggio, A., Juneau, P., Havaich, M. and LeWitt, P. (1994) Effects of Enhanced Striatal Dopamine Turnover in Vivo on Glutathione Oxidation. *Clinical neuropharmacology* **17**.
- Lyon, M. S. and Milligan, C. (2019) Extracellular heat shock proteins in neurodegenerative diseases: New perspectives. *Neurosci Lett* **711**, 134462.
- Magrané, J., Smith, R., Walsh, K. and Querfurth, H. (2004) Heat Shock Protein 70 Participates in the Neuroprotective Response to Intracellularly Expressed Beta-Amyloid in Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**.
- Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670-684.
- Metz, G. A. and Whishaw, I. Q. (2002) Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* **115**, 169-179.

- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. and Nagatsu, T. (1996) Interleukin (IL)-1 Beta, IL-2, IL-4, IL-6 and Transforming Growth Factor-Alpha Levels Are Elevated in Ventricular Cerebrospinal Fluid in Juvenile Parkinsonism and Parkinson's Disease. *Neuroscience letters* **211**
- Müller, T., Blum-Degen, D., Przuntek, H. and Kuhn, W. (1998) Interleukin-6 Levels in Cerebrospinal Fluid Inversely Correlate to Severity of Parkinson's Disease. *Acta neurologica Scandinavica* **98**.
- Murshid, A., Eguchi, T. and Calderwood, S. K. (2013) Stress Proteins in Aging and Life Span. *Int J Hyperthermia* **29**, 442-447.
- Nagatsu, T. (2002) Parkinson's Disease: Changes in Apoptosis-Related Factors Suggesting Possible Gene Therapy. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* **109**.
- Nagel, F., Falkenburger, B. H., Tonges, L., Kowsky, S., Poppelmeyer, C., Schulz, J. B., Bahr, M. and Dietz, G. P. (2008) Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* **105**, 853-864.
- National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, A. (2011) The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press (US)National Academy of Sciences., Washington (DC).
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (New York, N.Y.)* **308**.

- Pang, Y., Lin, S., Wright, C., Shen, J., Carter, K., Bhatt, A. and Fan, L. W. (2016) Intranasal insulin protects against substantia nigra dopaminergic neuronal loss and alleviates motor deficits induced by 6-OHDA in rats. *Neuroscience* **318**, 157-165.
- Pastukhov, Y. F., Plaksina, D. V., Lapshina, K. V., Guzhova, I. V. and Ekimova, I. V. (2014) Exogenous protein HSP70 blocks neurodegeneration in the rat model of the clinical stage of Parkinson's disease. *Dokl Biol Sci* **457**, 225-227.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Boston: Elsevier Academic Press Amsterdam
- Perry, V. and Teeling, J. (2013) Microglia and Macrophages of the Central Nervous System: The Contribution of Microglia Priming and Systemic Inflammation to Chronic Neurodegeneration. *Seminars in immunopathology* **35**.
- Radons, J. (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **21**, 379-404.
- Silva, T. P., Poli, A., Hara, D. B. and Takahashi, R. N. (2016) Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neurosci Lett* **622**, 83-87.
- Sofroniew, M. V. (2015) Astrogliosis. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol. 7.
- Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35.
- Sparkman, N. and Johnson, R. (2008) Neuroinflammation Associated With Aging Sensitizes the Brain to the Effects of Infection or Stress. *Neuroimmunomodulation* **15**.
- Sun, Y., Pham, A. and Waite, T. (2016) Elucidation of the Interplay Between Fe(II), Fe(III), and Dopamine With Relevance to Iron Solubilization and Reactive

Oxygen Species Generation by Catecholamines. *Journal of neurochemistry* **137**.

Tsao, N., Hsu, H. P., Wu, C. M., Liu, C. C. and Lei, H. Y. (2001) Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. *J Med Microbiol* **50**, 812-821.

Tunesi, M., Raimondi, I., Russo, T. et al. (2019) Hydrogel-based delivery of Tat-fused protein Hsp70 protects dopaminergic cells in vitro and in a mouse model of Parkinson's disease. *NPG Asia Materials* **11**, 1-15.

Ungerstedt, U. (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**, 69-93.

Wang, Q., Liu, Y. and Zhou, J. (2015) Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. In: *Transl Neurodegener*, Vol. 4.

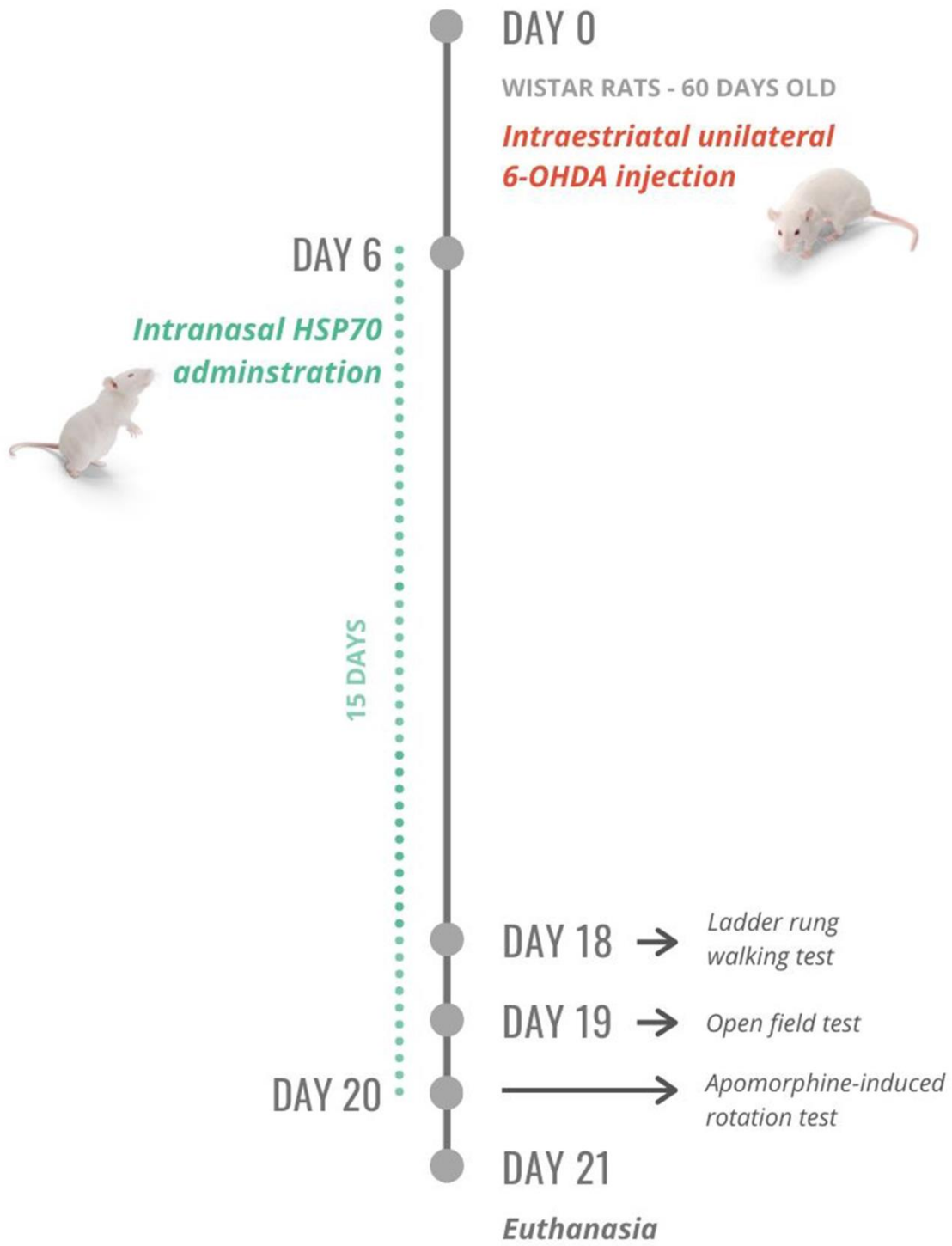
Yan, J., Fu, Q., Cheng, L., Zhai, M., Wu, W., Huang, L. and Du, G. (2014) Inflammatory response in Parkinson's disease (Review). *Mol Med Rep* **10**, 2223-2233.

Ying, W. (2007) The nose may help the brain: intranasal drug delivery for treating neurological diseases. *Future Neurology* **3**.

## 9. Tables and Figures

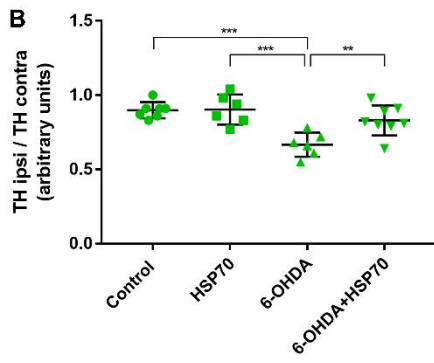
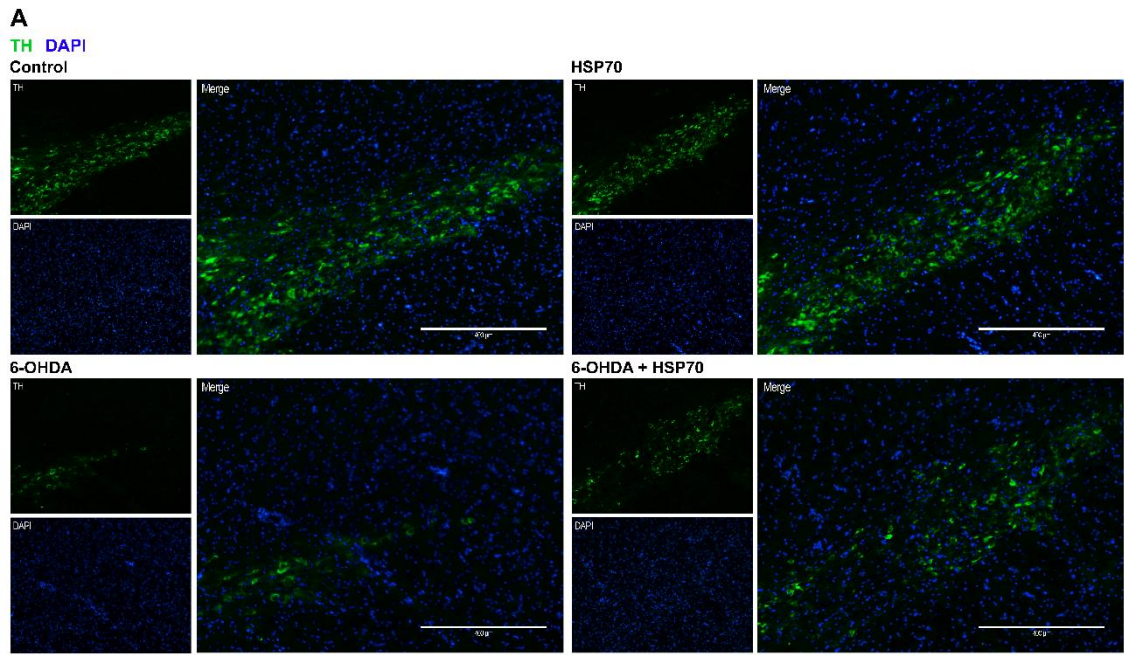
Gene	Primers
IL-1 $\beta$	5' - ACCTGTTCTTTGAGGCTGAC 5' - AATGAGTGACACTGCCTTCC
TNF- $\alpha$	5' - CAGACCCTCACACTCAGATCAT 5' - ACCACCAGTTGGTTGTCTTTG
IL-6	5' - GCGATGATGCACTGTCAGAAA 5' - TCCAGAAGACCAGAGCAGATT

**Table 1: Primer sequences for RT-qPCR.** Forward and reverse primers used for amplification of cDNAs of interest.

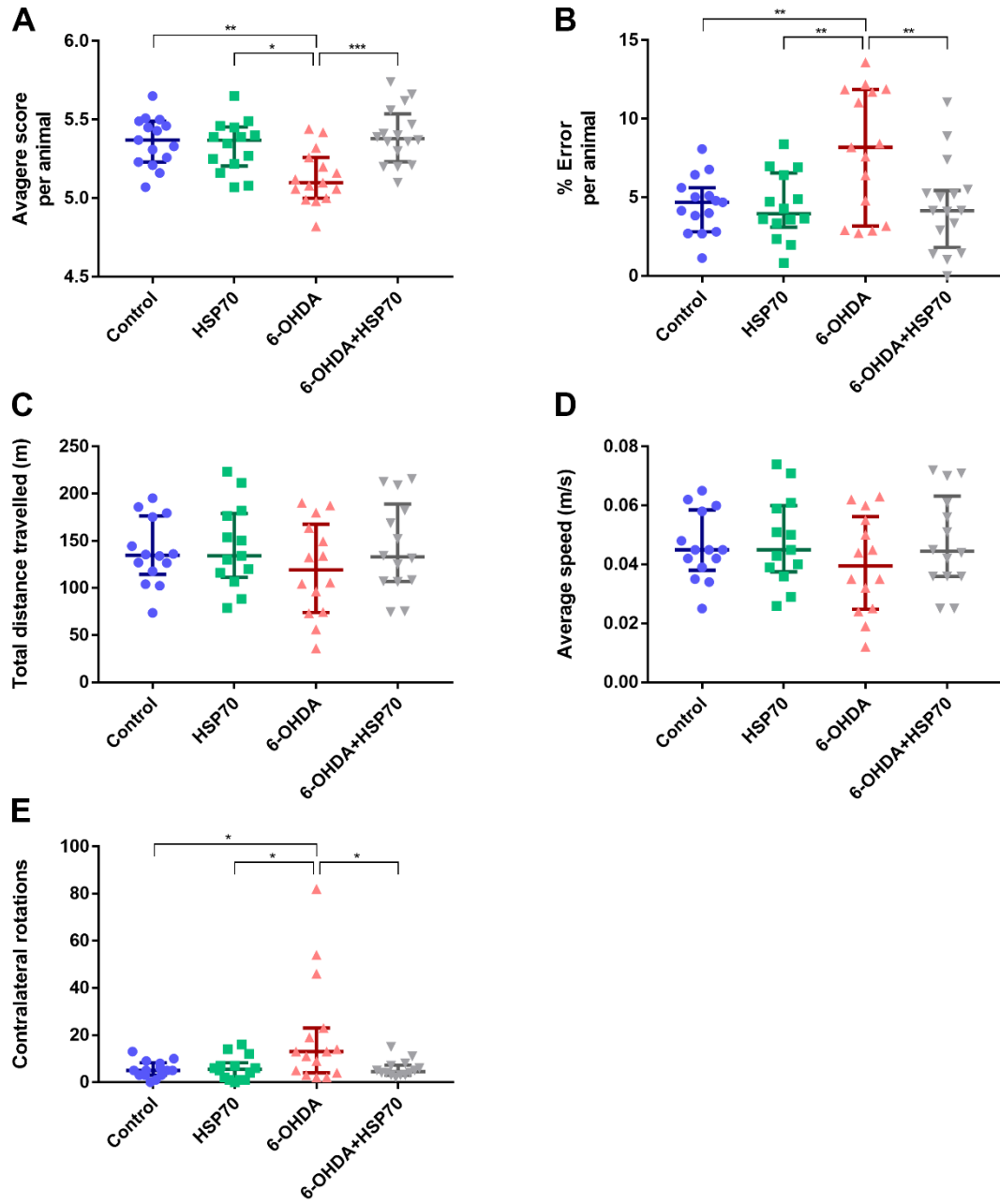




**Figure 1: Experimental design.** Wistar rats were distributed into four experimental groups (n = 16 per group): Control, HSP70, 6-OHDA and 6-OHDA+HSP70. On day 0, the animals had sixty days old. Each rat received an intrastriatal unilateral injection of 6-OHDA (20 µg/rat) or vehicle (saline with ascorbic acid). The animals were habituated with a saline intranasal administration for 5 days after the surgical procedure. Then, each rat received a daily intranasal dose of HSP70 (2 µg/rat) or saline for 15 days. Behavior tests – ladder rung walking test, open field test, apomorphine-induced rotation test – were performed on the last 3 days of treatment. On day 21, half of animals were euthanized by decapitation, serum was collected for ELISA and the brain was dissected to quantitative reverse transcription PCR (n = 8 per group). The remaining rats were perfused via the vascular system for immunofluorescence microscopy assessment (n = 8 per group).

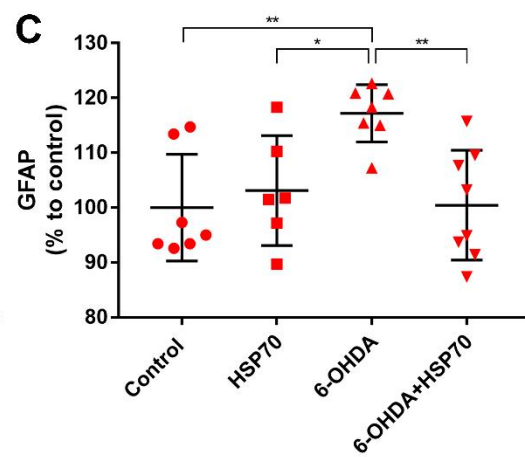
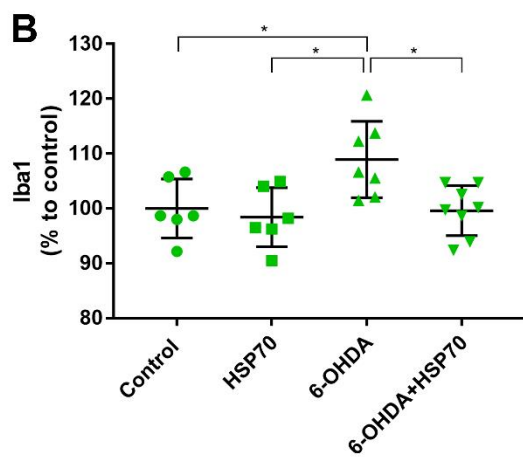
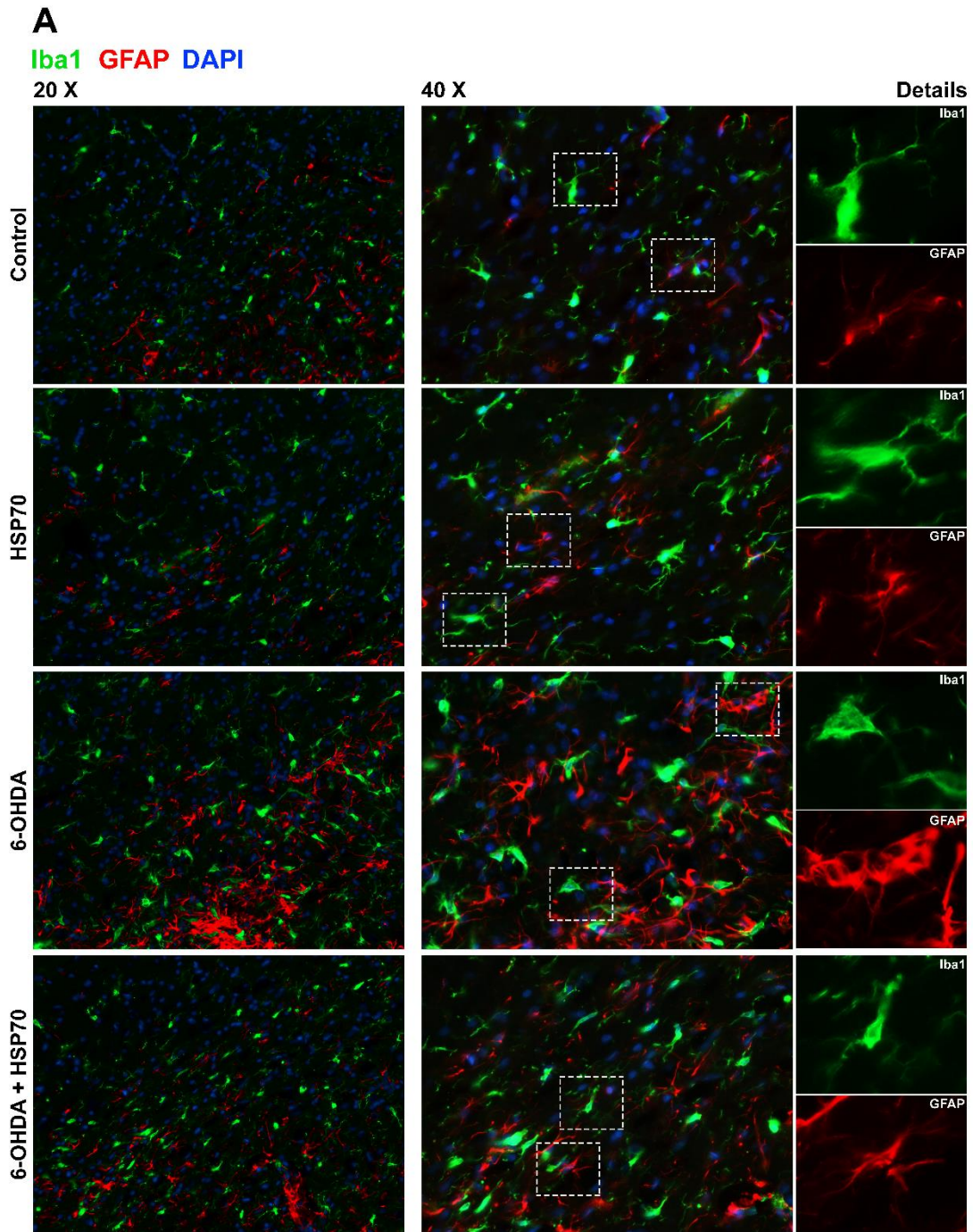


**Figure 2: HSP70 treatment reduces 6-OHDA-induced dopaminergic denervation in SNpc.** [A] Representative immunofluorescence images of SNpc co-immunostained for TH (green) and DAPI (blue). Images from ipsilateral sides of are Control, HSP70, 6-OHDA and 6-OHDA+HSP70 groups are shown. Guide bars represent 400  $\mu\text{m}$ . Images are representative of independent experiments from eight animal per group. [B] The quantification of TH content was obtained using the software ImageJ measuring the pixels of immunofluorescence images with 10X of magnification and results were expressed as the ratio of TH staining in ipsilateral side per contralateral side. Values represent mean  $\pm$  SD. One-way analysis of variance and Tukey's Multiple Comparison post-hoc test was applied to all data. The  $p$  values are represented as followed: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 3: HSP70 treatment improve behavior impairments induced by 6-OHDA.**

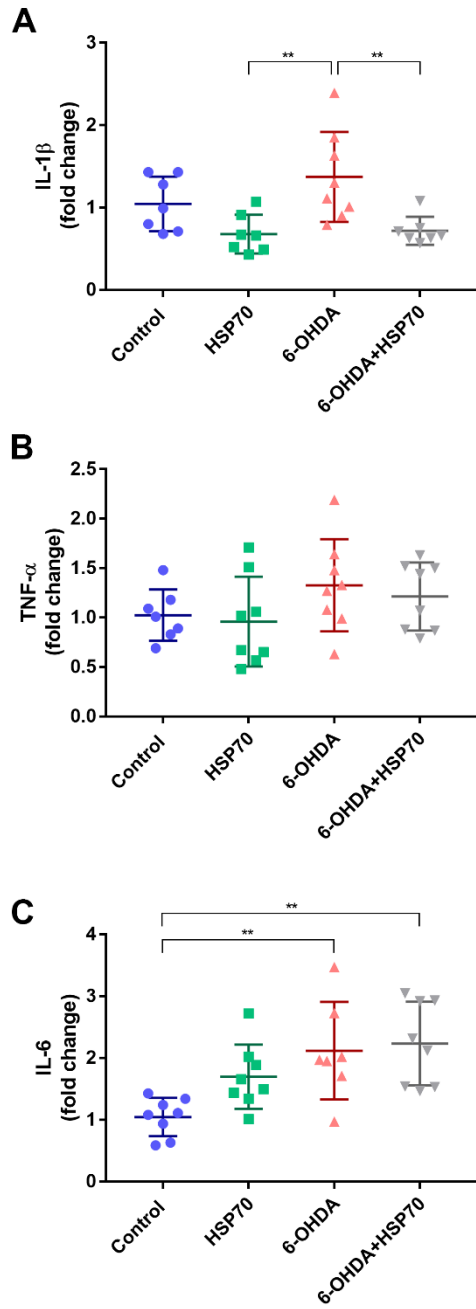
On day 18, the ladder rung walking test was performed. Qualitative evaluation was performed for each step using a foot fault scoring system, using a 7-category scale: (0) total miss, (1) deep slip, (2) slight slip, (3) replacement, (4) correction, (5) partial placement and (6) correct placement. [A] The average of scores per animal was measured. [B] The percentual of errors was also measured, counting scores of 0, 1 and 2 as errors. On day 19, the open field test was performed. [C] The total distance travelled (m) and [D] average speed (m/s) were determined in a five min session, using the video tracking system ANY-maze. On day 20, apomorphine-induced rotation test was performed and [E] 360-degree contralateral rotations were quantified in a 30 min session. Values represent median with interquartile range. One-way analysis of variance and Tukey's Multiple Comparison post-hoc test was applied to all data. The  $p$  values are represented as followed: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .



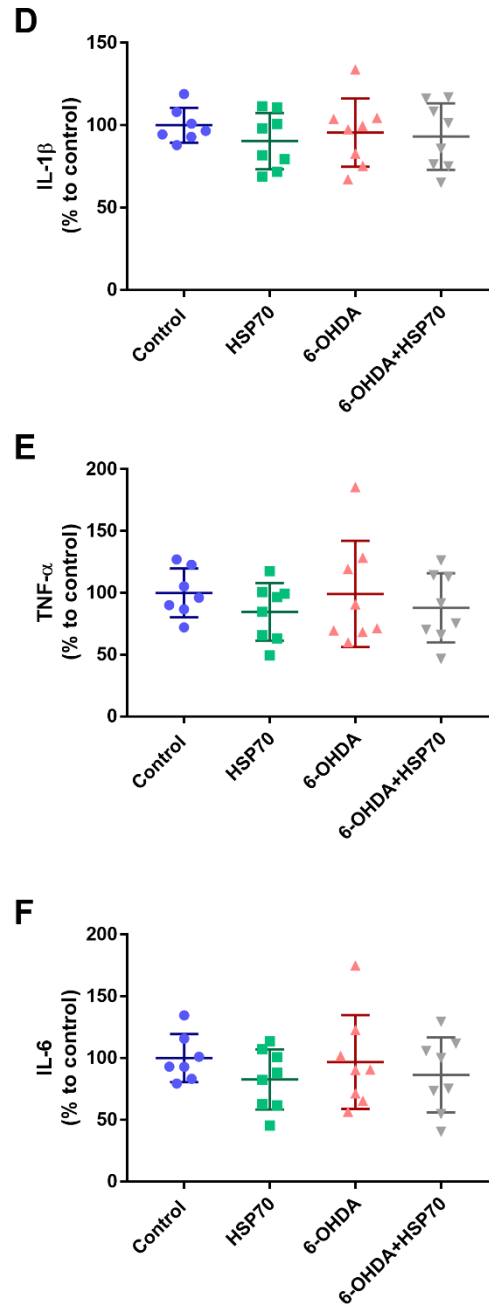
**Figure 4: HSP70 treatment reduces 6-OHDA-induced glial activation in SNpc.**

(A) Representative immunofluorescence images of SNpc co-immunostained for Iba1 (green), GFAP (red) and DAPI (blue). Images from ipsilateral sides of are Control, HSP70, 6-OHDA and 6-OHDA+HSP70 groups are shown. Merge images were obtained with 20X and 40X of magnification. Details of microglia and astrocytes morphology are shown in separated canals. Images are representative of independent experiments from eight animal per group. The quantification of Iba1 (B) and GFAP (C) content were obtained using the software ImageJ measuring the pixels from SNpc region of immunofluorescence images with 4X of magnification and results were expressed as percentual to control. Values represent mean  $\pm$  SD. One-way analysis of variance and Tukey's Multiple Comparison post-hoc test was applied to all data. The  $p$  values are represented as followed: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

## RT-qPCR



## ELISA





**Figure 5: HSP70 treatment modulates proinflammatory cytokines induced by 6-OHDA.** mRNA expression levels of [A] IL-1 $\beta$ , [B] TNF- $\alpha$  and [C] IL-6 in the SNpc were analyzed by RT-qPCR.  $\beta$ -actin was used as constitutive normalization gene and results were expressed in relation to  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and internal control group ( $\Delta\Delta$ Ct) using the formula  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Protein levels of [D] IL-1 $\beta$ , [E] TNF- $\alpha$  and [F] IL-6 in the serum were analyzed by ELISA. The results of protein levels were expressed in percentual to control. Values represent mean  $\pm$  SD. One-way analysis of variance and Tukey's Multiple Comparison post-hoc test was applied to all data. The  $p$  values are represented as followed: \*\*  $p < 0.01$ .

## **Capítulo II**

### Resultados adicionais

Neste capítulo são apresentados resultados adicionais aos incluídos no manuscrito, sendo utilizado o mesmo desenho experimental descrito no capítulo anterior.

## 1. Metodologia

O protocolo de experimentação animal adotado neste capítulo foi o mesmo do descrito no *Capítulo I – seção 2*, o qual foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob número de projeto #35627. Nesse capítulo serão abordados resultados adicionais de comportamento, imunofluorescência e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

O teste do campo aberto foi realizado como descrito no *Capítulo I – seção 2.5.2*. Com o auxílio do software ANY-maze (Stoelting Co.; IL, USA), foram analisados o tempo total imóvel, o tempo total móvel, o tempo total de *freezing*, e o tempo total na zona central, nas esquinas e nas laterais.

O preparo da amostra para a análise de imunofluorescência foi realizado conforme descrito no *Capítulo I – seção 2.6*. Fatias de 20 µm de espessura no plano coronal foram colocadas em lâminas gelatinizadas. As incubações das fatias foram todas realizadas em lâmina. As fatias foram então incubadas na lâmina por 1 h com solução de bloqueio – 3% albumina de soro bovino. As lâminas foram lavadas cuidadosamente com PBST e então foram incubadas por 48 h a 4° C com anticorpo primário: anti-HSP70 (1:50, sc1060 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.; TX, USA). Depois de mais uma etapa de lavagem, as lâminas foram incubadas por 2 h com o anticorpo secundário: anti-goat Alexa 555 (1:500 – código; Invitrogen; CA, USA). Mais uma etapa de lavagem foi realizada e então as lâminas foram incubadas por 5 min com DAPI (1:1000; D9542 - Sigma-Aldrich®; MO, USA). A última etapa de lavagem foi realizada e as lâminas foram cobertas por lamínulas. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio EVOS FL Auto Imaging System (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific; MA, USA). A quantificação foi obtida usando o software

ImageJ, mensurando os pixels de imagens de fatias com 20 µm com 10x de aumento. O resultado foi expresso em percentual do controle.

Citocinas pró-inflamatórias - interleucina -1beta (IL-1β), fator de necrose tumoral -alpha (TNF-α) e interleucina-6 (IL-6) - foram analisadas no CSF por ELISA. No dia da eutanásia, o CSF foi coletado da *cisterna magna* dos animais anestesiados com o auxílio de uma seringa. A análise por ELISA foi realizada conforme descrito no *Capítulo 1 – seção 2.8*.

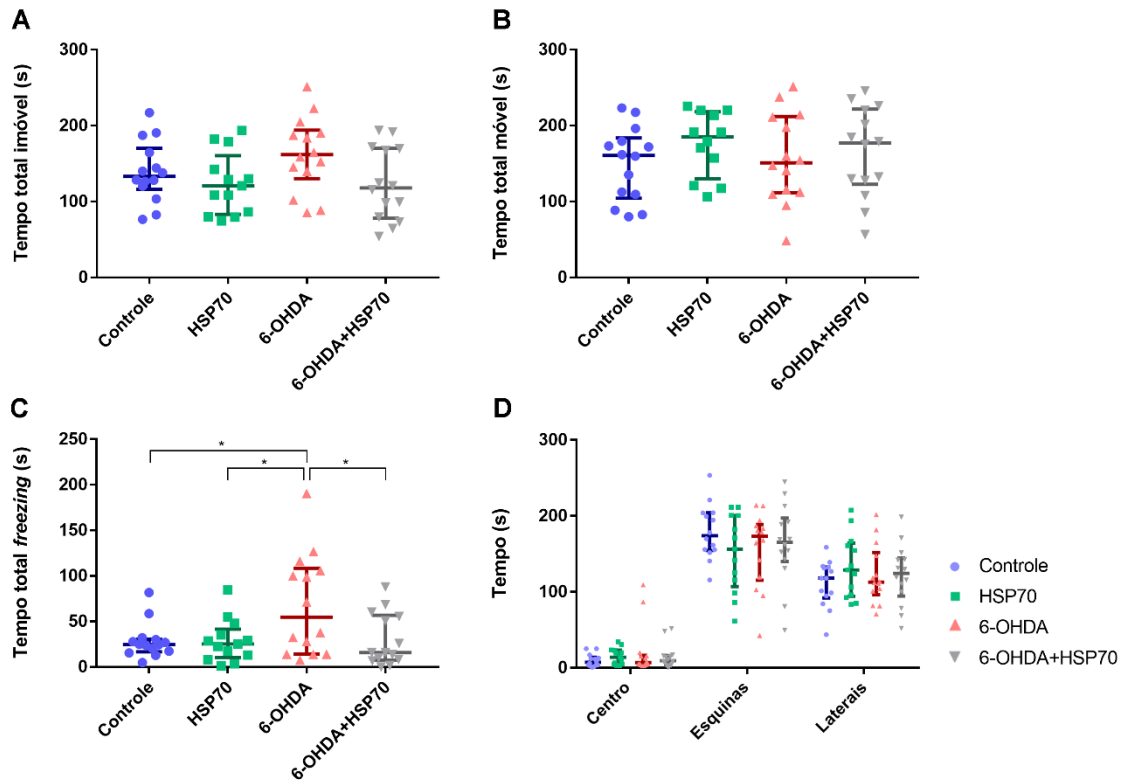
## **2. Resultados**

No teste do campo aberto, animais do grupo 6-OHDA obtiveram maior tempo total *freezing*, em relação aos animais de todos os outros grupos (Fig. 1C). Em relação ao tempo imóvel (Fig. 1A), ao tempo móvel (Fig. 1B) e ao tempo total na zona central, nas esquinas e nas laterais nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Fig. 1D).

O conteúdo de HSP70 na SNpc foi avaliado por imunofluorescência. Nossos resultados demonstram que o tratamento com HSP70 recombinante aumenta o conteúdo de HSP70 na SNpc em animais que receberam o insulto com 6-OHDA (Fig. 2). Este aumento é significativo em relação a todos os outros grupos (Fig. 2B).

O conteúdo das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α e IL-6 no CSF foi analisado por ELISA. Todavia, as leituras obtidas para todos os grupos e para as três diferentes citocinas foram muito baixas, podendo levar a erro de interpretação (Tabela 1). Desta forma, a análise deve ser repetida com maior concentração de amostra, a fim de obter um resultado confiável.

### 3. Figuras e Tabela

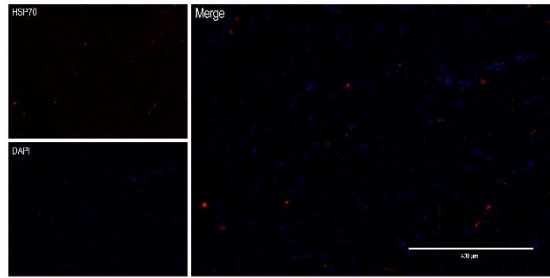


**Figura 1: O tratamento com HSP70 melhora as deficiências comportamentais induzidas por 6-OHDA.** No dia 19, foi realizado o teste de campo aberto. [A] O tempo total imóvel (s), [B] o tempo total móvel (s), [C] o tempo total *freezing* e [D] o tempo total na zona central, nas laterais e nas esquinas foram determinadas em uma sessão de cinco minutos, utilizando o software ANY-maze. Análise de variância unidirecional ou bidirecional, seguido por teste post-hoc de comparação múltipla de Tukey foram aplicados a todos os dados. Os valores de  $p$  são representados da seguinte forma: \*  $p < 0,05$ .

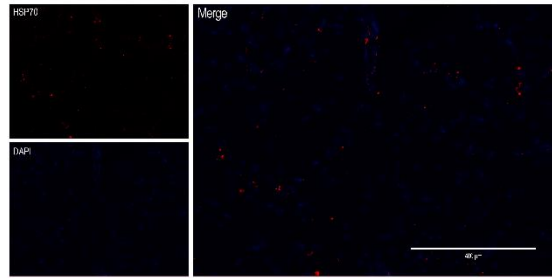
**A**

**HSP70 DAPI**

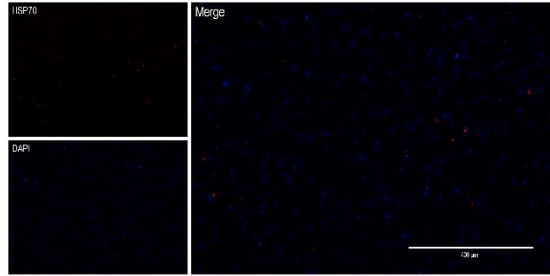
**Controle**



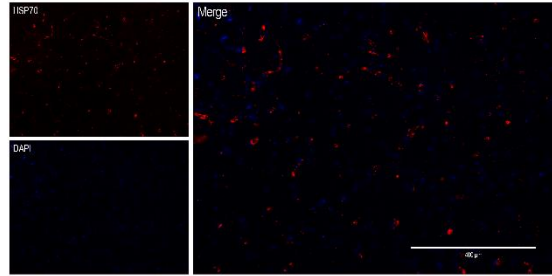
**HSP70**



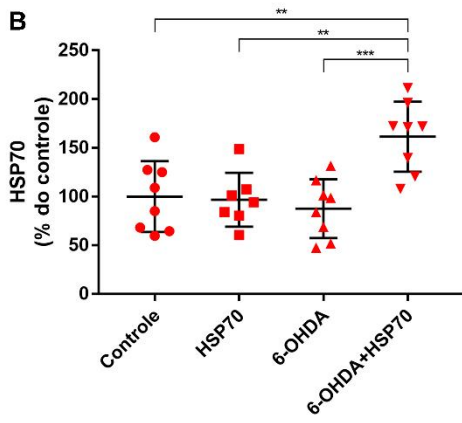
**6-OHDA**



**6-OHDA + HSP70**



**B**



**Figura 2: O tratamento com HSP70 exógena aumenta conteúdo proteico de HSP70 na SNpc em ratos induzidos por 6-OHDA.** (A) Imagens representativas de imunofluorescência para HSP70 (vermelho) e DAPI (azul) na região da SNpc. São exibidas imagens dos lados ipsilaterais dos grupos Controle, HSP70, 6-OHDA e 6-OHDA+HSP70. As barras-guia representam 400  $\mu\text{m}$ . As imagens são representativas de experimentos independentes de oito animais por grupo. (B) A quantificação do conteúdo de HSP70 foi obtida utilizando o software ImageJ medindo os pixels das imagens de imunofluorescência com 10X de ampliação e os resultados foram expressos em percentual do controle. Os valores representam média  $\pm$  DP. A análise unidirecional de variância e o teste post-hoc de comparação múltipla de Tukey foram aplicados a todos os dados. Os valores de  $p$  são representados da seguinte forma: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

	<b>Controle</b>	<b>HSP70</b>	<b>6-OHDA</b>	<b>6-OHDA+HSP70</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	-0,0095	-0,0248	0,0500	-0,0188
	-0,0318	0,0297	0,0210	-0,0201
	0,0629	0,0296	0,1175	-0,0231
	0,1100	-0,0213	0,0280	-0,0274
	-0,0259	-0,0144	0,0533	-0,0043
	-0,0266	-0,0101	-0,0164	0,3101
	-0,0328	0,0450	-0,0027	-0,0235
	0,0588	-0,0104	-0,0323	-0,0082
	-0,0343	0,0496	0,0034	-0,0010
	-0,0060	-0,0193	-0,0253	-0,0095
	-0,0306		-0,0389	-0,0091
	-0,0286		-0,0272	-0,0214
	-0,0216			-0,0313
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0,0547	0,0149	0,0663	0,0302
	0,0161	0,0528	0,0758	0,0218
	0,1031	0,0786	0,1002	0,0203
	0,1250	0,0230	0,1471	0,0103
	0,0274	0,0322	0,1297	0,0198
	0,0106	0,0637	0,0355	0,1746
	0,0096	0,0526	0,0242	0,0184
	0,0718	0,0473	0,0017	0,0324
	-0,0015	0,0666	0,0487	0,0252
	0,0388	0,0136	0,0078	0,053
	0,0019		0,0044	0,0653
	0,0102		0,0131	0,0061
	0,0215			0,0005
<b>IL-6</b>	0,0149	-0,0484	0,0072	-0,0384
	-0,0374	-0,0032	0,0184	-0,0380
	0,0573	0,0044	0,0343	-0,0337
	0,0803	-0,0376	0,1292	-0,0483
	-0,0247	-0,0141	0,0731	-0,0332
	-0,0480	0,0041	-0,0223	0,0902
	-0,0449	-0,0006	-0,0269	-0,0522
	0,0170	0,0056	-0,0518	-0,0480
	-0,0535	0,0052	0,0100	-0,0219
	-0,0124	-0,0470	-0,0579	-0,0051
	-0,0521		-0,0601	-0,0028
	-0,0432		-0,0501	-0,0421
	-0,0212			-0,0614

**Tabela 1: Citocinas pró-inflamatórias no CSF.** Os níveis proteicos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no CSF foram analisados por ELISA. Nesta tabela são apresentadas as absorbâncias obtidas na análise de ELISA, subtraída a absorbância do branco.



## **Parte III**

## Discussão

A PD é caracterizada por sintomas motores, os quais são decorrentes da morte progressiva de neurônios DA na SNpc, levando à depleção de dopamina no estriado (Dauer & Przedborski 2003). Administração 6-OHDA é amplamente utilizada como modelo animal da PD, uma vez que leva a denervação DA do sistema nigroestriatal. A injeção de 6-OHDA no estriado leva a degeneração retrógrada dos neurônios DA da SNpc, a qual ocorre progressivamente nas primeiras semanas após o insulto. Diferente de quando a 6-OHDA é injetada diretamente na SNpc, onde o insulto tóxico leva a uma perda instantânea e estática dos neurônios DA, em vez de gradualmente progressiva (Lee *et al.* 1996). Neste estudo nós utilizamos uma injeção inestraestriatal unilateral de 6-OHDA, a fim de melhor mimetizar o processo neurodegenerativo envolvido na PD. Quando a injeção com 6-OHDA é administrada unilateralmente, o dano causado por ela afeta exclusivamente o lado que recebeu a injeção (lado ipsilateral), levando a destruição de terminais catecolaminérgicos, sem interferir na célula pós-sináptica e em seus respectivos receptores DA. Desta forma, após a denervação há uma hipersensibilidade dos receptores DA da célula pós-sináptica no lado ipsilateral. Por conta desta hipersensibilidade, rotações contralaterais são induzidas quando os animais expostos à 6-OHDA são estimulados por agonistas de dopamina, como a apomorfina (Ungerstedt 1971). Neste estudo nós demonstramos o efeito neuroprotetor da HSP70 contra a denervação dopaminérgica induzida por 6-OHDA, uma vez que o tratamento intranasal reduziu a perda de neurônios positivos para tirosina hidroxilase (TH+) e reduziu o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina.

O teste do campo aberto foi realizado afim de analisar parâmetros relacionados ao comportamento ansioso e a atividade locomotora geral nos animais (Prut & Belzung 2003; Bové & Perier 2012). Isto porque depressão e ansiedade são sintomas comuns na PD (Fontoura *et al.* 2017), além dos sintomas motores característicos da doença. É esperado que os animais prefiram as periferias do aparato do que a zona central, sendo o aumento do tempo na zona central um indicativo de comportamento ansioso (Prut & Belzung 2003). Nossos dados apontaram que os animais preferiram as zonas laterais e as esquinas em relação a zona central, não havendo diferenças entre os grupos no tempo de permanência em cada zona. O tempo total de *freezing* no teste do campo aberto também foi analisado, uma vez que pode estar relacionado a um perfil ansioso do animal frente ao estresse do teste, indicando medo e sensação de risco predatório (Roelofs 2017; Blanchard & Blanchard 1988). Foi observado um aumento no tempo total de *freezing* em animais induzidos por 6-OHDA, o qual foi revertido pelo tratamento com HSP70. Ainda no teste do campo aberto, nenhuma alteração entre os grupos foi observada em relação a distância total percorrida, a velocidade média, ao tempo de mobilidade e ao tempo de imobilidade. Apesar desta ausência de alterações na atividade locomotora geral no teste do campo aberto, o tratamento com HSP70 melhorou a performance motora dos animais no teste de caminhada na escada horizontal (*ladder rung walking test*). A tarefa proposta nesse teste permite a discriminação entre distúrbios sutis da função motora, combinando a análise qualitativa e quantitativa da travessia na escada horizontal (Metz & Whishaw 2002). De forma que animais tratados com HSP70 demonstraram maior qualidade de passos e menor percentual de erros em comparação aos animais do grupo 6-OHDA, indicando melhor performance motora.

O efeito neuroprotetor da HSP70, a qual foi administrada por meio de uma cânula intraestriatal para administrar compostos carregados com Tat-HSP70, já foi demonstrado no modelo de 6-OHDA (Tunesi *et al.* 2019). Em outro trabalho, a administração de Tat-HSP70 foi também utilizada em modelo de MPTP, sendo dessa vez administrada por via intraperitoneal. Os autores utilizaram a HSP70 fusionada a Tat, um dos peptídeos de penetração celular mais comumente utilizados, para facilitar a translocação da HSP70 recombinante através de membranas celulares e da BBB (Nagel *et al.* 2008). A HSP70 é muito grande para cruzar livremente a BBB, além disso ela tem meia-vida curta. Após administração intraperitoneal, não é possível detectar HSP70 no CNS (Lyon & Milligan 2019). E por via intravenosa, é demonstrado que a HSP70 exógena é eliminada do sangue em até 1 hora após sua administração (Evgen'ev *et al.* 2018). Dessa forma, para explorar o potencial terapêutico da HSP70 em distúrbios do CNS, parece ser interessante utilizar uma abordagem eficiente de administração que consiga acessar diretamente o CNS.

A administração intranasal, a qual foi utilizada neste trabalho, é uma abordagem não invasiva para entrega de medicamentos. Essa via de administração pode entregar drogas de tamanho grande diretamente no CNS, não passando pela BBB e minimizando potenciais efeitos colaterais sistêmicos (Ying 2007). A administração intranasal de HSP70 já foi utilizada em modelo de PD induzido por repetidas microinjeções bilaterais de lactacistina na SNpc. É demonstrado que a HSP70 intranasal reduziu a perda de neurônios DA na SNpc e de seus terminais no estriado. Além disso, HSP70 marcada foi encontrada no citoplasma de neurônios dopaminérgicos dos ratos induzidos pelo modelo de PD, três horas após a administração intranasal (Pastukhov *et al.* 2014). Outro trabalho, também

demonstrou localização intracelular da HSP70 marcada com fluorescência, após administração intranasal, no bulbo olfatório, no neocortex, no hipocampo, no núcleo dorsal da rafe, no *locus coeruleus* e no cerebelo (Bobkova *et al.* 2014). Portanto, HSP70 exógena é capaz de penetrar diferentes regiões cerebrais, bem como suas células neuronais, quando administrada por via intranasal.

Neurônios adultos diferenciados têm quantidades insuficientes da forma induzível de HSP70 intracelular, tornando-os mais suscetíveis a alterações tóxicas no ambiente intra e extracelular (Lyon & Milligan 2019). O acúmulo de proteínas mal dobradas e a inflamação não regulada contribuem para a patogênese de distúrbios neurodegenerativos relacionados ao envelhecimento. Além de sua função como chaperona, a HSP70 está envolvida na modulação da resposta inflamatória (Dukay *et al.* 2019). Os neurônios DA da SNpc são suscetíveis a efeitos neurotóxicos da inflamação sustentada, sendo a neuroinflamação um dos principais fatores contribuintes para a patogênese da PD (Wang *et al.* 2015).

A ativação microglial é o primeiro passo da resposta inflamatória, uma vez que estas são as células imunes inatas residentes no CNS (Perry & Teeling 2013; Gadani *et al.* 2015). Micróglia quando ativada assume morfologia ameboide, enquanto micróglia em repouso é caracterizada por morfologia ramificada (Nimmerjahn *et al.* 2005; Cho *et al.* 2006; Davalos *et al.* 2005). Ativação microglial descontrolada leva a liberação de mediadores pró-inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, os quais contribuem para um ambiente neurotóxico (Halliwell & Gutteridge 2016). A SNpc tem um conteúdo aumentado de micróglia em comparação com outras estruturas cerebrais, além disso os neurônios DA têm defesas antioxidantes reduzidas, sendo vulneráveis aos insultos oxidativos da ativação microglial (Lawson *et al.* 1990; Kim *et al.* 2000; Sun *et al.* 2016; Loeffler *et*

al. 1994). Neste trabalho, demonstramos que o insulto com 6-OHDA aumenta a ativação da micróglia na SNpc, com predomínio de morfologia microglial ameboide. Os animais tratados com HSP70 apresentaram uma redução dessa ativação microglial, com menos micróglia de morfologia ameboide e menor marcação para molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1 (Iba1).

Astrócitos reativos também contribuem para a resposta inflamatória contra os insultos no CNS. A reatividade astrocitária pode ser dividida em três categorias: (i) astrogliose reativa leve a moderada; (ii) astrogliose reativa severa difusa; (iii) astrogliose reativa severa com formação de cicatriz glial compacta. A categoria 1 é caracterizada por leve aumento na expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), hipertrofia do corpo celular, preservação dos domínios individuais dos astrócitos, pouca ou nenhuma proliferação celular. A categoria 2 é caracterizada por pronunciado aumento na expressão de GFAP, hipertrofia do corpo celular, alguma perda dos domínios individuais, proliferação celular dispersa. Já na categoria 3, há formação de cicatriz glial compacta. Esta, é formada quase inteiramente por novos astrócitos advindos da proliferação celular. Estes astrócitos, que estão extensivamente sobrepostos e interlaçados, formam bordas compactas que cercam e demarcam o tecido danificado (Sofroniew & Vinters 2010; Sofroniew 2015). No nosso trabalho foi possível observar uma astrogliose reativa severa após o insulto com 6-OHDA. Essa reatividade astrocitária foi marcada pelo aumento do conteúdo de GFAP e diminuição dos domínios individuais dos astrócitos, com formações difusas e formações de cicatrizes gliais compactas. Os animais tratados com HSP70 apresentaram maior preservação dos domínios individuais dos astrócitos, além de conteúdo diminuído de GFAP. Portanto, nossos resultados indicam que o

tratamento com HSP70 reduziu a reatividade astrocitária, bem como a ativação microglial induzida por 6-OHDA.

A liberação de mediadores pró-inflamatórios pode ser amplificada pela ativação sinérgica de astrócitos e microglia, aumentando os efeitos neurotóxicos para os neurônios DA (Wang *et al.* 2015). A expressão sustentada de IL-1 $\beta$  na SNpc leva à perda pronunciada de neurônios DA (Leal *et al.* 2013). A indução desta citocina pode levar a morte de neurônios DA independentemente de outros eventos inflamatórios. Um trabalho prévio demonstra que a indução crônica da expressão de IL-1 $\beta$  na SNpc induz a progressiva morte neuronal, a déficits locomotores e também a ativação glial, de maneira similar a outros modelos experimentais da PD (Ferrari *et al.* 2006). Aqui, demonstramos que o tratamento com HSP70 intranasal diminui a expressão do mRNA de IL-1 $\beta$  na SNpc.

Por outro lado, o tratamento com HSP70 não protegeu contra o aumento na expressão do mRNA da IL-6 induzido por 6-OHDA. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, envolvida na degeneração e regeneração de neurônios no sistema nervoso central e periférico (Gruol & Nelson 1997; Gadiant & Otten 1997). Alguns estudos apontam que a concentrações aumentadas de IL-6 na região nigroestriatal e no CSF estariam inversamente correlacionadas com a severidade da PD (Mogi *et al.* 1996; Nagatsu 2002; Blum-Degen *et al.* 1995; Müller *et al.* 1998). Todavia, outro estudo sugere níveis de IL-6 aumentados como marcador de risco para mortalidade na PD (Dufek *et al.* 2015). Dessa forma, o papel da IL-6 na neuropatologia da PD não está bem estabelecido.

TNF- $\alpha$  é outra citocina pró-inflamatória, a qual está relacionada à neuropatologia da PD (Yan *et al.* 2014). Em trabalho anterior, foi demonstrado que nocaute para TNF- $\alpha$  suprime ativação microglial sem reduzir a perda de neurônios

DA induzida por MPTP (Zhao *et al.* 2007). Desta forma, TNF- $\alpha$  parece não estar diretamente envolvida com a perda neuronal DA, mas estar atuando na modulação inflamatória relacionada a doença. Além disto, utilizando nocaute para TNF- $\alpha$  também há uma redução da disfunção da BBB em modelo de MPTP (Zhao *et al.* 2007). Outros estudos também associam TNF- $\alpha$  ao aumento da permeabilidade da BBB (Tsao *et al.* 2001; Didier *et al.* 2003). Sendo essa citocina importante para o processo de neuroinflamação, o qual muitas vezes ocorre antes de uma disfunção da BBB, como é o caso observado no modelo da 6-OHDA (Carvey *et al.* 2005). Todavia, em nosso estudo, não foram encontradas diferenças na expressão do mRNA do TNF- $\alpha$  na SNpc. E também, não foram detectadas alterações nos níveis proteicos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no soro.

Elevados níveis IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no CSF de pacientes com PD são bem documentados (Mogi *et al.* 1996; Nagatsu & Sawada 2005). Por conta disso, neste trabalho também avaliamos o conteúdo destas citocinas pró-inflamatórias no CSF dos animais. Todavia, utilizando a técnica de ELISA, obtivemos níveis não detectáveis ou muito baixos para as três citocinas no CSF. De forma que pretendemos repetir estas análises, utilizando maior concentração de amostra, afim de obter resultados confiáveis.

Em uma análise geral, nossos resultados indicam que a ação neuroprotetora da HSP70 pode estar relacionada à sua capacidade de modular a ativação glial e reduzir a expressão do mRNA da IL-1 $\beta$  na SNpc. Além disso, neste trabalho demonstramos um aumento do conteúdo de HSP70 na SNpc, em animais que receberam o insulto com 6-OHDA e foram tratados com HSP70 exógena. Esse aumento de HSP70 ocorre por todo o tecido, não sendo específico de meio intra- ou extracelular. A liberação de HSPs para o meio extracelular é exacerbada em



condições de estresse celular (Dukay *et al.* 2019). Isto pode estar refletindo no aumento do conteúdo de HSP70 que observamos, o qual não ocorre quando os animais apenas recebem o tratamento intranasal sem o insulto tóxico da 6-OHDA. Ademais, não há alteração nos níveis de HSP70 quando os animais não recebem tratamento após o insulto tóxico. No cérebro, os astrócitos regulam positivamente a expressão de HSP70 intracelular e liberam HSP70 pra meio extracelular em resposta ao estresse. Esta liberação de HSP70 extracelular pode servir como suporte para os neurônios, os quais tem quantidades insuficientes da forma induzível da HSP70 (Lyon & Milligan 2019). HSPs extracelulares atuam na modulação da resposta inflamatória, bem como na expressão de citocinas (Dukay *et al.* 2019). Desta forma, nossos resultados sugerem que, após situações de estresse, o tratamento com HSP70 recombinante induz a um aumento do conteúdo proteico de HSP70, nos meios intra e extracelular. Este aumento do conteúdo de HSP70 na SNpc estaria envolvido na proteção dos neurônios DA contra o insulto da 6-OHDA, possivelmente por meio de uma modulação da resposta inflamatória. Os efeitos observados para o tratamento com HSP70, após denervação dopaminérgica induzida por 6-OHDA, encontram-se resumidos na Figura 3 (pág. 65).

## EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE HSP70 NA DENERVAÇÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA

<b>GRUPO</b> <b>6-OHDA</b> <i>animais receberam injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA</i>	<b>GRUPO</b> <b>6-OHDA + HSP70</b> <i>animais receberam tratamento intranasal com HSP70 recombinante, após injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA</i>
↓ neurônios dopaminérgicos	neurônios dopaminérgicos ↑
↑ rotações induzidas por apomorfina	rotações induzidas por apomorfina ↓
↑ tempo de <i>freezing</i>	tempo de <i>freezing</i> ↓
↓ performance motora	performance motora ↑
↑ ativação microglial	ativação microglial ↓
↑ reatividade astrocitária	reatividade astrocitária ↓
↑ expressão do mRNA de IL-1β	expressão do mRNA de IL-1β ↓
= expressão do mRNA de IL-6	expressão do mRNA de IL-6 =
↓ conteúdo proteico de HSP70	conteúdo proteico de HSP70 ↑

*Resultados que indicam efeito neuroprotetor da HSP70 intranasal contra o insulto da 6-OHDA, que possivelmente está envolvido com modulação da resposta inflamatória e aumento do conteúdo de HSP70 na substância negra de ratos Wistar.*

**Figura 3: Efeitos da administração intranasal de HSP70 na denervação dopaminérgica induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).** Nesta figura é apresentada uma comparação dos resultados obtidos para os animais tratados ou não com HSP70, após o insulto com 6-OHDA. Nossos resultados indicam efeito neuroprotetor da HSP70 intranasal contra a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA, o qual possivelmente está envolvido com modulação da resposta inflamatória e aumento do conteúdo de HSP70. Isso porque, o tratamento com HSP70 aumentou o número de neurônios dopaminérgicos na substância negra, bem como reduziu o número de rotações induzidas por apomorfina. Este tratamento também reduziu o tempo de *freezing* e melhorou a performance motora dos animais. HSP70 modulou a resposta neuroinflamatória, reduzindo ativação microglial, e reatividade astrocitária na substância negra. Em relação a expressão do mRNA de mediadores pró-inflamatórios nesta região, o tratamento com HSP70 reduziu a expressão de IL-1 $\beta$  e não foi capaz de reduzir a expressão aumentada de IL-6. Além disso, o conteúdo proteico de HSP70 na substância negra também foi aumentado pelo tratamento com HSP70 recombinante. Nesta figura, não constam resultados onde nenhuma diferença estatística foi observada entre os quatro grupos experimentais (Controle, HSP70, 6-OHA e 6-OHDA+HSP70).

## **Conclusão**

A administração intranasal de HSP70 demonstra ter ações neuroprotetoras contra denervação DA induzida por 6-OHDA. O tratamento com HSP70 exógena reduziu a perda de neurônios DA e melhorou o comprometimento do comportamento induzidos pela injeção intraestriatal de 6-OHDA. Além disso, a HSP70 modulou a resposta neuroinflamatória, que é uma característica importante da patogênese da PD. Especificamente, o tratamento intranasal reduziu a ativação microglial e a astrogliose, o que pode estar levando à redução observada na expressão do mRNA da IL-1 $\beta$  na SNpc, após a administração do HSP70. Além disso o tratamento com HSP70 exógena aumentou o conteúdo de HSP70 na SNpc de ratos induzidos por 6-OHDA. Portanto, nossos resultados demonstraram atividade neuroprotetora da HSP70 no eixo nigrostriatal, utilizando uma abordagem de administração não invasiva. Por fim, nossos resultados indicam que a ação neuroprotetora da HSP70 no modelo 6-OHDA está relacionada a uma modulação da resposta inflamatória que possivelmente é resultante do aumento de HSP70 na SNpc destes animais.

## Perspectivas

Uma vez que nossos resultados demonstraram um aumento do conteúdo proteico de HSP70 na SNpc em animais do grupo 6-OHDA-HSP70, surge o questionamento se o tratamento com HSP70 exógena estaria aumentando a expressão do mRNA de genes da HSP70 em condições de estresse. Para isto pretendemos realizar a análise de RT-qPCR para os principais genes envolvidos na expressão de HSP70: HSPA1 e HSPA2. Além disso, pretendemos avaliar os níveis de HSP70 em outras estruturas cerebrais, como bulbo olfatório, córtex, hipocampo e estriado. A HSP70 extracelular pode induzir a expressão de vias pró- e anti-inflamatórias (Dukay *et al.* 2019). Temos como perspectiva analisar a expressão de genes característicos dos perfis de micróglia (M1 e M2) e astrócitos (A1 e A2) induzidos por nosso tratamento, uma vez células gliais ativadas pode ser exercer efeito prejudicial (tipo 1) ou protetor (tipo 2) (Liddelow *et al.* 2017). Além disso pretendemos ampliar o painel de citocinas analisado, avaliando também os efeitos do tratamento com HSP70 em citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4. Em relação as amostras de CSF, repetiremos as análises utilizando uma maior concentração de amostra, afim de obter resultados confiáveis. Finalmente, nós avaliaremos a expressão de receptores envolvidos em vias inflamatórias e que conhecidamente interagem com HSP70, como TLR2, TLR4 (Lyon & Milligan 2019) e RAGE (Somensi *et al.* 2017).

## Referências

- Blanchard, D. C. and Blanchard, R. J. (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* **39**, 43-68.
- Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H. and Riederer, P. (1995) Interleukin-1 Beta and interleukin-6 Are Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's and De Novo Parkinson's Disease Patients. *Neuroscience letters* **202**.
- Bobkova, N. V., Evgen'ev, M., Garbuz, D. G. et al. (2015) Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 16006-16011.
- Bobkova, N. V., Garbuz, D. G., Nesterova, I. et al. (2014) Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **38**, 425-435.
- Bové, J. and Perier, C. (2012) Neurotoxin-based Models of Parkinson's Disease. *Neuroscience* **211**.
- Calderwood, S. and Murshid, A. (2017) Molecular Chaperone Accumulation in Cancer and Decrease in Alzheimer's Disease: The Potential Roles of HSF1. *Frontiers in neuroscience* **11**.
- Carvey, P. M., Zhao, C. H., Hendey, B., Lum, H., Trachtenberg, J., Desai, B. S., Snyder, J., Zhu, Y. G. and Ling, Z. D. (2005) 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. *Eur J Neurosci* **22**, 1158-1168.
- Cho, B., Song, D., Sugama, S., Shin, D., Shimizu, Y., Kim, S., Kim, Y. and Joh, T. (2006) Pathological Dynamics of Activated Microglia Following Medial Forebrain Bundle Transection. *Glia* **53**.

- Dauer, W. and Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D., Dustin, M. and Gan, W. (2005) ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in Vivo. *Nature neuroscience* **8**.
- de Lau, L. M. and Breteler, M. M. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **5**, 525-535.
- Dexter, D. T. and Jenner, P. (2013) Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* **62**, 132-144.
- Didier, N., Romero, I. A., Creminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J. and Mabondzo, A. (2003) Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* **86**, 246-254.
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P. et al. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030.
- Dufek, M., Rektorova, I., Thon, V., Lokaj, J. and Rektor, I. (2015) Interleukin-6 May Contribute to Mortality in Parkinson's Disease Patients: A 4-Year Prospective Study. *Parkinsons Dis* **2015**, 898192.
- Dukay, B., Csoboz, B. and Toth, M. E. (2019) Heat-Shock Proteins in Neuroinflammation. *Front Pharmacol* **10**, 920.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L. and McLean, P. J. (2011) Molecular chaperones in Parkinson's disease--present and future. *J Parkinsons Dis* **1**, 299-320.
- Evgen'ev, M. B., Garbuz, D. G., Morozov, A. V. and Bobkova, N. V. (2018) Intranasal Administration of Hsp70: Molecular and Therapeutic Consequences. In: *In:*

- Asea A., Kaur P. (eds) *HSP70 in Human Diseases and Disorders. Heat Shock Proteins*, Vol. vol 14. Springer, Cham.
- Ferrari, C. C., Pott Godoy, M. C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A. M. and Pitossi, F. J. (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* **24**, 183-193.
- Fontoura, J. L., Baptista, C., Pedrosa Fde, B., Pochapski, J. A., Miyoshi, E. and Ferro, M. M. (2017) Depression in Parkinson's Disease: The Contribution from Animal Studies. *Parkinsons Dis* **2017**.
- Gadani, S. P., Walsh, J. T., Lukens, J. R. and Kipnis, J. (2015) Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* **87**, 47-62.
- Gadient, R. and Otten, U. (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a Molecule With Both Beneficial and Destructive Potentials. *Progress in neurobiology* **52**.
- Gasparotto, J., Ribeiro, C. T., Bortolin, R. C. et al. (2017) Targeted inhibition of RAGE in substantia nigra of rats blocks 6-OHDA-induced dopaminergic denervation. *Sci Rep* **7**, 8795.
- Gifondorwa, D. J., Robinson, M. B., Hayes, C. D., Taylor, A. R., Pevette, D. M., Oppenheim, R. W., Caress, J. and Milligan, C. E. (2007) Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **27**, 13173-13180.
- Goedert, M. (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **2**, 492-501.
- Gruol, D. and Nelson, T. (1997) Physiological and Pathological Roles of interleukin-6 in the Central Nervous System. *Molecular neurobiology* **15**.



- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2016) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
- Kim, W., Mohny, R., Wilson, B., Jeohn, G., Liu, B. and Hong, J. (2000) Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**.
- Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T. and McLean, P. J. (2004) Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem* **279**, 25497-25502.
- Lawson, L., Perry, V., Dri, P. and Gordon, S. (1990) Heterogeneity in the Distribution and Morphology of Microglia in the Normal Adult Mouse Brain. *Neuroscience* **39**.
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M. and Pitossi, F. J. (2013) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha: reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? *Front Cell Neurosci* **7**, 53.
- Lee, C. S., Sauer, H. and Bjorklund, A. (1996) Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* **72**, 641-653.
- Li, H., Yang, J., Wang, Y., Liu, Q., Cheng, J. and Wang, F. (2019) Neuroprotective effects of increasing levels of HSP70 against neuroinflammation in Parkinson's disease model by inhibition of NF-kappaB and STAT3. *Life Sci* **234**, 116747.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E. et al. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481-487.

- Lima, M. M., Martins, E. F., Delattre, A. M., Proenca, M. B., Mori, M. A., Carabelli, B. and Ferraz, A. C. (2012) Motor and non-motor features of Parkinson's disease - a review of clinical and experimental studies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **11**, 439-449.
- Loeffler, D., DeMaggio, A., Juneau, P., Havaich, M. and LeWitt, P. (1994) Effects of Enhanced Striatal Dopamine Turnover in Vivo on Glutathione Oxidation. *Clinical neuropharmacology* **17**.
- Lyon, M. S. and Milligan, C. (2019) Extracellular heat shock proteins in neurodegenerative diseases: New perspectives. *Neurosci Lett* **711**, 134462.
- Magrané, J., Smith, R., Walsh, K. and Querfurth, H. (2004) Heat Shock Protein 70 Participates in the Neuroprotective Response to Intracellularly Expressed Beta-Amyloid in Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**.
- Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670-684.
- Metz, G. A. and Whishaw, I. Q. (2002) Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* **115**, 169-179.
- Ministério da Saúde, S. d. A. à. S. (2017) Portaria Conjunta de Nº 10, de 31 de outubro de 2017. Brasil.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. and Nagatsu, T. (1996) Interleukin (IL)-1 Beta, IL-2, IL-4, IL-6 and Transforming Growth Factor-Alpha Levels Are Elevated in Ventricular Cerebrospinal Fluid in Juvenile Parkinsonism and Parkinson's Disease. *Neuroscience letters* **211**.

- Murshid, A., Eguchi, T. and Calderwood, S. K. (2013) Stress Proteins in Aging and Life Span. *Int J Hyperthermia* **29**, 442-447.
- Müller, T., Blum-Degen, D., Przuntek, H. and Kuhn, W. (1998) Interleukin-6 Levels in Cerebrospinal Fluid Inversely Correlate to Severity of Parkinson's Disease. *Acta neurologica Scandinavica* **98**.
- Nagatsu, T. (2002) Parkinson's Disease: Changes in Apoptosis-Related Factors Suggesting Possible Gene Therapy. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* **109**.
- Nagatsu, T. and Sawada, M. (2005) Inflammatory Process in Parkinson's Disease: Role for Cytokines. *Current pharmaceutical design* **11**.
- Nagel, F., Falkenburger, B. H., Tonges, L., Kowsky, S., Poppelmeyer, C., Schulz, J. B., Bahr, M. and Dietz, G. P. (2008) Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* **105**, 853-864.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (New York, N.Y.)* **308**.
- Pastukhov, Y. F., Plaksina, D. V., Lapshina, K. V., Guzhova, I. V. and Ekimova, I. V. (2014) Exogenous protein HSP70 blocks neurodegeneration in the rat model of the clinical stage of Parkinson's disease. *Dokl Biol Sci* **457**, 225-227.
- Perry, V. and Teeling, J. (2013) Microglia and Macrophages of the Central Nervous System: The Contribution of Microglia Priming and Systemic Inflammation to Chronic Neurodegeneration. *Seminars in immunopathology* **35**.

- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E. and Lang, A. E. (2017) Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17013.
- Prut, L. and Belzung, C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* **463**, 3-33.
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G. R., Hong, J. S., Knapp, D. J. and Crews, F. T. (2007) Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. *Glia* **55**, 453-462.
- Radons, J. (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **21**, 379-404.
- Roelofs, K. (2017) Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**.
- Sofroniew, M. V. (2015) Astrogliosis. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol. 7.
- Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35.
- Somens, N., Brum, P. O., de Miranda Ramos, V., Gasparotto, J., Zanotto-Filho, A., Rostirolla, D. C., da Silva Morrone, M., Moreira, J. C. F. and Pens Gelain, D. (2017) Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF- $\kappa$ B and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* **42**, 2507-2522.
- Sparkman, N. and Johnson, R. (2008) Neuroinflammation Associated With Aging Sensitizes the Brain to the Effects of Infection or Stress. *Neuroimmunomodulation* **15**.
- Sun, Y., Pham, A. and Waite, T. (2016) Elucidation of the Interplay Between Fe(II), Fe(III), and Dopamine With Relevance to Iron Solubilization and Reactive

Oxygen Species Generation by Catecholamines. *Journal of neurochemistry* **137**.

Tiefensee Ribeiro, C., Gasparotto, J., Petiz, L. et al. (2019) Oral Administration of Carvacrol/ $\beta$ -Cyclodextrin Complex Protects Against 6-hydroxydopamine-induced Dopaminergic Denervation. *Neurochemistry international* **126**.

Tieu, K. (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a009316.

Tsao, N., Hsu, H. P., Wu, C. M., Liu, C. C. and Lei, H. Y. (2001) Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. *J Med Microbiol* **50**, 812-821.

Tunesi, M., Raimondi, I., Russo, T. et al. (2019) Hydrogel-based delivery of Tat-fused protein Hsp70 protects dopaminergic cells in vitro and in a mouse model of Parkinson's disease. *NPG Asia Materials* **11**, 1-15.

Ungerstedt, U. (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**, 69-93.

Wang, Q., Liu, Y. and Zhou, J. (2015) Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. In: *Transl Neurodegener*, Vol. 4.

Witt, S. N. (2010) Hsp70 molecular chaperones and Parkinson's disease. *Biopolymers* **93**, 218-228.

Ying, W. (2007) The nose may help the brain: intranasal drug delivery for treating neurological diseases. *Future Neurology* **3**.

Zhao, C., Ling, Z., Newman, M. B., Bhatia, A. and Carvey, P. M. (2007) TNF-Alpha Knockout and Minocycline Treatment Attenuates Blood Brain Barrier Leakage in MPTP-Treated Mice. *Neurobiol Dis* **26**, 36-46.