



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



INGRID PRATA MENDONÇA

EFEITOS DE PREBIÓTICOS (FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEO) SOBRE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO, A MICROBIOTA INTESTINAL E ALTERAÇÕES CEREBRAIS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON

Recife
2025

INGRID PRATA MENDONÇA

EFEITOS DE PREBIÓTICOS (FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEO) SOBRE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO, A MICROBIOTA INTESTINAL E ALTERAÇÕES CEREBRAIS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador (a): Christina Alves Peixoto

Coorientador (a): Belmira Lara da Silveira Andrade da
costa

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Mendonca, Ingrid Prata.

Efeitos de prebióticos (Frutooligossacarídeo e Galactooligossacarídeo) sobre o comportamento depressivo, a microbiota intestinal e alterações cerebrais em modelo animal de doença de Parkinson / Ingrid Prata Mendonca. - Recife, 2025.
165 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2025.

Orientação: Christina Alves Peixoto.

Coorientação: Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa.

Inclui referências e anexos.

1. Doença de Parkinson; 2. Microbiota; 3. Depressão. I. Peixoto, Christina Alves. II. Costa, Belmira Lara da Silveira Andrade da. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

INGRID PRATA MENDONÇA

EFEITOS DE PREBIÓTICOS (FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEO) SOBRE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO, A MICROBIOTA INTESTINAL E ALTERAÇÕES CEREBRAIS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte (Examinadora externo)
Departamento de Farmacologia (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Karla Patrícia Teixeira Barbosa (Examinador Externo)
Centro Acadêmico de Vitória (UFPE)

Prof^o. Dr. Reginaldo Pereira da Silva (Examinador Externo)
Departamento de Fisiologia (UFPE)

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e Iran, meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão primacial da minha existência

Aos meus pais, Cida e Iran, pelo apoio e paciência dedicadas a mim em todos os momentos;

A minha orientadora, Dra. Christina Peixoto, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto, por todo apoio, ensinamentos, e pela convivência enriquecedora durante a pós-graduação;

A minha co-orientadora Dra. Belmira Lara, igualmente, por todo apoio e ensinamentos acadêmicos.

A minha banca examinadora, que dispôs de seu tempo e intelecto para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Ultraestrutura Rodrigo Soares, Igor Paiva, Samara, Neila, Débora e Crislayne;

Aos amigos que fiz durante o doutorado sanduíche, Bruno Lemes, Maria Vitória Ferronato, Adryelle, José e à minha querida Érica.

A Rodrigo Lima, também pelo apoio e paciência;

Aos técnicos, veterinários e trabalhadores em geral do Instituto Aggeu Magalhães

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), especialmente à secretária Adenilda, receptora final de todo o carinho que aprendemos a ter.

Aos técnicos e secretários do Laboratório de Neuroplasticidade da Universidade de São Paulo, pelo apoio durante o estágio doutoral sanduíche.

Aos animais utilizados nesta pesquisa, pelo seu sacrifício em prol da ciência

A FACEPE, pelo apoio financeiro pessoal através da concessão da bolsa.

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto

A todos que de maneiras indiretas contribuíram para o desenvolvimento e finalização deste árduo trabalho.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.
Fernando Pessoa

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) continua sendo desafiadora quanto ao seu tratamento. Além dos sintomas motores, sintomas não motores, como depressão, estão presentes em aproximadamente 40% dos pacientes, contribuindo para a perda da qualidade de vida. Um crescente corpo de evidências tem surgido sobre o envolvimento do eixo microbiota-intestino-cérebro na DP. Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) são fibras prebióticas fermentadas por bactérias da microbiota intestinal, as quais produzem metabólitos chamados ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Estudos indicam que tais metabólitos contribuem para uma melhora nas condições neurodegenerativas e psiquiátricas. Este estudo analisou os efeitos da administração oral de FOS e GOS em camundongos com DP experimental induzida por rotenona. 40 camundongos C57BL/6 machos de 8 semanas de idade foram divididos em 4 grupos: (1) CONTROLE: tratados com solução veículo; (2) PD: submetidos à 2,5mg/Kg/dia de rotenona (via SC) por 20 dias consecutivos; (3) PD+PREB: administrados simultaneamente com 2,5mg/Kg/dia de rotenona (via SC) e 3g/Kg/dia de FOS + 4g/Kg/dia de GOS (VO), por 20 dias consecutivos; (4) PD+FLU: administrados simultaneamente com 2,5mg/Kg/dia de rotenona (via sc) e 10mg/Kg/dia de fluoxetina (VO), por 20 dias consecutivos. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto Aggeu Magalhães (CEUA-IAM-169/2021). Ao 21º dia, foram realizados o teste do campo aberto e o teste do rotarod, além dos testes para avaliação do comportamento tipo-depressivo, teste de preferência de sacarose e teste de suspensão da cauda. Após eutanásia, foram coletadas as fezes para sequenciamento da microbiota intestinal, sangue para análise de citocinas e LPS, cólon, substância negra e córtex pre-frontal para análises histológicas e análise de expressão proteica. Os resultados demonstraram que os prebióticos melhoraram o déficit motor e o comportamento tipo-depressivo em camundongos. Além disso, o tratamento com FOS e GOS levou a um aumento nas bactérias produtoras de AGCCs no intestino, e reduziu o acúmulo de alfa-sinucleína no intestino e na Substância negra. Além disso, os prebióticos aumentaram ocludina e GPR43 intestinal, indicando redução da permeabilidade intestinal e aumento de receptores para AGCCs, além de reduzir p-NFkB e IL1- β no intestino. FOS e GOS atenuaram a perda de neurônios dopaminérgicos e reduziram a neuroinflamação na Substância negra e no córtex.

RESUMO

pré-frontal, diminuindo assim os níveis de expressão de IBA-1, GFAP, iNOS, p-NFkB e IL1- β . Por fim, os prebióticos melhoraram a neuroplasticidade ao aumentar níveis de serotonina cerebral e transportador de serotonina (SERT), BDNF, p-CREB e proteína sináptica PSD-95 no córtex pré-frontal. Em conclusão, FOS e GOS mostraram resultados promissores para a inserção de nova estratégia terapêutica para tratamento da DP em humanos.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Depressão, Eixo intestino-cérebro, Microbiota intestinal.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) remains a challenging treatment. In addition to motor symptoms, non-motor symptoms such as depression are present in approximately 40% of patients, contributing to a loss of quality of life. A growing body of evidence has emerged on the involvement of the microbiota-gut-brain axis in PD. Fructooligosaccharides (FOS) and Galactooligosaccharides (GOS) are prebiotic fibers fermented by bacteria from the intestinal microbiota, which produce metabolites called short-chain fatty acids (SCFAs). Studies indicate that these metabolites contribute to an improvement in neurodegenerative and psychiatric conditions. This study analyzed the effects of oral administration of FOS and GOS in mice with experimental PD induced by rotenone. Forty 8-week-old male C57BL/6 mice were divided into 4 groups: (1) CONTROL: treated with vehicle solution; (2) PD: subjected to 2.5mg/kg/day of rotenone (SC) for 20 consecutive days; (3) PD+PREB: administered simultaneously with 2.5mg/kg/day of rotenone (SC) and 3g/kg/day of FOS + 4g/kg/day of GOS (PO), for 20 consecutive days; (4) PD+FLU: administered simultaneously with 2.5mg/kg/day of rotenone (SC) and 10mg/kg/day of fluoxetine (PO), for 20 consecutive days. The procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute (CEUA-IAM-169/2021). On the 21st day, the open field test and the rotarod test were performed, in addition to tests to assess depressive-like behavior, sucrose preference test and tail suspension test. After euthanasia, feces were collected for sequencing of the intestinal microbiota, blood for analysis of cytokines and LPS, colon, substância negra and prefrontal cortex for histological analysis and analysis of protein expression. The results demonstrated that prebiotics improved motor deficit and depressive-like behavior in mice. Furthermore, FOS and GOS treatment led to an increase in SCFA-producing bacteria in the intestine, and reduced the accumulation of alpha-synuclein in the intestine and substância negra. Furthermore, prebiotics increased intestinal occludin and GPR43, indicating reduced intestinal permeability and increased receptors for SCFAs, in addition to reducing p-NFkB and IL1- β in the intestine. FOS and GOS attenuated the loss of dopaminergic neurons and reduced neuroinflammation in the substância negra and prefrontal cortex, thereby decreasing the expression levels of IBA-1, GFAP, iNOS, p-NFkB, and IL1- β . Finally, prebiotics improved neuroplasticity by increasing levels of brain serotonin and serotonin transporter (SERT), BDNF, p-CREB, and synaptic protein PSD-95 in the prefrontal cortex. In conclusion, FOS and

ABSTRACT

GOS showed promising results for the insertion of a new therapeutic strategy for the treatment of PD in humans.

Keywords: Parkinson's disease, Depression, Gut-brain axis, Gut microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas que compõem os núcleos da base, no encéfalo (Caudado, putâmen, segmentos internos e externos de globo pálido, núcleos subtalâmicos) e no tronco encefálico (substância negra).....	21
Figura 2 - Via direta dos núcleos da base	23
Figura 3 - Via indireta dos núcleos da base.....	23
Figura 4 - Vias direta e indireta alteradas na Doença de Parkinson.....	24
Figura 5 - Principais sintomas motores e não motores da Doença de Parkinson.....	26
Figura 6 - Processos patológicos subjacentes aos sintomas depressivos associados à DP: Reatividade glial, estresse oxidativo, disfunção monoaminérgica e disbiose (Será detalhado adiante).....	29
Figura 7 - Resumo esquemático: como a disbiose contribui para a patologia da Doença de Parkinson.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético

AADC - L-aminoácido aromático descarboxilase

AGCCs – ácidos graxos de cadeia curta

BDNF – Fator Neurotrófico derivado de cérebro

COX-2 – Ciclooxygenase 2

DA - Dopamina

DP – Doença de Parkinson

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FITC-DEXTRAN - Isotiocianato de fluoresceína–dextran

FOS - Frutooligossacarídeos

GF – Germ-Free

GI - Gastrintestinal

GOS - Galactooligossacarídeos

GPR41 – Receptor acoplado à proteína G tipo 41

GPR43 - Receptor acoplado à proteína G tipo 43

HPA – Eixo hipotálamo-ptuitária-adrenal

IFN- γ – Interferon gama

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IPSCs - Células-tronco pluripotentes induzidas

LPS – Lipopolissacarídeos

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

NE - Noradrenalina

NEMs – Neurônios espinhais médios

NF κ B – Factor Nuclear kappa B

NMDA - N-metil-D-aspartato

p-CREB- proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc, fosforilado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PET – Tomografia por Emissão de Pósitron

PSD – proteína de densidade sináptica

SERT – Transportador de serotonina

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SN_{pc} – Substância Negra *pars compacta*

SN_{pr} – Substância negra *pars reticulada*

TLR4 – Receptor tipo toll 4

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

α -SIN - α -sinucleína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS.....	19
2.2.1 Analisar no intestino:	19
2.2.2 Analisar no soro:	19
2.2.3 Analisar no cérebro	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA ou REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 FISIOPATOLOGIA E SINAIS DA DOENÇA DE PARKINSON	20
3.2 FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO E DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS ASSOCIADOS À DOENÇA DE PARKINSON	26
3.3 INFLUÊNCIA DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO NA DOENÇA DE PARKINSON	30
3.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: PARADIGMA DA ROTENONA.....	34
3.5 TRATAMENTO E MANEJO DA DOENÇA DE PARKINSON	36
3.6 O POTENCIAL DAS ABORDAGENS NUTRACÊUTICAS PARA A DOENÇA DE PARKINSON: PREBIÓTICOS	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 ARTIGO 1 - Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) atenuam comportamento depressivo em um modelo murino de doença de Parkinson através da modulação do eixo Microbiota-Intestino-Cérebro	40
4.2 ARTIGO 2 - Espada de dois gumes: a função complexa das células gliais entéricas nas doenças neurodegenerativas	87
5. CONCLUSÕES	124
6. SÚMULA CURRICULAR.....	125
7. REFERÊNCIAS	126
8. ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO CEUA	139
9. ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS	140

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP), descrita por James Parkinson em 1817, é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, e uma das doenças neurológicas mais intrigantes dos dias de hoje. Tem distribuição ampla ao redor do mundo e atinge todos os grupos étnicos e classes sócio-econômicas. A incidência e prevalência da DP aumentam com a idade, sendo os indivíduos a partir de 60 anos mais predispostos (TANNER; GOLDMAN, 2005). Estima-se uma prevalência de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes (BRASIL. Ministério da Saúde. 2017).

Do ponto de vista patológico, a DP é uma doença de caráter degenerativo e progressivo, cujas alterações podem ser motoras e não motoras; as alterações motoras decorrem principalmente da morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra, a qual também é acompanhada pela presença de inclusões intracitoplasmáticas de α -sinucleína conhecidas como corpúsculos de Lewy. Suas principais manifestações motoras incluem tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular (que gera um padrão de movimentação conhecido por “roda dentada”) e anormalidades posturais (HOBSON, 2003).

No entanto, as alterações não são restritas à substância negra e podem estar presentes em outros núcleos do tronco cerebral (núcleo motor dorsal do vago), no córtex cerebral, e mesmo em neurônios periféricos, como os do plexo mioentérico, no intestino (BRAAK et al., 2003). A presença dessas alterações degenerativas além do sistema nigroestriatal pode explicar uma série de sintomas e sinais não motores, tais como alterações do olfato, distúrbios do sono, hipotensão postural, sintomas gastrintestinais, mudanças emocionais, depressão, ansiedade, sintomas psicóticos, prejuízos cognitivos e demência.

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) e o Sistema Nervoso Entérico (SNE) também representam locais importantes do ponto de vista patológico e etiológico, uma vez que diversos fatores neuropatológicos presentes na DP como inflamação, estresse oxidativo e formação de corpos de Lewy estão presentes e podem iniciar em células da glia entérica e células intestinais. De acordo com a hipótese de Braak, a patologia da DP incluindo os fatores neuropatológicos supracitados podem ocorrer no intestino décadas antes do início dos sintomas motores e ascender posteriormente ao Sistema Nervoso Central (SNC) por vias

de comunicação do eixo intestino-cérebro (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; KESSEL; EL AIDY, 2019).

Pesquisas emergentes sugerem que o eixo intestino-cérebro desempenha um papel crucial na patogênese da DP (SCHEPERJANS et al., 2015; MERTSALMI et al., 2017; TAI et al., 2023). A microbiota intestinal, uma comunidade complexa de microrganismos que residem no trato gastrointestinal, tem sido implicada na etiopatologia da DP. Estudos recentes mostraram uma ligação clara entre alterações na composição da microbiota intestinal e o desenvolvimento da DP em humanos e modelos animais (CIRSTEA et al., 2020; SAMPSON et al., 2016). Essas alterações podem levar ao aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e produção de metabólitos neurotóxicos, que podem contribuir para a progressão da DP (CAPUTI et al., 2018).

Sendo assim, modular a microbiota intestinal por meio de intervenções dietéticas como prebióticos podem oferecer novas estratégias terapêuticas para controlar os sintomas da DP, incluindo a depressão, e retardar a progressão da doença. Este estudo teve como objetivo a investigação de potenciais efeitos neuroprotetores da associação de duas fibras prebióticas: Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) sobre a modulação da microbiota intestinal, déficit motor e sintomas tipo-depressivos, além de alterações cerebrais e intestinais em camundongos submetidos à DP experimental induzidos pela rotenona.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar os efeitos de prebióticos (fruto-oligossacarídeo e galacto-oligossacarídeo) sobre o comportamento tipo-depressivo, a microbiota intestinal e as alterações cerebrais em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de Doença de Parkinson induzido pela rotenona.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Analisar no intestino:

- Inflamação, através da quantificação de marcadores proinflamatórios fator nuclear kappa B (pNFkB) receptor tipo toll 4 (TLR4), interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina beta (IL1- β), interleucina 6 (IL-6), ciclooxygenase 2 (COX2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS);
- Permeabilidade de barreira epitelial intestinal, através da quantificação de ocludinas e ensaio de permeabilidade intestinal por Isotiocianato de fluoresceína-dextran (FITC-DEXTRAN).
- Acúmulo de α -sinucleína, através da quantificação dessa proteína no intestino;
- Sequenciamento e análise dos principais grupos da microbiota intestinal

2.2.2 Analisar no soro:

- Níveis de citocinas proinflamatórias TNF- α , IL1- β , IL-6 no soro;
- Níveis de Lipopolissacarídeos (LPS) no soro.

2.2.3 Analisar no cérebro

- Morte neuronal, na substância negra e hipocampo;
- Neuroinflamação, através da ativação de células gliais e produção de TNF- α , IL1- β , COX-2 e iNOS na Substância nigra e hipocampo;
- Plasticidade neural, através da quantificação de neurotrofinas como o Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro (BDNF), e o fator de transcrição ligante do Elemento de Resposta ao AMPc (p-CREB).

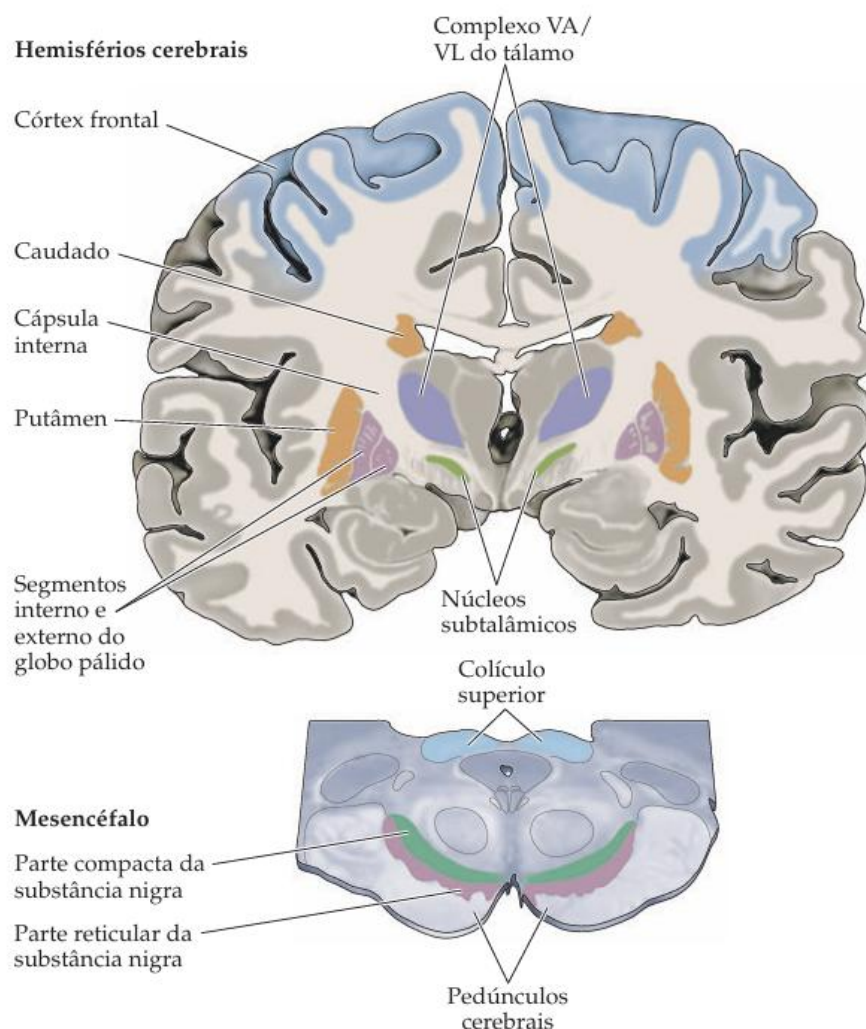
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA ou REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FISIOPATOLOGIA E SINAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

A DP é uma doença crônica de caráter neurodegenerativo e progressivo, cuja prevalência aumenta a partir dos 60 anos de idade. A DP é causada principalmente pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (SNpc) e acúmulo da proteína α -sinucleína (α -sin) nos neurônios remanescentes (SURATHI et al., 2016). No processo de desenvolvimento da DP, alguns processos neuropatológicos são importantes, a saber: os aglomerados citoplasmáticos de α -sin, o aumento do estresse oxidativo e elevada reatividade de microglia e astrócitos, esses últimos levam à neuroinflamação através da ativação do NFkB e consequente expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL1- β e IL-6 (GUAN, 2017; LORENZL et al., 2002).

A DP se apresenta nos pacientes acometidos principalmente por sintomas motores clássicos, que são tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e alterações na postura e no equilíbrio (BLOEM et al., 2021). Essas alterações motoras na DP resultam do comprometimento de um circuito subcortical responsável pela modulação dos movimentos voluntários, regulando a atividade dos neurônios motores superiores. Este circuito é composto pelo cerebelo e os núcleos da base. A expressão núcleos da base refere-se a um grande e funcionalmente distinto conjunto de núcleos neurais que se localizam em áreas profundas dos hemisférios cerebrais. Os componentes desses núcleos importantes à função motora são o caudado e putâmen (que formam o estriado) e o globo pálido, além de duas estruturas adicionais, a substância negra e o núcleo subtalâmico (PURVES et al., 2010; OBESO et al., 2008) **(Figura 1).**

Figura 1 - Estruturas que compõem os núcleos da base, no encéfalo (caudado, putâmen, segmentos internos e externos de globo pálido, núcleos subtalâmicos) e no tronco encefálico (substância negra).



Fonte: PURVES et al, 2010.

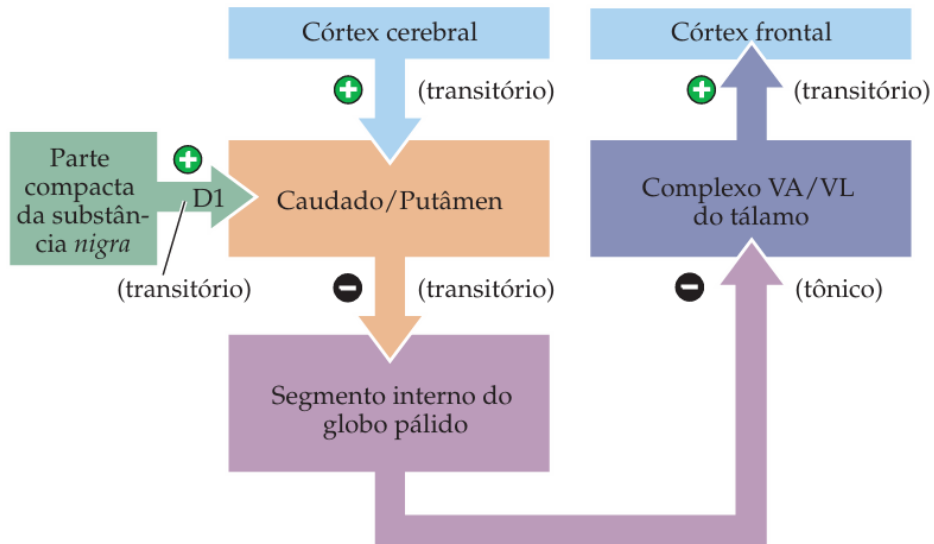
Existem duas vias de funcionamento desse circuito que modulam o movimento: a via direta e a via indireta (**Figuras 2 e 3**). A dopamina (DA) sintetizada na SNpc atua no estriado através dos neurônios espinhosos médios (NEMs).

Via direta: Após ativação glutamatérgica advindas do córtex, um grupo de NEMs estriatais gabaérgicos são ativados, os quais se projetam para o globo pálido

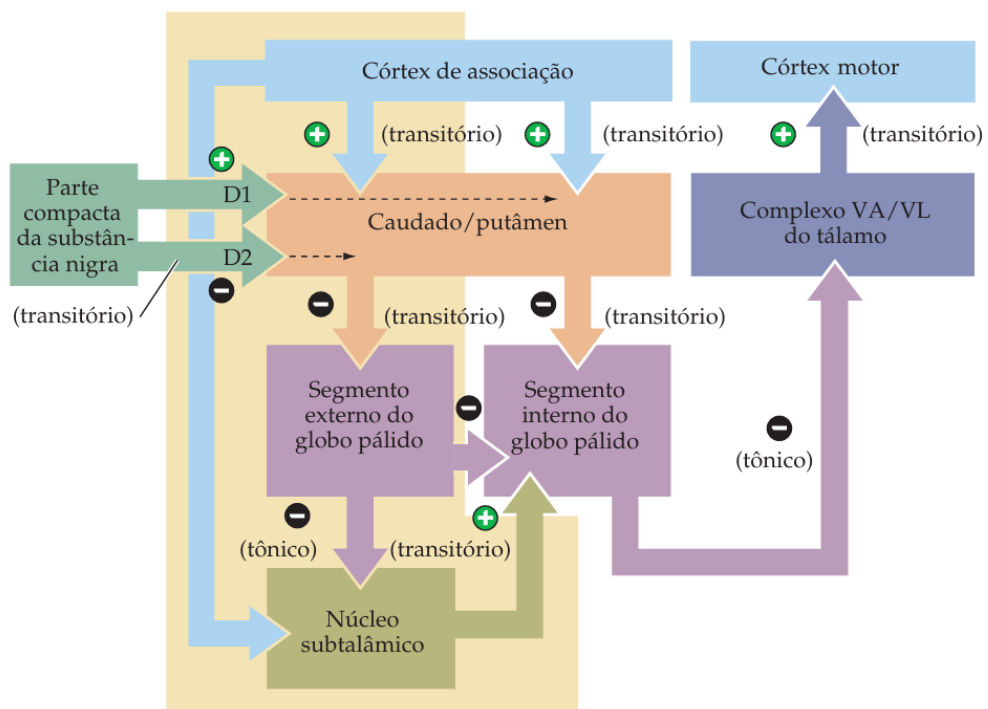
interno e Substância negra *pars reticulada* (SN_{rp}), essas duas estruturas que também são gabaérgicas, são então inibidas, desinibindo assim os neurônios glutamatérgicos talâmicos, que projetam neurônios excitatórios para o córtex (**Figura 2**). O resultado dessa sequência é a modulação precisa do movimento (PURVES et al., 2010).

Via indireta: já outro grupo de NEMs estriatais, projetam-se de forma indireta para o globo pálido interno e SN_{pr}, inibindo o globo pálido externo o qual também é gabaérgico, desta forma desinibindo o núcleo subtalâmico, deixando o globo pálido interno e SN_{pr} livres para enviar impulsos gabaérgicos aos neurônios talâmicos, e estes por sua vez serão impedidos de ativar neurônios corticais. O resultado dessa sequência antagoniza a ação da via direta (**Figura 3**) (PURVES et al., 2010). De forma geral, os núcleos da base estabelecem o padrão para a facilitação de movimentos voluntários e inibição simultânea de movimentos concorrentes ou interferentes (SIMONYAN, 2019).

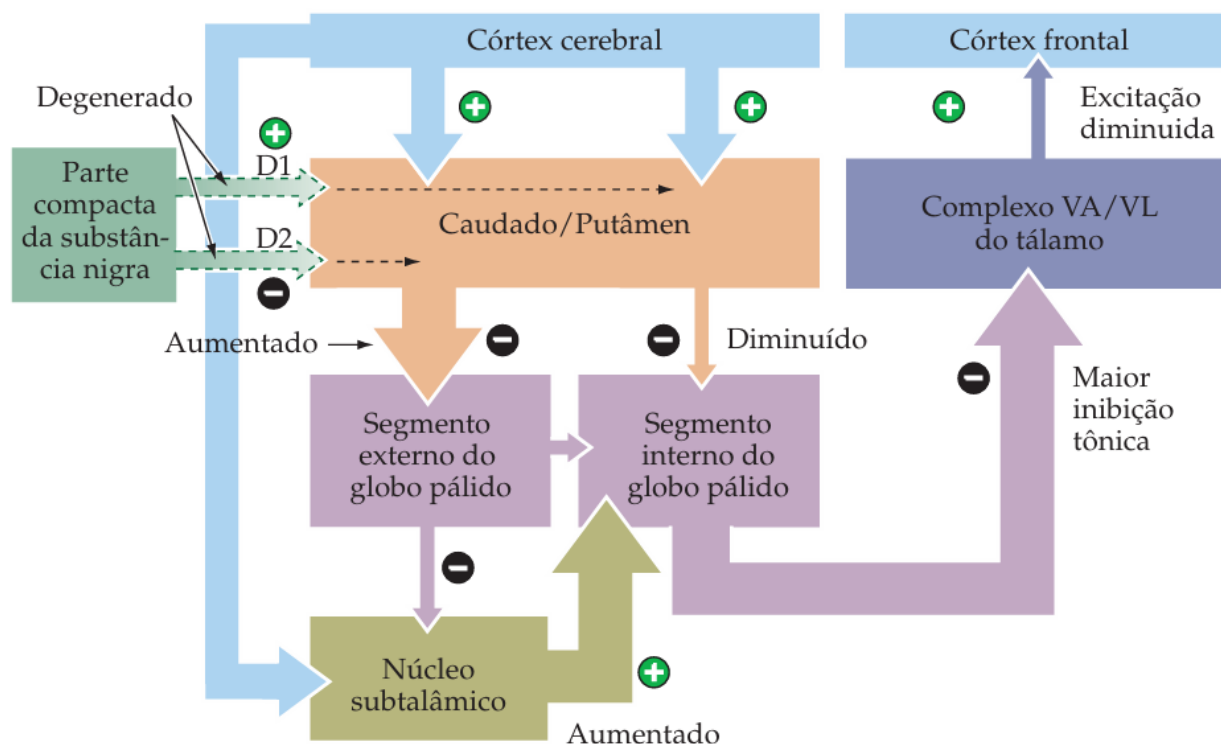
Tal como observado nas **figuras 2 e 3**, a parte compacta da substância negra influencia este circuito através de conexões nigroestriatais com sinapses dopaminérgicas, por esta razão a morte de neurônios na substância negra produtores de dopamina causa um mal funcionamento desses circuitos moduladores do movimento, tal como ilustra a **figura 4** (PURVES et al., 2010; CACABELOS, 2017).

Figura 2 - Via direta dos núcleos da base

Fonte: PURVES et al., 2010

Figura 3 - Via indireta dos núcleos da base

Fonte: PURVES et al., 2010

Figura 4 - Vias direta e indireta alteradas na DP

Fonte: PURVES et al., 2010

Além dos déficits motores, os pacientes parkinsonianos também apresentam uma gama de sintomas não motores como distúrbios gastrintestinais, déficits cognitivos, alterações no sono e depressão. A depressão é o principal sintoma não motor que envolve o sistema nervoso central (FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009).

Sintomas depressivos são vivenciados por cerca de 30-40% dos pacientes com DP, contribuindo para o agravamento da doença e perda da qualidade de vida. Dentre os pacientes que tratam a depressão, metade continuam depressivos, sugerindo ineficácia do tratamento (BHATTACHARJEE et al., 2018; FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009). Sendo assim, é importante investigar alternativas terapêuticas em modelos animais para tratar a depressão em pacientes com DP.

Do ponto de vista molecular, a patogênese da depressão não se restringe a alterações da sinalização monoaminérgica, mas inclui distúrbios do sistema endócrino

e imunológico, tais como excesso de glicocorticóides e glutamato, ativação microglial, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROS) (DETKA et al., 2013). Estudos clínicos indicam que tanto a depressão pode induzir processos inflamatórios, como a inflamação pode induzir episódios depressivos (MCNAMARA; LOTRICH, 2012; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009; ROSENBLAT et al., 2014). Em pacientes com DP a elevação da expressão de citocinas inflamatórias foi positivamente correlacionada com a gravidade da depressão e da ansiedade com níveis elevados de TNF- α (WANG et al., 2016). Em modelo experimental de DP, o comportamento depressivo nos animais se encontra associado à diminuição de receptores de serotonina no córtex e região da rafe dorsal (LOANE et al., 2009).

Periféricamente, a disfunção gastrointestinal (GI) é um dos sintomas não motores mais prevalentes que pode ocorrer em qualquer estágio da DP, inclusive anos antes do diagnóstico (JOHNSON et al., 2018). O intestino parece ser um dos primeiros locais afetados pela DP não apenas pelos sintomas locais, mas também por apresentar agregados de α -sinucleína, que é um fator neuropatológico da DP, que por sua vez podem alcançar o SNC por meio da comunicação intestino-cérebro, cujos mecanismos exatos estão ainda sob investigação. Análises histológicas feitas em biópsias do trato gastrointestinal superior e inferior de pacientes com DP em fase pré-clínica demonstram acúmulo de α -sinucleína fosforilada, que representa uma das formas tóxicas dessa proteína (HILTON et al., 2014). Pesticidas e alterações no microbioma intestinal (disbiose) podem levar a processos como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação intestinal e, subsequente formação de agregados de α -sinucleína (STEINER, QUANSAH E BRUNDIN, 2018). Por sua vez, pacientes com DP apresentam também comprometimento da barreira epitelial intestinal, o que pode aumentar sua exposição a toxinas (HOUSER; TANSEY, 2017).

A **figura 5** resume os sintomas vivenciados por pacientes com DP, incluindo os sintomas não motores já citados até aqui, os quais serão discutidos mais detalhadamente adiante, como depressão e distúrbios gastrintestinais.

Figura 5 - Principais sintomas motores e não motores da Doença de Parkinson



Fonte: MENDONÇA, 2025.

3.2 FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO E DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS ASSOCIADOS À DOENÇA DE PARKINSON

A DP e a depressão compartilham alterações moleculares, tais como a disfunção monoaminérgica, a neuroinflamação e o estresse oxidativo, tal como ilustrado na **figura 6** (MENDONÇA et al., 2020). A neurotransmissão dopaminérgica também tem sido implicada no surgimento de sintomas depressivos. Uma vez que, os sintomas motores surgem clinicamente após a degeneração de 70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, os sintomas depressivos parecem ser mais sensíveis à degeneração dopaminérgica precoce, ou seja, em um estágio de degeneração menor que 70% (MILLER et al., 2015). Foi relatado também que os sintomas depressivos em pacientes com DP são inversamente proporcionais ao funcionamento do transportador de dopamina no estriado ventral (WEINTRAUB et al., 2004). Além disso, em um estudo *post-mortem*, foi observado que a perda neuronal dopaminérgica na SNpc foi cerca de sete vezes maior em pacientes com DP deprimidos em comparação aos não

deprimidos (FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009), corroborando com a ideia que a depressão na DP evolui também com a neurodegeneração dopaminérgica.

A noradrenalina (NE) também está implicada nos sintomas depressivos relacionados à DP. A menor ligação do transportador de NE no locus coeruleus também foi relacionada ao aumento da incidência de sintomas de ansiedade e depressão em pacientes parkinsonianos. Um estudo por tomografia por emissão de pósitron (PET), utilizando um ligante transportador de dopamina e noradrenalina, mostrou perda significativa em estruturas límbicas, como estriado ventral e amígdala de pacientes com DP, alterações que foram associadas à depressão (REMY et al., 2005). Já a disfunção serotoninérgica, já bem descrita na depressão, foi também apontada como um importante fator mediador da depressão na DP. Na verdade, os primeiros estudos relataram níveis reduzidos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, no líquido de pacientes com DP em comparação com controles saudáveis (CHASE; NG, 1972; JOHANSSON; ROOS, 1971). De forma semelhante, menores níveis de 5-HIAA foram observados no líquido de indivíduos com DP deprimidos em comparação com indivíduos com DP não deprimidos (MAYEUX et al., 1984). Esses estudos reforçam o envolvimento serotoninérgico na depressão associada à DP.

Além da disfunção de monoaminas, o envolvimento da neuroinflamação no comportamento depressivo tem sido demonstrado em estudos pré-clínicos (HODES et al., 2014; MA et al., 2017; MÉNARD et al., 2017), e estudos clínicos (OSIMO et al., 2019). A DP está diretamente associada à ativação de células gliais (astrócitos e micróglia) e à produção de citocinas pró-inflamatórias clássicas, juntamente com outros fatores, que desempenham um papel fundamental no processo de morte neuronal dopaminérgica (MACHADO et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Estudos têm mostrado a importância dos processos imunoinflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo na depressão e na DP, sugerindo que a depressão prodrômica e concomitante pode estar intrinsecamente envolvidas na etiologia e no curso da DP (GOLDMAN; POSTUMA, 2014; LEENTJENS et al., 2003).

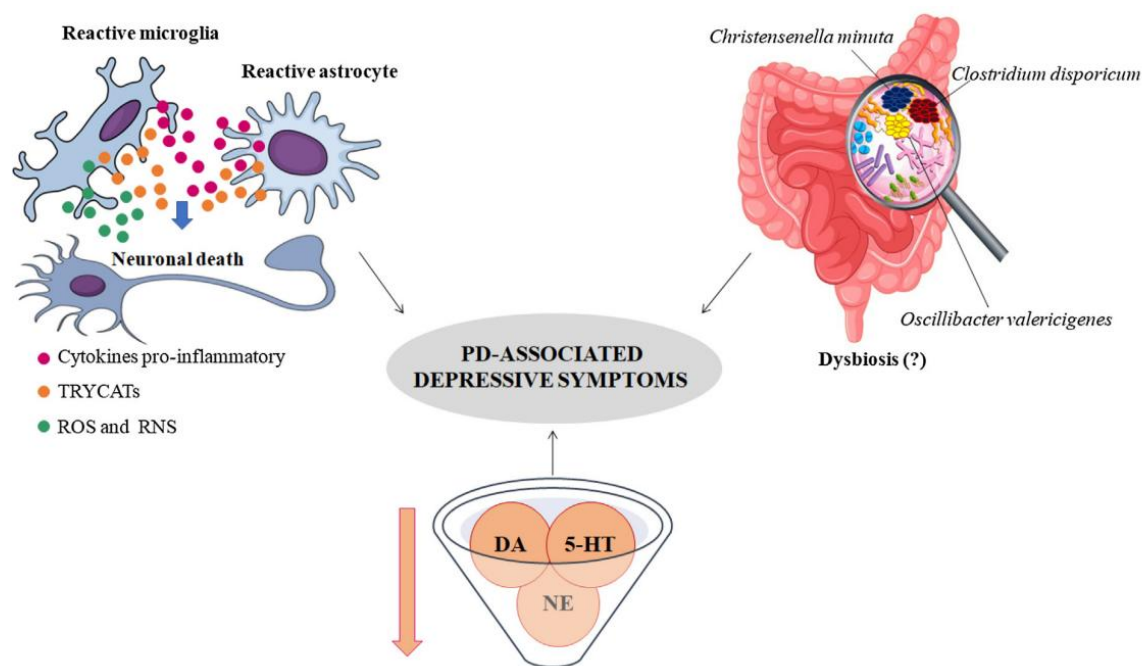
Especificamente, na patobiologia da DP, há uma forte contribuição de citocinas inflamatórias nos sintomas motores e não motores, principalmente IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10. Além disso, polimorfismos nos genes TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão relacionados a um maior risco de DP (HÅKANSSON et al., 2005; KRÜGER et al.,

2000; MATTILA et al., 2002; WAHNER et al., 2007).

Os elevados níveis de citocinas inflamatórias sanguíneas e no SNC também foram relatados em pacientes com depressão maior (ENACHE; PARIANTE; MONDELLI, 2019; MÜLLER et al., 2019), e em modelos animais (ZHONG et al., 2019). Por sua vez, no sangue de pacientes com DP, os estudos mostraram a presença de níveis elevados de IL1- β e TNF- α . Curiosamente, foi relatado que o TNF- α está significativamente correlacionado com depressão mais grave, maior comprometimento cognitivo e mais dificuldade para dormir em pacientes com DP com sintomas não motores (ALRAFIAH et al., 2019; MENZA et al., 2010).

As citocinas inflamatórias apresentam interações recíprocas positivas com o estresse oxidativo e nitrosativo, o que leva à disfunção mitocondrial, que é um dos principais processos deletérios da DP, e sua capacidade de desencadear a morte celular está bem descrita em regiões do sistema nigroestriatal em células dopaminérgicas de pacientes (GONZÁLEZ-CASACUBERTA et al., 2019), e modelos experimentais (BAEK et al., 2018; PARK; KIM; JIN, 2012). O dano oxidativo foi observado por meio de níveis de peroxidação lipídica, níveis das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase no soro, mesencéfalo e estriado de diferentes modelos em roedores (MEI et al., 2019). Em camundongos induzidos a PD pela rotenona, Alabi e colegas (2019) demonstraram comportamento depressivo em animais associado ao aumento de TNF- α e IL-6 no estriado, córtex pré-frontal e hipocampo, bem como aumento da peroxidação lipídica e níveis de nitrito e diminuição da glutathione reductase (ALABI et al., 2019). Assim, moléculas produzidas durante o processo inflamatório têm um papel fundamental na depressão associada à DP.

Figura 6 - Processos patológicos subjacentes aos sintomas depressivos associados à DP: Reatividade glial, estresse oxidativo, disfunção monoaminérgica e disbiose



Fonte: Mendonça et al, 2020

Além da depressão, muitos indivíduos com DP também apresentam sintomas gastrointestinais (PASRICHA et al., 2024; LUBOMSKI et al., 2020). Esses sintomas podem impactar significativamente a qualidade de vida dos pacientes e podem preceder o início dos sintomas motores.

Esses distúrbios gastrintestinais abrangem uma série de sintomas que afetam o trato gastrointestinal, incluindo disfagia, constipação e gastroparesia. Esses sintomas resultam de alterações patológicas no sistema nervoso entérico, uma rede complexa de neurônios que modula a função do intestino (METTA et al., 2022; BHIDAYASIRI et al., 2022). A constipação é um dos sintomas gastrintestinais mais prevalentes na DP, afetando até 80% dos pacientes e contribuindo para o desconforto geral e diminuição da qualidade de vida, além da gastroparesia ou

esvaziamento tardio do estômago, que pode levar a náuseas, inchaço e alterações no apetite (SANTOS-GARCIA et al., 2015).

Atualmente, o tratamento para estes sintomas requer uma abordagem multidisciplinar envolvendo neurologistas, gastroenterologistas e nutricionistas. As estratégias de tratamento podem incluir modificações na dieta, medicamentos para melhorar a motilidade gastrointestinal e intervenções comportamentais. Pacientes com DP devem ser monitorados regularmente para o desenvolvimento de sintomas gastrintestinais para otimizar seu tratamento e bem-estar geral.

3.3 INFLUÊNCIA DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO NA DOENÇA DE PARKINSON

A microbiota intestinal adulta é constituída por mais de 100 trilhões de micróbios, sendo a maioria deles pertencentes ao domínio das bactérias, colonizando principalmente o cólon (10^{11} - 10^{12} células / ml) (BERMON et al., 2015). Estima-se que a microbiota intestinal humana seja constituída por, pelo menos, 1000 diferentes espécies bacterianas já conhecidas, que codificam mais de 3 milhões de genes (BERMON et al., 2015; LEY et al., 2006A). Por meio de estudos moleculares já se sabe que os principais táxons que compõem essa diversidade bacteriana são *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinomycetes* que correspondem a 64%, 23%, 8% e 3% da microbiota intestinal de humanos e camundongos, respectivamente. Cerca de 90% dos táxons bacterianos estão dentro de dois grandes filos: *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (LEY et al., 2006B). Os demais que foram descobertos em amostras fecais do intestino humano pertencem filogeneticamente ao filo Archaea (ARUMUGAM et al., 2011).

A microbiota intestinal é capaz de ajudar na metabolização de componentes não digeríveis como alguns polissacarídeos. No intestino distal, os microrganismos conseguem fermentar esses carboidratos em etanol, gases (como H_2 , CO_2 , CH_4) e, principalmente, em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (MILLER; WOLIN, 1996; MORRISON; PRESTON, 2016; RÍOS-COVIÁN et al., 2016). Os principais AGCC são o acetato (apresentando 2 carbonos), propionato (3 carbonos) e butirato (4 carbonos) que além de serem metabolizados pelo próprio colonócito exercem efeitos metabólicos importante no organismo (BLOEMEN et al., 2009). Esses ácidos graxos são capazes de controlar o metabolismo hepático de lipídeos e da glicose (DEN

BESTEN et al., 2015; NISHINA; FREEDLAND, 1990) bem como de diminuir os níveis de insulina por meio do Receptor acoplados à proteína G GPR43 and GPR41 (MCNELIS et al., 2015). Os AGCC também podem exercer efeitos neuroendócrinos ajudando a controlar o apetite e o consumo de alimentos (CHAMBERS; MORRISON; FROST, 2015). Além disso, os AGCCs regulam o sistema imune e a resposta inflamatória através da inibição da ativação do NFκB e da desacetilação das histonas (ARPAIA et al., 2013; LÜHRS et al., 2002).

A microbiota intestinal pode influenciar na homeostase de outras regiões além do intestino, e evidências demonstram que ela pode modificar funções cerebrais. O eixo intestino-cérebro é uma via de comunicação bidirecional bastante complexa entre esses dois órgãos que envolve vários intermediários como hormônios, citocinas e, até mesmo, sinais neurais (RHEE; POTHOUKAKIS; MAYER, 2009). Esse eixo é composto por fibras e neurônios do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), pelo eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA) e pela microbiota intestinal. O nervo vago é o mediador entre as inervações autonômicas entre o intestino e o cérebro e, além disto, ele encaminha fibras simpáticas e parassimpáticas para o trato gastrointestinal (BROWNING; TRAVAGLI, 2014; FOSTER; RINAMAN; CRYAN, 2017). O eixo HPA prepara fisiologicamente o organismo para uma situação de estresse, e entre várias funções, ele influencia o trato gastrointestinal, afetando a permeabilidade e inflamação intestinal (CZIMMER; MILLION; TACHÉ, 2006). No entanto, ativação excessiva deste eixo está relacionada à perturbação da microbiota (DE WEERTH, 2017) e alterações cerebrais (JACOBSON, 2014).

A microbiota, por sua vez, consegue auxiliar na regulação do eixo cérebro - intestino através do controle de citocinas inflamatórias (DESBONNET et al., 2008), sensibilização do nervo vago (BRAVO et al., 2011) e, através da produção ou regulação de compostos neuroendócrinos (BUROKAS et al., 2017). Consequentemente, a modificação da sinalização deste eixo está ligada a doenças metabólicas (GRASSET et al., 2017), bem como a transtornos neuropsiquiátricos (CRYAN; O'MAHONY, 2011; GRENHAM et al., 2011).

A disbiose é definida amplamente como uma modificação na composição das comunidades microbianas residentes, que é acompanhada por menor diversidade microbiana e aumento de microrganismos patogênicos em relação à microbiota de indivíduos saudáveis (PETERSEN; ROUND, 2014). Diversos estudos evidenciaram modificações da estrutura da microbiota intestinal tanto de humanos como de

camundongos com doenças inflamatórias, como a colite ulcerativa (AAS; GESSERT; BAKKEN, 2003), diabetes (KARLSSON et al., 2013), asma (ABRAHAMSSON et al., 2014), e em doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla, a doença de Alzheimer (QUIGLEY, 2017) e a Doença de Parkinson (HASEGAWA et al., 2015).

Em análises da composição da microbiota intestinal em pacientes com DP foram encontradas alterações no conteúdo de 9 gêneros e 15 espécies de microrganismos, cujo padrão microbiológico pode desencadear inflamação local seguida pela agregação de α -sin e geração de corpos de Lewy (PETROV et al., 2017). Outros estudos detectaram mudanças na microbiota de pacientes com DP, como baixos níveis de *Prevotella*, *Faecalibacterium prausnitzii* e cluster Clostridial IV (UNGER et al., 2016; HASEGAWA et al., 2015; SCHEPERJANS et al., 2015; KESHAVERZIAN et al., 2015). **(Figura 6).**

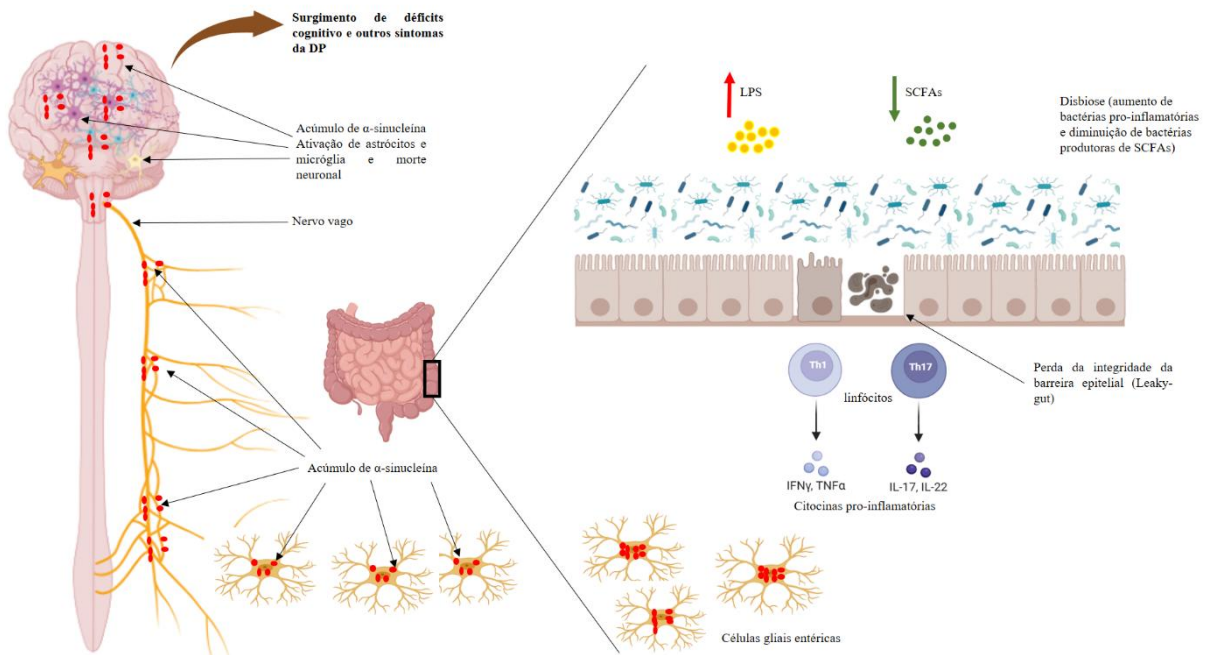
De forma similar, em modelos experimentais de DP foram encontradas alterações na composição da microbiota do intestino delgado e cólon de ratos tratados com rotenona, uma neurotoxina que induz alterações semelhantes às descritas em pacientes com DP (PEREZ-PARDO et al., 2018). A disbiose induzida por rotenona pode perturbar a integridade epitelial, levando à aumento da permeabilidade intestinal, ativação imune inata e, inflamação sistêmica (CARICILLI et al., 2014; IVANOV; HONDA, 2012; NISHIO; HONDA, 2012). Além disso, a alteração da relação entre os filos Firmicutes/Bacteroidetes pode impedir que a barreira imunológica no intestino funcione adequadamente, o que se correlaciona diretamente com a neuroinflamação e a perda de células dopaminérgicas no SNC. Isso sugere que a resposta do SNC no modelo de DP em camundongos pode ser regulada por bactérias pró-inflamatórias específicas.

Recentemente, Bhattarai e cols (2020) demonstraram a importância da presença da microbiota intestinal para a indução da disfunção motora no modelo de Parkinson induzido por rotenona. A administração crônica de rotenona resultou em uma quebra da permeabilidade intestinal e desenvolvimento de sintomas motores em camundongos Swiss webster. Entretanto, o mesmo tratamento em camundongos germ-free, apesar de induzir perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra, não foi capaz de aumentar a permeabilidade intestinal e de induzir a disfunção motora característica da DP. Esses resultados destacam o papel potencial da microbiota intestinal na disfunção da permeabilidade intestinal e produção de déficits motores na DP (BHATTARAI et al., 2021).

A disbiose parece ser um dos estímulos para o início da patologia intestinal presente na DP (PEREZ-PARDO et al., 2019). O aumento de bactérias que promovem inflamação intestinal e, a consequente diminuição de bactérias produtoras de metabólitos benéficos como os ácidos graxos de cadeia curta, promovem inflamação pelo aumento da secreção de toxinas bacterianas como lipopolissacarídeos (LPS), esta molécula causa ativação de células apresentadores de antígeno e linfócitos Th-17, que por sua vez, produzem citocinas pro-inflamatória. Este ambiente inflamatório leva ao dano tecidual no epitélio intestinal, um fenômeno conhecido como “Leaky Gut”. As citocinas também causam o acúmulo de α -sinucleína em células da glia entérica, as quais podem transmitir, de forma semelhante a príons, oligômeros de α -sinucleína para fibras no nervo vago, que atingem o cérebro. No cérebro, a α -sin ativa células da glia, tais como micróglia e astrócitos, e consequentemente, levando a morte neuronal (PEREZ-PARDO et al., 2017) **(Figura 7)**.

Interessantemente, em um modelo de indução de PD através da administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em ratos, a administração crônica por quatro semanas de *Clostridium butyralis* melhorou déficits motores, perda de neurônios dopaminérgicos, disfunção sináptica e ativação da microglia. Além disso, o tratamento com *Clostridium butyralis* reverteu a disbiose da microbiota intestinal, além de restaurar os níveis do receptor para o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) intestinal e cerebral, e de receptores de butirato – Receptores acoplados à proteína G 41 (GPR41) e Receptores acoplados à proteína G 43 (GPR43) - no cólon. Esses achados indicaram que o mecanismo neuroprotetor de *Clostridium butyralis* na DP pode estar relacionado à melhora do eixo microbiota-intestino-cérebro (SUN et al., 2021).

Figura 7 - Resumo esquemático: como a disbiose contribui para a patologia da DP.



Fonte: MENDONÇA, 2025

3.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: PARADIGMA DA ROTENONA

Entender os mecanismos subjacentes à DP e desenvolver estratégias de tratamento eficazes depende muito do uso de modelos experimentais que imitam as características da doença em humanos. Vários modelos experimentais foram desenvolvidos para estudar a DP, cada um com suas próprias vantagens e limitações (BEZARD et al., 2012).

Um modelo experimental de DP comumente usado é o modelo induzido por toxina, onde compostos como MPTP ou rotenona são administrados a animais para induzir neurodegeneração semelhante à observada em pacientes com DP (BETARBET et al., 2000). Esses modelos ajudam os pesquisadores a estudar os efeitos de toxinas específicas no cérebro e a identificar potenciais tratamentos neuroprotetores. No entanto, esses modelos não capturam totalmente a complexidade

da DP, pois a doença envolve múltiplos processos patológicos, os quais já foram descritos neste referencial teórico, além da simples exposição à toxina.

Outro modelo experimental de DP envolve manipulação genética, onde os animais são geneticamente modificados para expressar mutações associadas à DP em humanos (LEE et al., 2012). Esses modelos permitem que os pesquisadores estudem o papel de genes específicos na progressão da doença e testem potenciais abordagens de terapia genética. Embora os modelos genéticos forneçam *insights* valiosos sobre os fatores genéticos que contribuem para a DP, eles podem não replicar totalmente a natureza progressiva da doença observada em humanos.

Nos últimos anos, modelos baseados em células-tronco surgiram como uma ferramenta promissora para estudar a DP. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) derivadas de pacientes com DP podem ser diferenciadas em neurônios dopaminérgicos, as células afetadas principalmente na DP, permitindo que os pesquisadores investiguem os mecanismos da doença em um contexto específico do paciente (KRIKS et al., 2011; STODDARD-BENNETT et al., 2019; KIM et al., 2023). Esses modelos podem ajudar a identificar novos biomarcadores, rastrear potenciais candidatos a medicamentos e personalizar estratégias de tratamento para indivíduos com DP.

A respeito do modelo utilizado nesta tese, a rotenona, o mecanismo de ação da desta neurotoxina no modelo animal da doença de Parkinson é um tópico de interesse significativo no campo de distúrbios neurodegenerativos. A rotenona é um pesticida natural que tem sido amplamente usado para induzir sintomas semelhantes aos da DP em modelos animais devido à sua capacidade de inibir a atividade do complexo mitocondrial I (SHERER et al., 2003). Essa inibição leva a uma diminuição na produção de ATP, aumento da produção de EROs e, finalmente, degeneração neuronal. Um dos principais mecanismos pelos quais a rotenona exerce seus efeitos neurotóxicos é por meio da geração de estresse oxidativo. A inibição induzida pela rotenona do complexo mitocondrial I resulta no vazamento de elétrons, levando à formação de EROs, como radicais superóxido (PIRUNKASET et al., 2024; GOSWAMI et al., 2016). Esses EROs podem causar danos aos componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA, levando, finalmente, à morte celular neuronal (GOSWAMI et al., 2016).

Estudos têm mostrado que o tratamento com rotenona leva à fragmentação mitocondrial, mitofagia prejudicada e alterações no potencial da membrana

mitocondrial, os quais contribuem para a disfunção neuronal e morte (ILIEVA et al, 2024; ARNOLD et al, 2011). Além disso, a rotenona demonstrou ativar a microglia e induzir neuroinflamação, exacerbando ainda mais o processo neurodegenerativo no modelo animal da doença de Parkinson (GUO et al., 2022).

Em suma, a rotenona exerce seus efeitos neurotóxicos no modelo animal da doença de Parkinson por meio de múltiplos mecanismos, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação. Entender os mecanismos detalhados pelos quais a rotenona induz sintomas semelhantes aos parkinsonianos é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater essa doença debilitante.

3.5 TRATAMENTO E MANEJO DA DOENÇA DE PARKINSON

Um dos pilares do tratamento para a DP é a farmacoterapia. Agonistas da dopamina, como levodopa e carbidopa, são comumente usados para aumentar os níveis de dopamina no cérebro e reduzir os sintomas motores. Esses medicamentos podem ajudar a reduzir tremores, rigidez e lentidão de movimento, permitindo que indivíduos com DP controlem melhor seus movimentos e realizem atividades diárias (CONNOLLY et al., 2014).

A levodopa é um aminoácido natural que serve como precursor da dopamina, um neurotransmissor envolvido na regulação do movimento e da coordenação no cérebro (NUTT et al, 1996; CONNOLLY et al., 2014). Como já discutido anteriormente, na DP há uma perda progressiva de neurônios produtores de dopamina na substância negra, levando a uma depleção dos níveis de dopamina no cérebro. Ao suplementar o cérebro com levodopa, os pacientes podem aumentar os níveis de dopamina e compensar a perda de neurônios dopaminérgicos.

Uma vez que a levodopa é administrada, ela atravessa a barreira hematoencefálica e é convertida em dopamina pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC) nos neurônios dopaminérgicos no cérebro (NOWAK et al., 2006). Este processo de conversão é crucial para restaurar os níveis de dopamina no cérebro e aliviar os sintomas motores associados à DP. No entanto, um desafio significativo no tratamento da DP com levodopa é o desenvolvimento de complicações motoras, como discinesias e flutuações em resposta à medicação (FABBRINI et al.,

2007).

Uma das razões para o desenvolvimento de complicações motoras com o uso prolongado de levodopa é a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos no cérebro, levando a uma capacidade reduzida de converter levodopa em dopamina. Isso resulta em flutuações nos níveis de dopamina, fazendo com que os sintomas motores ressurgam de forma imprevisível (CONTIN; MARTINELLI, 2010; NUTT, 2008). Para resolver esse problema, os médicos podem ajustar a dosagem e o momento da administração de levodopa para otimizar o controle dos sintomas, minimizando os efeitos colaterais.

Outro fator que contribui para o desenvolvimento de complicações motoras é a conversão de levodopa em dopamina fora do estriado, uma região cerebral essencial envolvida no controle motor. Essa produção extraestriatal de dopamina pode levar a níveis excessivos de dopamina em outras regiões cerebrais, contribuindo para discinesias e outros efeitos colaterais (DE DEURWAERDÈRE et al., 2017).

Além da medicação, a fisioterapia também pode desempenhar um papel crucial no tratamento da DP (RADDER et al., 2020). A fisioterapia se concentra em melhorar a mobilidade, o equilíbrio e as habilidades funcionais gerais por meio de exercícios e técnicas adaptadas às necessidades específicas do indivíduo. Pode ajudar indivíduos com DP a manter sua independência, prevenir quedas e melhorar sua qualidade de vida. Além disso, exercícios regulares, como exercícios aeróbicos, treinamento de força e alongamento, podem ajudar a melhorar a força muscular, flexibilidade e aptidão cardiovascular em indivíduos com DP (CAPECCI et al., 2019; SACHELI et al., 2019).

Além dos tratamentos convencionais, terapias complementares como acupuntura, massagem e ioga também foram exploradas como opções potenciais para o gerenciamento dos sintomas da DP (DEUEL et al., 2020; MACHADO et al., 2021). Embora as evidências da eficácia dessas terapias sejam limitadas, alguns indivíduos com DP podem encontrar alívio para seus sintomas por meio dessas abordagens alternativas.

Embora não haja cura para a DP, várias opções de tratamento estão disponíveis para ajudar a controlar seus sintomas e melhorar a qualidade de vida de indivíduos com a doença. No entanto, nenhuma das terapias disponíveis tem como alvo a modulação de microbiota intestinal nem as alterações periféricas que podem iniciar e/ou contribuir com a progressão da fisiopatologia da doença.

3.6 O POTENCIAL DAS ABORDAGENS NUTRACÊUTICAS PARA A DOENÇA DE PARKINSON: PREBIÓTICOS

Prebióticos são definidos como substâncias seletivamente fermentadas que promovem mudanças na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro, restaurando a diversidade e a atividade de microorganismos intestinais (VALCHEVA; DIELEMAN, 2016). Os prebióticos incluem carboidratos complexos, tais como fibra psyllium, lactulose, FOS e GOS, extratos germinados de cevada e inulina. A suplementação com prebióticos modula a microbiota intestinal reduzindo a massa gorda, o tamanho dos adipócitos e a expressão de GPR41, GPR43 no tecido adiposo subcutâneo, bem como de genes alvo de PPAR γ (AGUIRRE; VENEMA, 2015).

A fermentação de FOS e GOS por bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* diminui o pH do cólon, desfavorecendo o crescimento de bactérias patogênicas (ARBOLEYA et al., 2016; ORRHAGE; NORD, 2000). No geral, esses prebióticos mostraram ter efeitos positivos no sistema gastrointestinal, bem como no sistema imunológico, metabolismo ósseo e lipídico (SAVIGNAC et al., 2016; SOLEIMANI et al., 2012; VULEVIC et al., 2015; WEAVER et al., 2011).

Através da fermentação de FOS e GOS são produzidos importantes metabólitos tais como os AGCCS (ROBERFROID et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que o tratamento com AGCCS podem resgatar a função microglial prejudicada em animais Germ-Free (GF) (ERNY et al., 2015). Foi sugerido que os AGCCS resultantes da fermentação de fibra alimentar podem ter efeitos epigenéticos neuromoduladores por meio da acetilação de histonas e melhorar as funções cognitivas para doenças neurodegenerativas (STILLING, DINAN, CRYAN, 2014). Esses oligossacarídeos exercem efeitos ansiolíticos e antidepressivos em modelo animal, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, a secreção de glicocorticóides, e expressão gênica de receptores para glicocorticóides no hipocampo. Além disso, os AGCCS aumentam a expressão de BDNF, a sinalização de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e de GABA no hipocampo e no hipotálamo (BUROKAS et al., 2017; SAVIGNAC et al., 2013), portanto, esses prebióticos parecem desempenhar um papel anti-inflamatório e neuroprotetor do SNC.

Como já mostrado, existe uma conexão entre o intestino e o cérebro mediante

as vias neurais, endócrinas e imunológicas, e que, portanto, a regulação da microbiota alterada, através de intervenções não farmacológicas como estratégia para reduzir a inflamação, pode auxiliar na prevenção e no tratamento da DP. Desta forma, o presente projeto tem o aspecto inovador de propor um estudo sobre os efeitos de prebióticos sobre a microbiota intestinal e as vias de sinalização da neuroinflamação em modelo animal de DP, o que pode resultar em potencial estratégia terapêutica coadjuvante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigo(s).

4.1 ARTIGO 1 - **Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) atenuam comportamento depressivo em um modelo murino de doença de Parkinson através da modulação do eixo Microbiota-Intestino-Cérebro**

Ingrid Prata de Mendonça^{1,2*}, Rodrigo Soares da Silva^{1,2}, Igor Henrique Rodrigues de Paiva^{1,2}, Belmira Lara da S. A. Costa³, Karla Patrícia Barbosa Teixeira⁴, José Roberto Botelho de Souza⁵, Christina Alves Peixoto^{1,6*}.

¹Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), PE, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

³Laboratório de Neurofisiologia - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁵Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁶Instituto de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM), Brasil.

* Autor correspondente: Christina Alves Peixoto, Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-420. Número de telefone: (55) 81 21012557. E-mail: christina.peixoto@fiocruz.br

Ingrid Prata Mendonça, Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-420. Tel number: (55) 81 21012557. E-mail: ingrid.pmendonca2@ufpe.br.

Resumo

A doença de Parkinson (DP) continua sendo uma doença desafiadora quanto ao seu tratamento, que geralmente é polifarmacológico. Além dos sintomas motores, sintomas não motores, como depressão, estão presentes em aproximadamente 40% dos pacientes, contribuindo para a perda da qualidade de vida. Nas últimas duas décadas, um crescente corpo de evidências tem surgido respeito do envolvimento do eixo microbiota-intestino-cérebro tanto na DP quanto na depressão. Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) são fibras prebióticas que são fermentadas por bactérias da microbiota intestinal, que por sua vez produzem metabólitos chamados ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Estudos indicam que tais metabólitos contribuem para uma melhora nas condições neurodegenerativas e psiquiátricas. Este estudo analisou os efeitos da administração oral de FOS e GOS em camundongos com DP induzida por rotenona. Os resultados demonstraram a capacidade dos prebióticos de melhorar o déficit motor e o comportamento tipo-depressivo em camundongos. Além disso, o tratamento com FOS e GOS levou a um aumento nas bactérias produtoras de AGCCs no intestino e reduziu o acúmulo de alfa-sinucleína no intestino e na Substância negra. Além disso, os prebióticos aumentaram os níveis de ocludina intestinal e GPR43, indicando redução da permeabilidade intestinal e redução de p-NFkB e IL1- β . FOS e GOS atenuaram a perda de neurônios dopaminérgicos e reduziram a neuroinflamação ao diminuir os níveis de IBA-1, GFAP, iNOS, p-NFkB e IL1- β na Substância negra e no córtex pré-frontal. Além disso, esses prebióticos melhoraram a neuroplasticidade ao aumentar a serotonina cerebral e o transportador de serotonina, BDNF, p-CREB e proteína sináptica PSD-95 no córtex pré-frontal. Em conclusão, FOS e GOS mostraram resultados promissores como um novo agente terapêutico para DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, eixo cérebro-intestino, microbiota intestinal, prebióticos, depressão, neuroinflamação.

Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia crônica do sistema nervoso central (SNC) que afeta aproximadamente 1% da população mundial com mais de 65 anos de idade e é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo (Ascherio e Schwarzschild 2016). A DP também é conhecida como paralisia agitante e resulta principalmente da destruição progressiva de neurônios na substância negra pars compacta (SNpc), que envia fibras nervosas secretoras de dopamina (DA) para os núcleos basais do estriado: caudado e putâmen (Tysnes e Storstein 2017).

A etiologia da DP tem sido objeto de intensa investigação e há muito tempo permanece obscura. Atualmente, estudos sugerem que, além de fatores genéticos, a exposição a toxinas ambientais e condições como diabetes mellitus e obesidade podem aumentar o risco de desenvolver DP, que, devido à resistência à insulina no cérebro, pode comprometer a via de sinalização da dopamina (Brudek 2019; Fiory et al. 2019).

Clinicamente, a DP é caracterizada por (1) sintomas motores, como rigidez de grande parte dos músculos do corpo, dificuldade intensa em iniciar movimentos, conhecida como bradicinesia, instabilidade postural, levando ao desequilíbrio e quedas frequentes, e tremores nas extremidades, mesmo quando a pessoa está em repouso; e (2) sintomas não motores, como disfunção gastrointestinal, depressão, distúrbios do sono e déficit cognitivo (Guyton e Hall, FISIOLOGIA MÉDICA, 12ª edição)

A depressão é o principal sintoma não motor do Sistema Nervoso Central (SNC) e afeta aproximadamente 30-40% dos pacientes com DP. Entre os pacientes tratados para depressão, metade permanecem deprimidos, sugerindo ineficácia do tratamento (Frisina et al. 2009; Bhattacharjee et al. 2018).

Além do SNC, estudos sugerem que o Sistema Nervoso Periférico (SNP) e o Sistema Nervoso Entérico (SNE) também podem estar envolvidos no processo neurodegenerativo subjacente à DP. A disfunção gastrointestinal (GI) é um dos sintomas não motores mais comuns que afetam aproximadamente 80% dos pacientes e pode ocorrer em qualquer estágio da DP, incluindo antes do diagnóstico (Johnson et al. 2018; Zhang et al. 2023). De acordo com a hipótese de Braak, a patologia da

DP, incluindo o microambiente inflamatório e o acúmulo de α -sinucleína tóxica, pode ocorrer no intestino décadas antes do início dos sintomas motores e, posteriormente, alcançar o cérebro por meio da comunicação do eixo intestino-cérebro (Braak e Del Tredici 2017; Kessel, S. P. v., El Aidy 2019).

As bactérias pertencentes à microbiota intestinal desempenham funções essenciais para a manutenção da saúde do indivíduo; no entanto, modificações na estrutura da microbiota intestinal (disbiose) estão implicadas em várias doenças inflamatórias, como colite ulcerativa (Aas et al. 2003), diabetes (Karlsson et al. 2013), asma (Abrahamsson et al. 2014) e doenças neurodegenerativas, como esclerose múltipla, doença de Alzheimer (Quigley 2017) e DP (Hasegawa et al. 2015; Hirayama e Ohno 2021). A disbiose já é relacionada a sintomas tanto em pacientes com DP (Hill-Burns et al. 2017; Lin et al. 2018; Aho et al. 2019) quanto em modelos experimentais (Sampson et al. 2016).

Nos últimos anos, algumas intervenções terapêuticas para modular a microbiota intestinal tem sido propostas. Os agentes moduladores da microbiota intestinal incluem probióticos, prebióticos, simbióticos e até transplante de microbiota fecal. Cada uma dessas abordagens possuem vantagens e desvantagens, mas todas mostram potencial significativo para melhorar os sintomas da DP em pacientes e modelos animais (Gazerani 2019; Peterson 2020; Zhao et al. 2021).

Prebióticos são carboidratos não digeríveis por células humanas, mas são fermentados por vários grupos de bactérias pertencentes a microbiota intestinal. A fermentação desses carboidratos produz metabólitos chamados ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). No intestino humano, acetato, propionato e butirato representam aproximadamente 95% de todos os AGCCs (Ríos-Covián et al. 2016). Os AGCCs desempenham papéis fisiológicos importantes, como manter a integridade da barreira epitelial intestinal, regulação imunológica e fornecer energia para colonócitos, entre outros (Tan et al. 2014). O tratamento com prebióticos aumenta a abundância de bactérias produtoras de AGCC (Silva et al. 2023; de Paiva et al. 2023).

Os prebióticos Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) são fibras dietéticas que promovem o crescimento de bactérias benéficas (Burokas et al. 2017; de Paiva et al. 2023). Nós hipotetizamos que os prebióticos podem restaurar a microbiota intestinal e atenuar a neuroinflamação, melhorando assim o comportamento depressivo associado à DP em camundongos C57BL6. Para investigar isso mais a fundo, conduzimos um estudo abrangente usando

camundongos C57BL6 induzidos por rotenona, um modelo já estabelecido de DP, para analisar o impacto do tratamento com FOS e GOS no comportamento tipo-depressivo e investigar os mecanismos subjacentes.

Materiais e métodos

• Animais

Camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6 foram obtidos do biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ) na sétima semana de idade. Os animais foram aclimatados à temperatura de 18-22°C em microisoladores contendo 4 animais cada, por uma semana. O delineamento experimental deste estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do IAM pelo protocolo número 169/2021.

• Desenho experimental

Quarenta animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 10/grupo):

1. CONTROLE - animais submetidos à solução veículo por via subcutânea e oral
2. DP - animais induzidos com rotenona por via subcutânea
3. DP + PREBIÓTICOS - animais induzidos com rotenona por via subcutânea e FOS +GOS por via oral
4. DP + FLUOXETINA - animais induzidos com rotenona por via subcutânea e fluoxetina por via oral

A rotenona foi diluída em uma solução veículo contendo 98% de óleo de girassol + 2% de DMSO e administrada por via subcutânea na concentração de 2,5 mg/kg/dia. FOS e GOS foram diluídos em água estéril e administrados por via oral (gavagem) nas concentrações de 3 g/kg/dia e 4 g/kg/dia, respectivamente. Rotenona, e FOS + GOS foram administrados simultaneamente por 20 dias consecutivos. A fluoxetina foi usada em um grupo de animais como um medicamento antidepressivo padrão, diluída em água estéril e administrada na concentração de 10 mg/kg/dia simultaneamente com rotenona por 20 dias consecutivos. Todos os grupos foram

submetidos ao teste Rotarod, teste de campo aberto (avaliação de disfunção motora), teste de suspensão da cauda e teste de preferência por sacarose (avaliação de comportamento do tipo-depressivo).

- **Teste Rotarod**

O teste da barra rotatória, ou Rotarod, representa uma das principais e mais antigas abordagens para caracterizar disfunções motoras em modelos animais. É um teste que avalia a coordenação motora e o equilíbrio do animal pela sua capacidade de permanecer na haste cilíndrica que se move rotacionalmente a uma velocidade constante ou acelerada por um determinado período. O protocolo utilizado neste estudo foi baseado no trabalho de Liu et al. (2015), com algumas adaptações. O aparelho é composto por quatro divisores de animais e uma barra cilíndrica. Os animais foram inicialmente habituados à barra rotativa por 5 min no dia anterior ao teste a uma velocidade crescente. No 21º dia, os animais foram habituados por 60 min na sala de testes. Eles foram colocados na haste rotativa, e o protocolo foi realizado no modo acelerado dos níveis de velocidade do aparelho (5 a 37 rpm). Os animais permaneceram na haste por um período máximo de 300s, durante o qual a latência para queda foi registrada, o que refletiu o nível de comprometimento motor do animal (Liu et al. 2015).

- **Teste de campo aberto**

O teste de campo aberto também representa uma avaliação motora do animal. Este teste consiste em uma caixa quadrada (45 cm x 45 cm) com paredes de 40 cm de altura que impedem o animal de escapar. O piso das caixas foi marcado com uma grade de linhas (separadas por 9 cm), e os camundongos foram colocados individualmente em um dos cantos do campo. O número de linhas cruzadas durante uma sessão de teste de 5 minutos foi registrado e contado como a distância total percorrida pelo animal (Liu et al. 2015). O teste de campo aberto também foi realizado no 21º dia do experimento.

• Teste de Preferência por Sacarose

No 18º dia, os animais foram apresentados a duas garrafas de água em lados opostos da gaiola, uma contendo apenas água e a outra contendo uma solução de sacarose a 2%, por um período de habituação de 24 horas. Após esse período, os animais foram separados individualmente e novamente abastecidos com duas garrafas previamente pesadas com a mesma distribuição por mais 24 horas. Durante esse período, as garrafas foram trocadas de lado uma vez para evitar a tendência do animal em direção a uma das garrafas. Ao final desse período, as garrafas foram pesadas novamente, e o consumo foi estabelecido como a diferença nos pesos das garrafas entre antes e depois do período de 24 horas (antes - depois). A porcentagem de consumo de sacarose foi calculada usando a equação: % de preferência por sacarose = consumo de sacarose x 100/consumo total. O consumo total foi definido como a soma do consumo de água e do consumo de sacarose.

• Teste de Suspensão da Cauda

O teste de suspensão pela cauda consiste em avaliar o comportamento “semelhante ao desespero”, que representa um endofenótipo de depressão induzida em animais. Neste teste, os animais são suspensos pelas caudas com fita adesiva em uma posição da qual não conseguem escapar ou se segurar em superfícies próximas; a ausência de comportamento relacionado à fuga é considerada imobilidade (Can et al. 2012). Adotamos o protocolo de Can e colaboradores (2012) com modificações, no qual os animais foram suspensos individualmente pelas caudas e acostumados àquela posição por um minuto, permanecendo na mesma posição por mais 5 minutos, nos quais o tempo de imobilidade foi registrado pelo operador a 1 m de distância. Após esse período total de 6 minutos, os animais foram devolvidos às suas respectivas caixas. O teste de suspensão pela cauda foi realizado no 21º dia.

• Ensaio de Permeabilidade Intestinal por FITC-DEXTRAN

A avaliação da permeabilidade intestinal *in vivo* foi realizada usando fluoresceína isotiocianato-dextran ou FITC-dextran 4 (FD4; Sigma–Aldrich). Após

jejum por 4 h, os camundongos (n=3/grupo) receberam administração oral de FD4 (0,6 mg/g de peso corporal). Os camundongos foram sacrificados após 4 h, e a intensidade da fluorescência sérica foi avaliada usando um espectrofotômetro de fluorescência com comprimento de onda de 485/525 nm (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader). As concentrações de FD4 foram determinadas em amostras de soro duplicadas usando uma curva padrão gerada pela diluição serial da de FD4 em PBS.

• Imunofluorescência

Amostras congeladas de seções de intestino (3 animais por grupo) foram incubadas com anticorpos primários: ocludina (Santa Cruz, 1:200) e GPR43 (anticorpos Bioss, bs13536R, 1:50) em tampão de diluição de anticorpos (1×PBS/1% BSA/0,3% Triton X-100).

Seções de substância negra (3 animais por grupo) foram incubadas para dupla marcação com os anticorpos primários anti-tirosina hidroxilase (Invitrogen OPA1-0405, 1:500), p-CREB (Cell Signaling, #9198, diluição 1:500), BDNF (Alomone Labs, ANT-010, diluição 1:300), IBA-1 (Wako, 019-19741, diluição 1:500) e GFAP (Invitrogen, 130300, diluição 1:1000). Posteriormente, as lâminas foram deixadas a 4°C sob agitação constante e suave, durante a noite. Após aproximadamente 16 h, os anticorpos primários foram removidos, as seções foram lavadas com solução TBS-T 1X e então incubadas com anticorpo secundário conjugado fluor 488 anti-coelho (Invitrogen A11008, diluição 1:100) e anticorpo secundário conjugado fluor 546 anti-camundongo (Invitrogen A11003, 1:100) por 1 h em temperatura ambiente e, subsequentemente, incubadas com 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, 1:200) por 5 minutos no escuro. As fatias foram lavadas, montadas em ProLong Gold Antifade (Invitrogen™ P36930), observadas sob um microscópio de fluorescência Leica DMI8 system e processadas com o software Leica Application Suite LAS (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As figuras foram exportadas como arquivos tiff com o Adobe Photoshop versão 8. A imunorreatividade da proteína foi quantificada em 4 imagens para cada camundongo (3 camundongos x 4 imagens = 12 imagens por grupo). A contagem de corpos celulares e a densidade de pixels foram quantificadas usando o programa Gimp 2.10.18 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX).

• Quantificação de serotonina no cérebro por ELISA

Os níveis de serotonina no sobrenadante cerebral (n = 3 cérebros) foram avaliados por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) usando kits comerciais específicos, seguindo as recomendações do fabricante (Elabscience® E-EL-0033) em duplicata.

• Western blot

A substância negra, o córtex pré-frontal e o cólon foram dissecados e homogeneizados em uma solução de extração contendo coquetel inibidor de protease (10 mM EDTA, Amresco, Solon, EUA; 2 mM fenilmetano sulfonil fluoreto, 100 mM NaF, 10 mM pirofosfato de sódio, 10 mM NaVO₄, 10 µg de aprotinina / mL e 100 mM Tris, pH 7,4 - Sigma - Aldrich). As amostras (10 animais/por grupo) foram misturadas e homogeneizadas para formar um pool para cada grupo. Os homogeneizados foram centrifugados e congelados a -80°C. As proteínas (30 µg/µL) foram separadas em poli(acrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS) por eletroforese em gel sob condições reduzidas e foram então transferidas para a membrana de nitrocelulose (THERMO SCIENTIFIC 88018) por géis pré-moldados Mini-PROTEAN® (BIO-RAD 1658004). Após, as membranas foram bloqueadas com 3% de BSA e incubadas overnight com os seguintes anticorpos diluídos em solução de bloqueio (1,5% de BSA, 0,02% de Tris fosfato tamponado e 0,01% de Tween):

a) Substância negra e córtex pré-frontal: tirosina hidroxilase (Merck AB152, 1:500), α -sinucleína (Santa Cruz, 1:1000), IBA-1 (Wako 016-200001, 1:500), fosfo- α sinucleína (Abcam, ab51253), anti IL-1 β (Genway GWP-BPB232, 1:1000), anti-p-NFkB (Abcam, ab97726, 1:1000), p-CREB (Sinalização celular #9198, 1:1000), anti-iNOS (BD 610600, 1:1000) e BDNF (Alomone ANT-10, 1.500), PSD-95 (Alomone #APZ-009, 1:500) e transportador de serotonina, SERT (Alomone labs AMT004, 1:200).

b) Cólon: ocludina (santa cruz sc-133256, 1:50); fosfo- α sinucleína (Abcam ab51253, 1:500); fosfo-NFkB (sinalização celular #3003, 1:1000); IL-1 β (abcan ab9722, 1:1000) e β actina (abcan ab8227).

Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-coelho conjugado com peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich A9169, 1:8000) e anti-camundongo

conjugado com peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich A0161, 1:5000). Um reagente de quimioluminescência (Super Signal, Pierce, Ref. 34.080) foi usado para tornar as bandas de proteína marcadas visíveis no sistema iBright CL 1000 (Thermo Fisher Scientific, A44241). Mais tarde, os anticorpos previamente aderidos à membrana foram retirados, e as membranas foram reincubadas com o anticorpo monoclonal anti- β -actina (Sigma-Aldrich A2228, 1:5000) como um controle de corrida. A densitometria nas bandas de proteínas foi analisada usando o software Image J 1.38 (NIH, MD, EUA). Os resultados foram confirmados por três repetições diferentes para cada proteína investigada, e análises estatísticas foram realizadas utilizando os valores obtidos.

• Análise da microbiota intestinal baseada no sequenciamento do gene codificador do rRNA 16S

Após a eutanásia, amostras fecais (6 camundongos/grupo) foram coletadas e imediatamente colocadas a 4°C e posteriormente armazenadas a -80°C. Para o sequenciamento genômico, o DNA foi extraído usando esferas magnéticas. A preparação da biblioteca de DNA para identificação bacteriana foi preparada usando os primers para as regiões V3/V4 do gene rRNA 16S 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) e as amostras foram sequenciadas em um sistema MiSeq (Illumina, EUA), usando os primers Illumina padrão fornecidos pelo kit do fabricante. Os dados brutos do MiSeq foram processados usando um pipeline de propriedade da empresa Neopropecta. Os arquivos Illumina FASTQ tiveram os primers aparados e seu erro acumulado avaliado (Phred < 20). Além disso, os clusters com abundâncias menores que 2 foram removidos. As classificações taxonômicas foram alocadas usando um banco de dados de sequência precisa de 16S rRNA definido em um nível de identidade de 99% usando blastn v.2.6.0+. As tabelas de oligotipos resultantes, análogas às tabelas OTU tradicionais, foram usadas para calcular métricas de diversidade α usando R (versão 4.1.0) e o pacote Phyloseq. Os gráficos de abundância relativa foram feitos em R (versão 4.1.0).

• Análise estatística

A análise da diversidade da microbiota intestinal foi computada pela série de diversidade de Hill, onde $q = 0$ é a riqueza, $q = 1$ é a entropia de Shannon e $q = 2$ é o índice de Simpson recíproco. A diversidade beta foi analisada usando análise de coordenadas principais (PCoA) para avaliar diferenças em perfis taxonômicos entre grupos experimentais. A PCoA foi realizada em valores transformados de razão logarítmica usando Bray-curtis. As análises foram realizadas no ambiente R, pelo pacote vegan. Os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA one-way) seguida de pós-teste de Tukey ou testes de comparações múltiplas de Holm-Sidak. Os dados foram representados por média $\pm$ DP ou média $\pm$ intervalo de confiança, e valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

• Prebióticos melhoram o déficit motor induzido por rotenona

Animais induzidos por rotenona apresentaram déficits motores observados no teste rotarod e testes de campo aberto. No teste rotarod, o grupo DP apresentou menor tempo de latência para queda da plataforma cilíndrica giratória (CONTROLE vs DP, $p = 0,0009$), indicando menor capacidade de locomoção do que os camundongos do grupo CONTROLE. Por outro lado, camundongos tratados com FOS e GOS no grupo DP+PREB apresentaram maior tempo de latência do que o grupo DP (DP+PREB vs DP, $p = 0,0071$), indicando maior capacidade motora. A fluoxetina não conseguiu atenuar o déficit motor em animais do grupo DP+FLU (DP+FLU vs DP, $p = 0,45$).

Dois parâmetros foram avaliados no teste de campo aberto: 1. Número de levantamentos e 2. Número de cruzamentos. O número de levantamentos foi reduzido no grupo DP em comparação ao grupo CONTROLE (CONTROLE vs. DP, $p = 0,0002$), demonstrando uma perda no comportamento exploratório natural dos animais. O número de cruzamentos também foi reduzido nos animais do grupo DP em comparação ao grupo CONTROLE (CONTROLE vs. DP, $p = 0,0002$), indicando que

os animais também apresentaram dificuldade de locomoção. Entretanto, o tratamento com prebióticos aumentou o número de levantamentos (DP+PREB vs. DP, $p = 0,004$) e o número de cruzamentos (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0034$) no grupo DP+PREB em comparação ao grupo DP, indicando uma melhora no comportamento exploratório e atenuação da bradicinesia. O grupo de animais tratados com fluoxetina não apresentou melhora no número de levantamentos (DP+FLU vs DP, $p = 0,89$) ou no número de cruzamentos (DP+FLU vs DP, $p = 0,14$) (Figura 1).

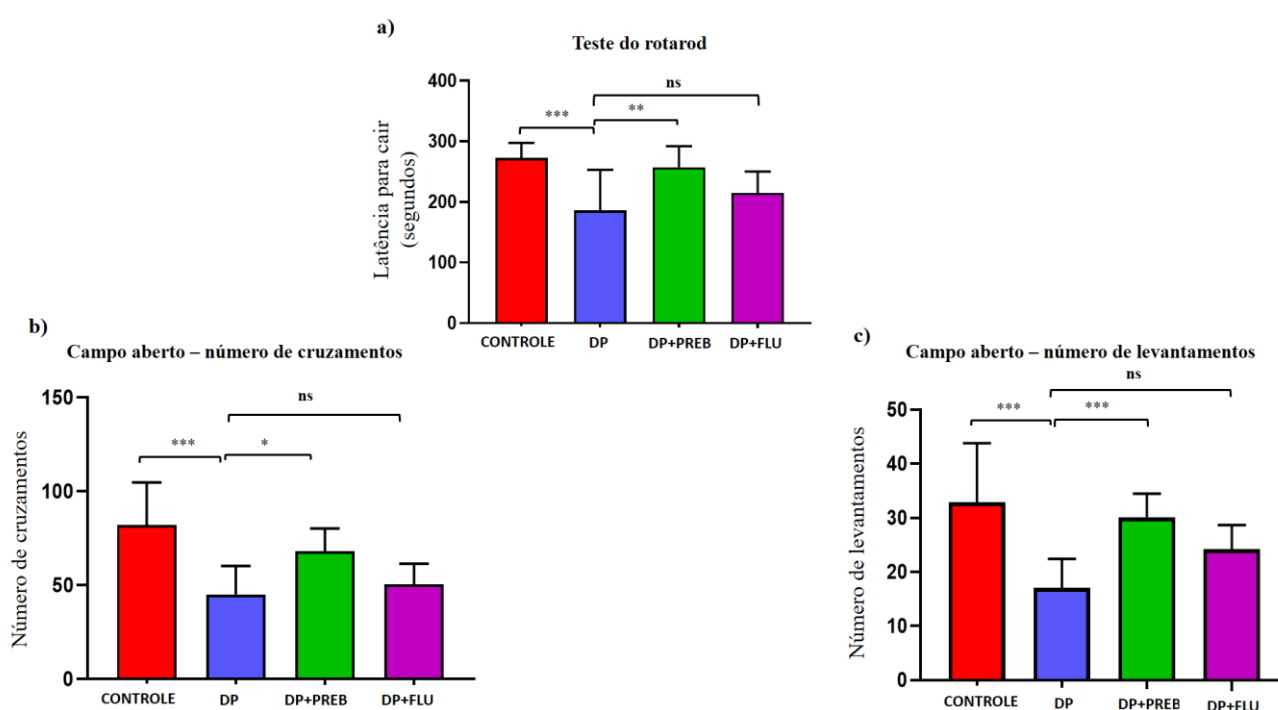


Fig. 1 a) Teste Rotarod (latência para queda): resultados expressos sob o parâmetro de latência para queda da plataforma cilíndrica giratória em segundos (s); (b) Teste de campo aberto (número de cruzamento): resultados expressos sob os parâmetros de movimentos de cruzamento; (c) Teste de campo aberto (número de empinar): resultados expressos sob os parâmetros de movimentos de empinar. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ($n = 10$ camundongos/grupo).

- **Prebióticos melhoram comportamento tipo-depressivo induzido por rotenona**

Os animais foram avaliados quanto ao comportamento depressivo por testes de suspensão da cauda e preferência por sacarose. Em relação ao teste de suspensão da cauda, os animais induzidos por rotenona apresentaram um tempo de imobilidade maior em comparação aos animais saudáveis (DP vs. CONTROLE, $p = 0,015$), indicando o desenvolvimento de comportamento de desespero (um endofenótipo de sintomas depressivos em animais). Em animais tratados com prebióticos, o tempo de imobilidade foi significativamente reduzido, indicando melhora dos sintomas depressivos (DP+PREB vs. DP, $p = 0,012$). Por outro lado, o grupo induzido por rotenona e tratado com fluoxetina não apresentou melhora significativa na imobilidade em comparação ao grupo induzido apenas por rotenona (DP+FLU vs. DP, $p = 0,98$). No teste de preferência por sacarose, os animais induzidos com rotenona apresentaram uma preferência por sacarose menor que 60%, enquanto os animais do grupo CONTROLE apresentaram uma preferência por sacarose acima de 80%. Essa menor preferência nos animais do grupo DP demonstra um comportamento anedônico (outro endofenótipo de depressão em animais) desses animais em comparação aos animais do grupo CONTROLE (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0002$). Nos animais tratados com prebióticos, a preferência pela sacarose foi significativamente maior em comparação ao grupo DP (DP+PREB vs. DP, $p = 0,015$), significando que o tratamento com prebióticos resultou na manutenção do comportamento natural e saudável do animal de preferir o líquido açucarado, com níveis de preferência semelhantes aos apresentados pelo grupo controle ($>95\%$). Como esperado, o tratamento dos animais doentes tratados com fluoxetina também mostrou uma melhora na preferência pela sacarose (DP+FLU vs. DP, $p = <0,0001$) (Figura 2).

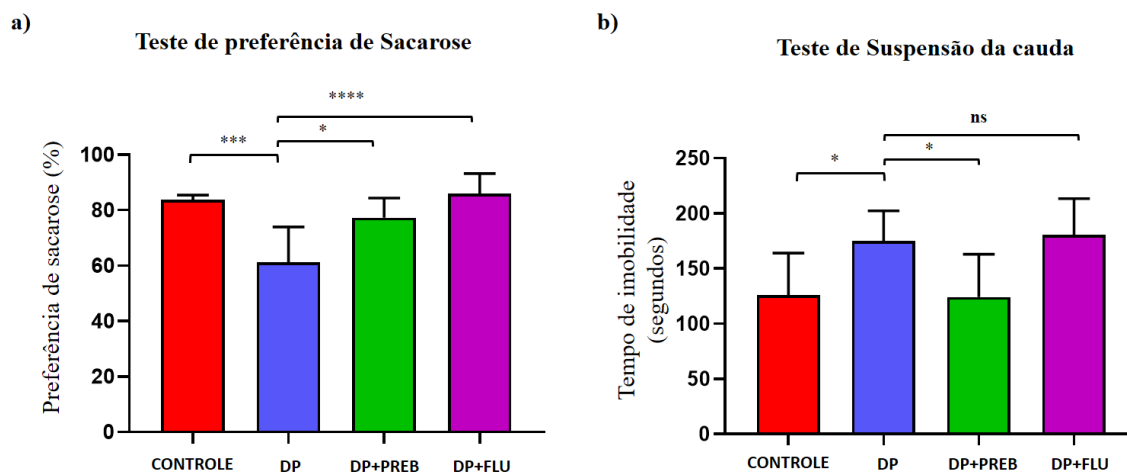


Fig. 2 (a) Teste de preferência por sacarose: resultados expressos sob o parâmetro da preferência do animal por água com sacarose em porcentagem (%); (b) Teste de suspensão da cauda: resultados expressos sob o parâmetro do tempo de imobilidade do animal deprimido em segundos (s). Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (n=10 camundongos/grupo)

A rotenona não causou comprometimento da integridade da barreira epitelial observada no ensaio de permeabilidade FITC-DEXTRAN

Na análise do isotiocianato de fluoresceína-DEXTRAN administrado por via oral, observou-se que não houve aumento dos níveis de dextrana no soro dos animais do grupo DP em relação ao controle (DP vs. CONTROLE, $p = 0,22$). O mesmo foi observado entre os grupos DP e DP+PREB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,95$) e DP+FLU (DP+FLU vs. DP, $p = 0,97$); não houve alteração dos níveis de dextrana no soro (Figura 3).

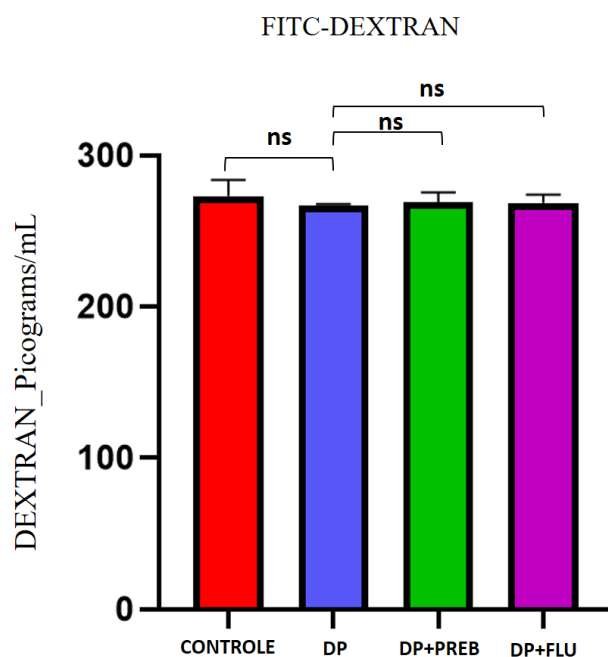


Fig. 3 Níveis de FITC-DEXTRAN no soro animal, resultados expressos em picogramas/mL. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. (n=3 camundongos/grupo). NS: não significativo.

- **Os prebióticos aumentam grupos de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta**

O DNA bacteriano presente nas fezes foi analisado por meio de análises de sequenciamento metagenômico. Os primeiros dados que podemos extrair do sequenciamento e identificação das bactérias estão relacionados à diversidade α e β das comunidades bacterianas. Embora haja uma clara tendência de diminuição da diversidade no grupo submetido à DP sem tratamento e aumento nos grupos tratados, quando observamos os índices de Richness e Simpsons, talvez o tamanho da amostra não tenha permitido um resultado estatisticamente significativo (Figuras 4a e 4b). A quantificação da abundância relativa dos filos Firmicutes e Bacteroidota, entre outros, mostrou alguma variação entre os grupos CONTROLE, DP+PREB e DP+FLU. Houve diminuição da abundância relativa dos filos Actinobacteria (DP vs. CONTROLE, $p = 0,01$) e Bacteroidota (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0069$) no grupo DP em comparação ao grupo controle. Em contraste, houve aumento dos filos Firmicutes (DP vs. CONTROLE, $p = 0,02$) e Proteobacteria (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0098$) no

grupo DP em comparação ao grupo controle. O tratamento prebiótico aumentou Actinobacteria (DP+PREB vs. PD, $p = 0,01$), mas não aumentou significativamente Bacteroidota (PD+PREB vs. PD, $p = 0,96$). Além disso, a fluoxetina aumentou Bacteroidota (PD+FLU vs. PD, $p = 0,014$) e Proteobacteria (PD+FLU vs. PD, $p = 0,028$), mas não aumentou Actinobacteria (PD+FLU vs. PD, $p = 0,75$) (Figura 5: a-e).

No grupo PD, houve uma diminuição na abundância relativa da família Bacteroidaceae (DP vs. CONTROLE, $p < 0,0001$). Por sua vez, o tratamento com prebióticos aumentou a abundância relativa de ambas as Bacteroidaceae (DP+PREB vs. DP, $p = 0,042$). A fluoxetina não alterou significativamente a abundância da família Bacteroidaceae (PD+FLU vs. PD, $p = 0,20$) (Figura 6).

Além disso, no grupo de animais induzidos com rotenona, houve também diminuição da abundância relativa do gênero Bacteroides (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0004$) e aumento dos gêneros Lactobacillus (DP vs. CONTROLE, $p = 0,018$) e Helicobacter (DP vs. CONTROLE, $p = 0,006$), em comparação ao grupo CONTROLE. Em contraste, os prebióticos aumentaram a abundância relativa de Bacteroides (DP+PREB vs. DP, $p = 0,03$) e diminuíram a dos gêneros Lactobacillus (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0008$) e Helicobacter (DP+PREB vs. DP, $p = 0,005$). Assim como os prebióticos, a fluoxetina também reduziu a abundância dos gêneros Lactobacillus (PD+FLU vs. PD, $p = 0,0011$) e Helicobacter (PD+FLU vs. PD, $p = 0,0072$), mas não alterou significativamente o gênero Bacteroides (PD+FLU vs. PD, $p = 0,30$) (Figura 7: a-d).

Finalmente, a indução com rotenona diminuiu a abundância relativa de Alistipes ssp (DP vs. CONTROLE, $p = 0,03$), Bacteroides acidifaciens (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0030$) e aumentou Helicobacter hepaticus (DP vs. CONTROLE, $p = 0,02$), Lactobacillus johnsonii (DP vs. CONTROLE, $p = 0,047$), Duncaniella dubosi (DP vs. CONTROLE, $p = 0,01$) e bactéria Muribaculaceae (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0003$), mas não alterou significativamente a abundância de Lactobacillus reuteri (DP vs. CONTROLE, $p = 0,9$). No entanto, o tratamento prebiótico aumentou significativamente Alistipes ssp (DP+PREB vs DP, $p = 0,007$), Lactobacillus reuteri (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0019$) e Candidatus saccharibacteria (DP+PREB vs DP, $p = 0,0006$). Diminuiu Helicobacter hepaticus (DP+PREB vs DP, $p = 0,01$), Lactobacillus johnsonii (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0019$), Duncaniella dubosii (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0007$) e bactéria Muribaculaceae (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0004$). A fluoxetina aumentou a abundância relativa de Alistipes sp. (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0013$) e

diminuiu *Helicobacter hepaticus* (DP+FLU vs. DP, $p = 0,019$), *Lactobacillus johnsonii* (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0081$), *Duncaniella dubosii* (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0005$) e bactéria Muribaculaceae (DP+FLU vs. DP, $p = 0,02$), mas não afetou *Bacteroides acidifaciens* (DP+FLU vs. DP, $p = 0,94$), *Lactobacillus reuteri* (DP+FLU vs DP, $p = 0,80$) e *Candidatus saccharibacteria* (DP+FLU vs. DP, $p = 0,99$) (Figura 8: a-h).

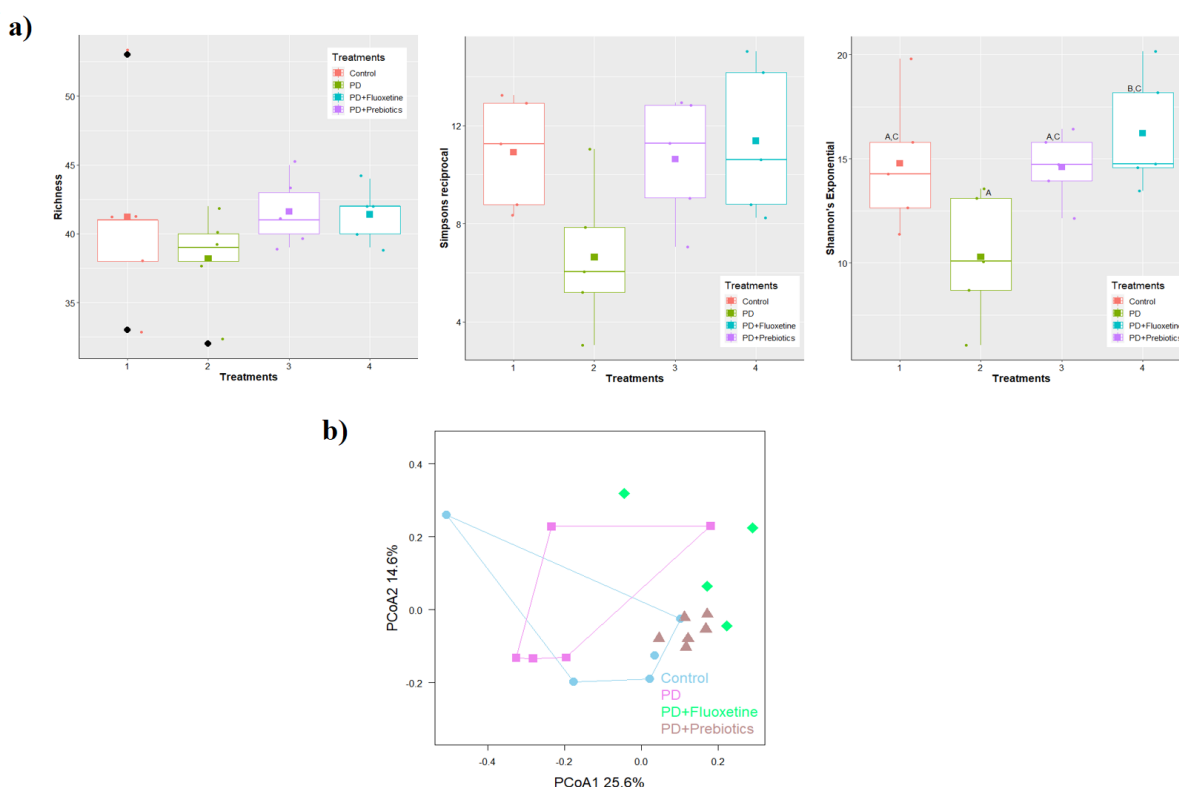


Fig. 4 Alterações prejudiciais na diversidade da microbiota intestinal em animais induzidos por rotenona. a) Diversidade alfa: A riqueza de espécies observadas, índice de Simpson recíproco e índice de entropia de Shannon b) Análise de coordenadas principais (PCoA). Os índices de diversidade alfa foram determinados por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os valores são apresentados como média $\pm$ DP ($n = 6$ conteúdo cecal/grupo). Letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p < 0,01$).

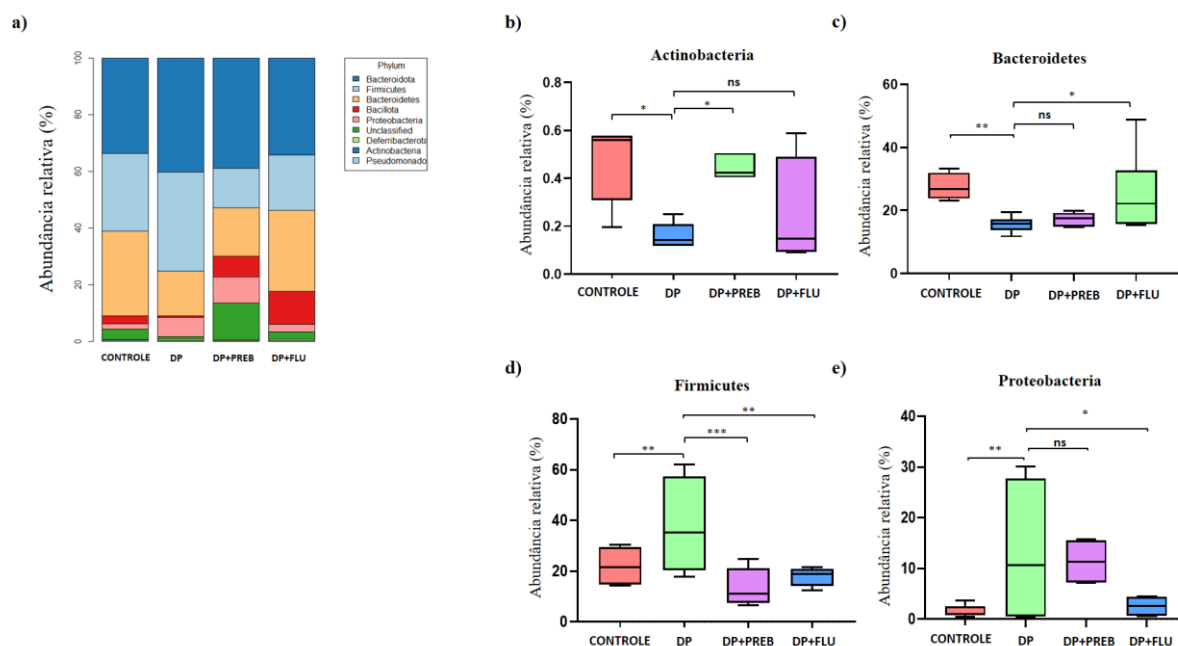


Fig. 5 Sequenciamento do gene 16s bacteriano de DNA em fezes. a) Distribuição da abundância relativa entre os filos: b) Actinobacteria; c) Bacteroidetes; d) Firmicutes; e) Proteobacteria. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=6 camundongos/grupo).

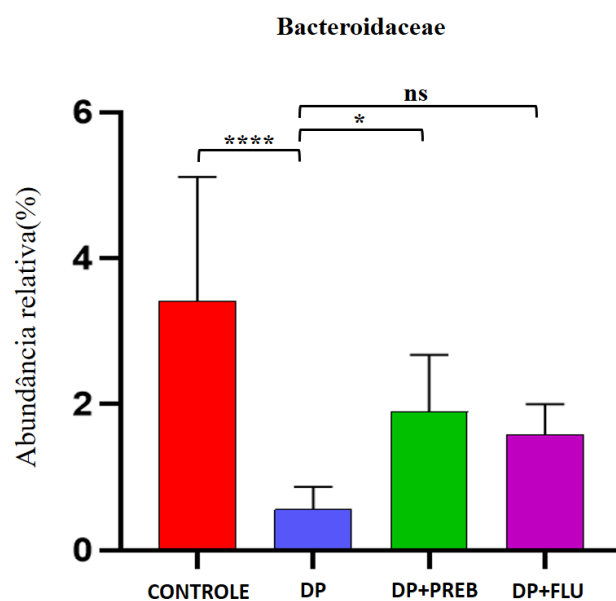


Fig. 6 Sequenciamento do gene 16s bacteriano de DNA em fezes. Distribuição da abundância relativa da família Bacteroidaceae. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=6 camundongos/grupo).

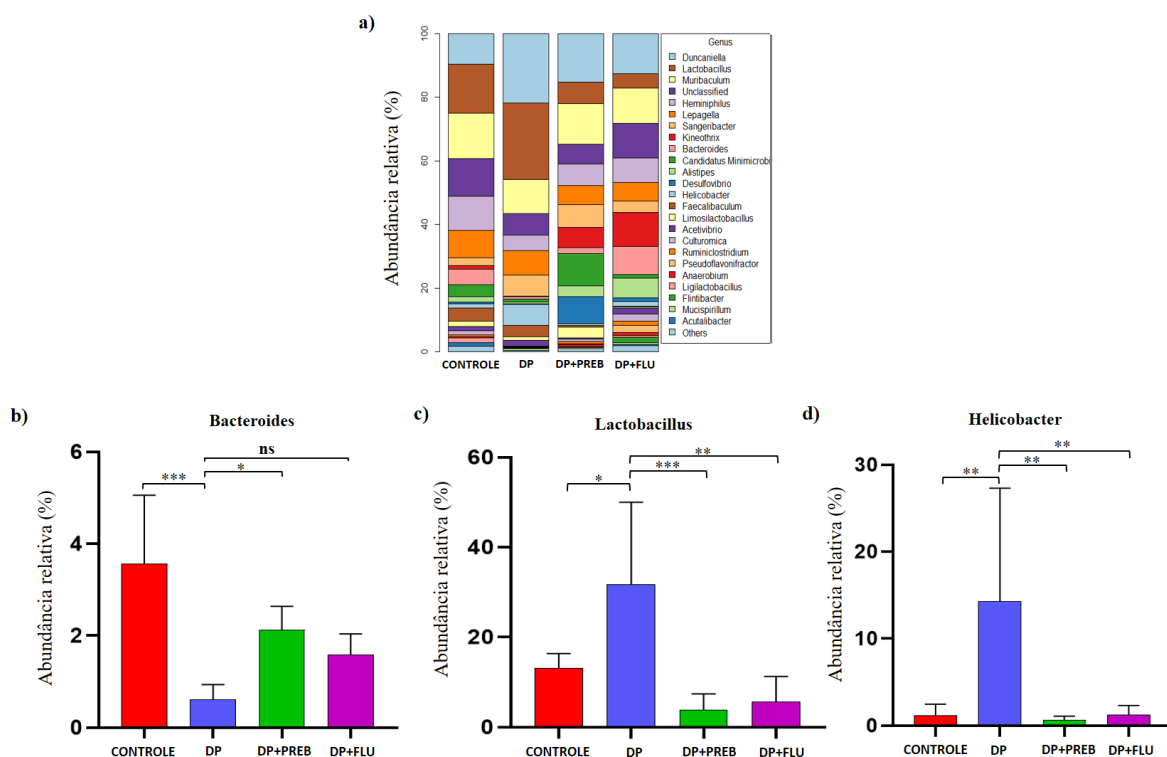


Fig. 7 Sequenciamento do gene 16s bacteriano de DNA em fezes. a) Distribuição da abundância relativa entre os gêneros; b) Bacteroides; c) Lactobacillus; d) Helicobacter. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=6 camundongos/grupo).

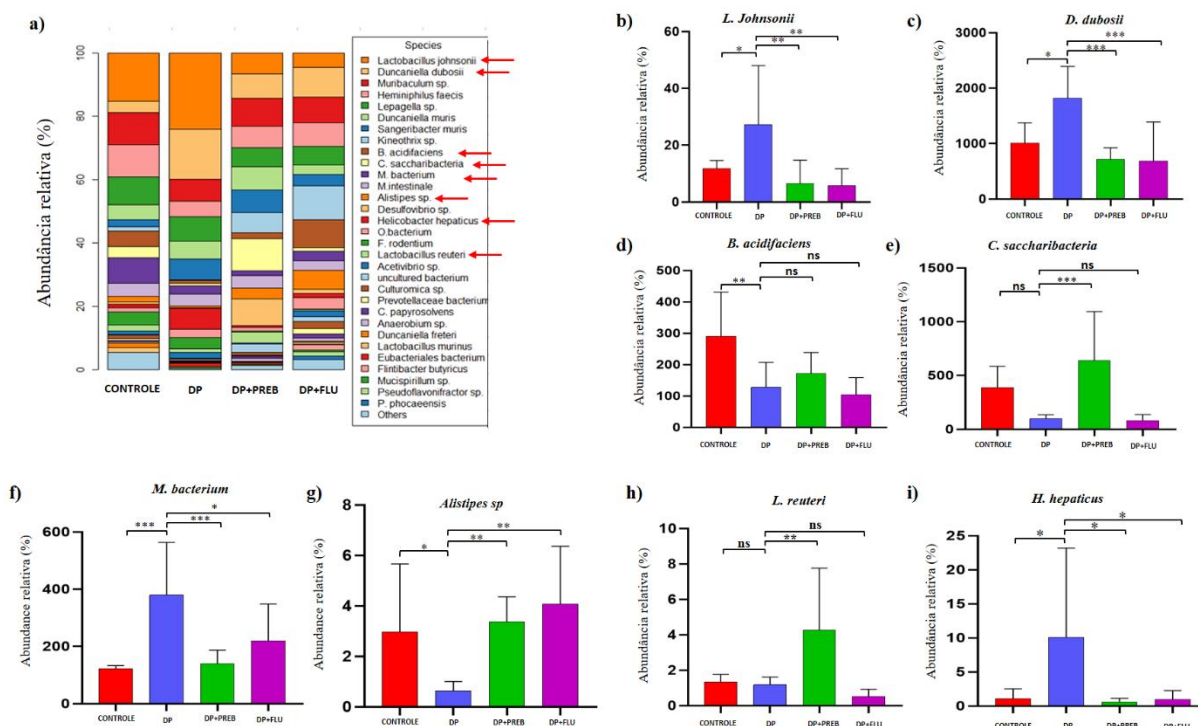


Fig. 8 Sequenciamento do gene 16s bacteriano de DNA em fezes. a) Distribuição da abundância relativa entre os gêneros: b) Bacteroides; c) Lactobacillus; d) Helicobacter. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=6 camundongos/grupo).

• Prebióticos aumentam imunorreatividade do GPR43 no cólon

No cólon, a rotenona diminuiu a expressão do GPR43, um receptor para ácidos graxos de cadeia curta (DP vs. CONTROL, $p = 0,01$). Em contraste, os prebióticos aumentaram a expressão desse receptor, indicando uma maior responsividade aos ácidos graxos de cadeia curta (DP+PREB vs. DP, $p < 0,0001$). No entanto, a fluoxetina também aumentou a imunorreatividade à ocludina (DP+FLU vs. DP, $p = 0,05$).

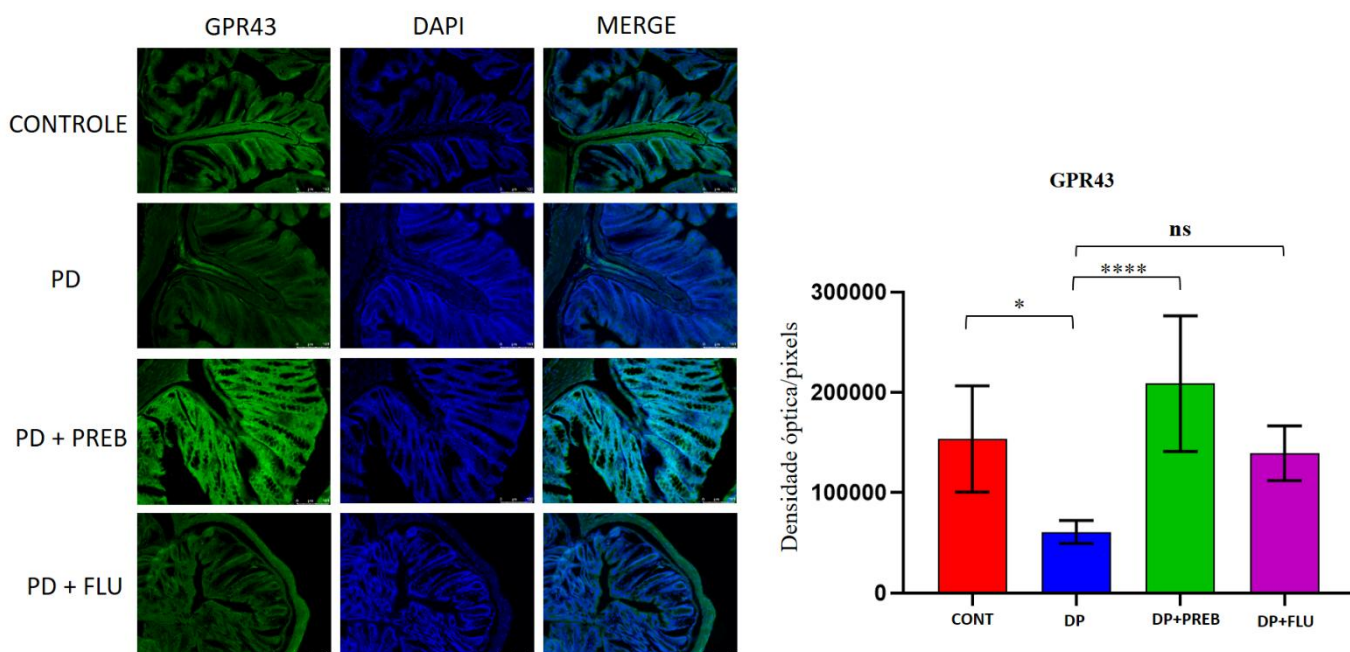


Fig. 9 Imagens representativas de imunofluorescência e densidade óptica/pixels para GPR43 no cólon. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey (n=12 imagens por grupo). NS: não significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

- **Prebióticos atenuam agregação proteica, inflamação e aumentam ocludina no cólon**

Animais induzidos com rotenona apresentaram acúmulo de α -sinucleína no cólon (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0211$), bem como aumento de p-NF-kB (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0084$) e IL1- β (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0001$). No grupo PD, houve aumento de ocludina (DP vs. CONTROLE, $p = 0,018$) em relação ao grupo controle, sugerindo possível mecanismo compensatório na integridade do epitélio diante da lesão pela rotenona. Os prebióticos aumentaram significativamente os níveis de proteína ocludina (DP+PREB vs DP, $p = 0,005$), reduziram o acúmulo de α -sinucleína (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0029$), a expressão de p-NF-kB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0149$) e IL1- β (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0234$). A fluoxetina também

aumentou os níveis de proteína de ocludina (DP+FLU vs. DP, $p = 0,02$), em relação ao grupo PD e reduziu os níveis de expressão de fosfo- α -sinucleína (DP+FLU vs. DP, $p = 0,02$) e IL1- β (DP+FLU vs. DP, $p < 0,0001$), mas não reduziu significativamente o NF- κ B (DP+FLU vs. DP, $p = 0,25$) (Figura 10a). A quantificação da ocludina foi complementada pela análise de imunofluorescência, onde a rotenona não reduziu significativamente a imunorreatividade à proteína de junção ocludina (DP vs. CONTROL, $p = 0,079$). Quando comparado ao grupo DP, o grupo que foi induzido com rotenona e tratado com prebióticos apresentou um aumento na expressão de oclusão (DP+PREB vs. DP, $p = 0,005$), assim como o grupo tratado com fluoxetina (DP+FLU vs. DP, $p = 0,04$) (Figura 10b).

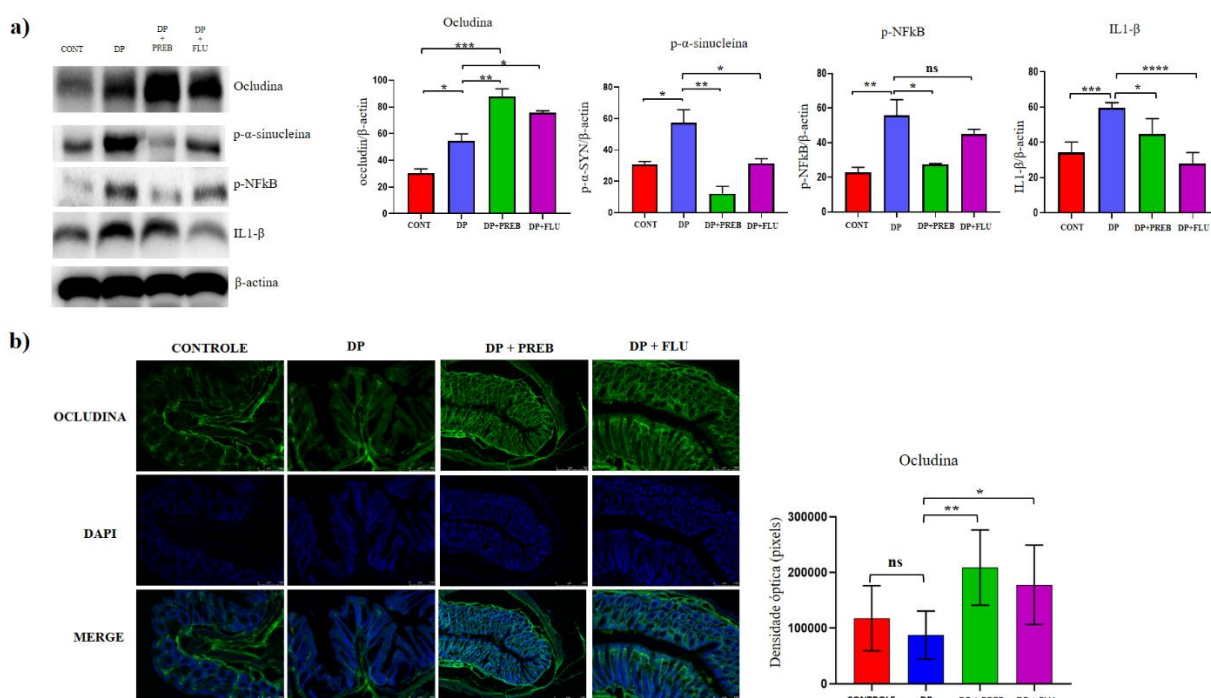


Fig. 10 a) No cólon, imagens representativas de bandas de western blot (painéis esquerdos) e quantificação de western blot de ocludina, fosfo- α -sinucleína, NF κ B e IL1- β . Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ($n = 10$ camundongos/grupo). b) Imunofluorescência para ocludina no cólon. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n = 12$ imagens/grupo).

• **Prebióticos aumentam os níveis de serotonina em todo o cérebro**

A indução com rotenona promoveu uma diminuição nos níveis de serotonina no cérebro em comparação com animais saudáveis (DP vs. CONTROL, $p = 0,005$). Em contraste, nos animais tratados com prebióticos, os níveis de serotonina aumentaram significativamente (DP+PREB vs. DP, $p = 0,004$). Como esperado, a fluoxetina também aumentou os níveis de serotonina no cérebro de animais no grupo DP+FLU (DP+FLU vs DP, $p = 0,002$) (Figura 11).

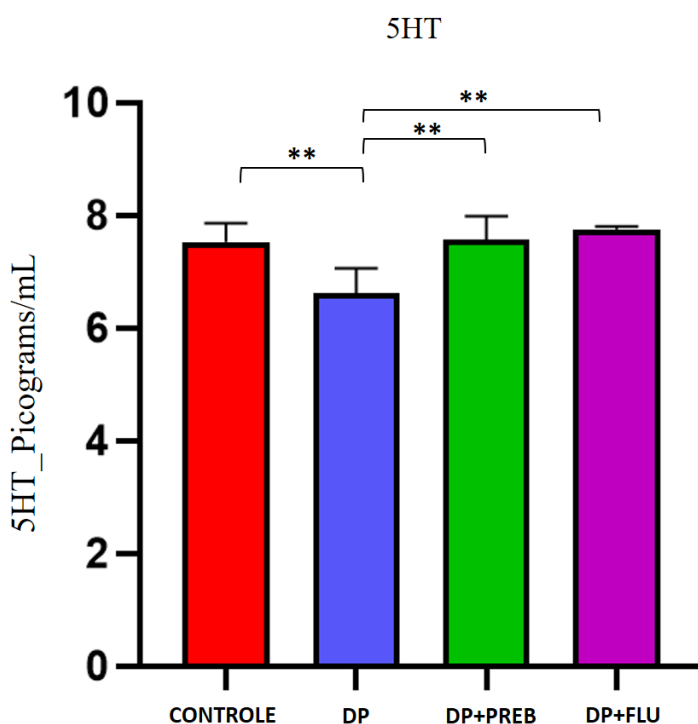


Fig. 11 Níveis de serotonina (5HT) no sobrenadante cerebral de animais, resultados expressos em picogramas/mL. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ($n = 3$ camundongos/grupo).

• **Prebióticos atenuam agregação de α -sinucleína fosforilada, reatividade glial e neuroinflamação na substância negra**

Na substância negra, a indução de rotenona causou um aumento na α -sinucleína fosforilada em animais induzidos por DP (DP vs. CONTROLE, $p = 0,032$) e na expressão da proteína IBA-1 (molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado) (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0070$), indicando um aumento na agregação de proteína tóxica e microglia reativa, respectivamente. Além disso, os animais do grupo DP também mostraram um aumento na óxido nítrico sintase (iNOS) (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0468$), p-NFkB (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0048$) e IL1- β (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0166$), que são mediadores de vias inflamatórias. O tratamento prebiótico reduziu a expressão de α -sinucleína fosforilada (PD+PREB vs. PD, $p = 0,0009$) e atenuou a reatividade microglial reduzindo os níveis de IBA-1 em comparação ao grupo DP (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0012$). Finalmente, os prebióticos também reduziram a expressão de iNOS (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0017$), p-NFkB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0012$) e IL1- β (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0214$) na substância negra. A fluoxetina também reduziu os níveis de fosfo- α -sinucleína (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0028$), iNOS (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0075$), p-NFkB (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0030$) e IL1- β (DP+FLU vs. DP, $p = 0,014$) (Figura 12). O aumento de IBA-1 também foi evidenciado na substância negra por análises de imunofluorescência no grupo induzido por rotenona (DP vs. CONTROL, $p = 0,004$), enquanto os grupos prebiótico e tratado com fluoxetina reduziram a marcação de IBA-1 (PD+PREB vs. PD, $p = 0,032$), (DP+FLU vs. DP, $p = 0,008$) (Figura 13a). Além disso, também houve aumento da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no grupo DP (DP vs. CONTROLE, $p < 0,0001$). Entretanto, prebióticos e fluoxetina foram capazes de atenuar a imunorreatividade desse marcador glial (DP+PREB vs. DP, $p < 0,0001$), (DP+FLU vs DP, $p < 0,0001$) (Figura 13b).

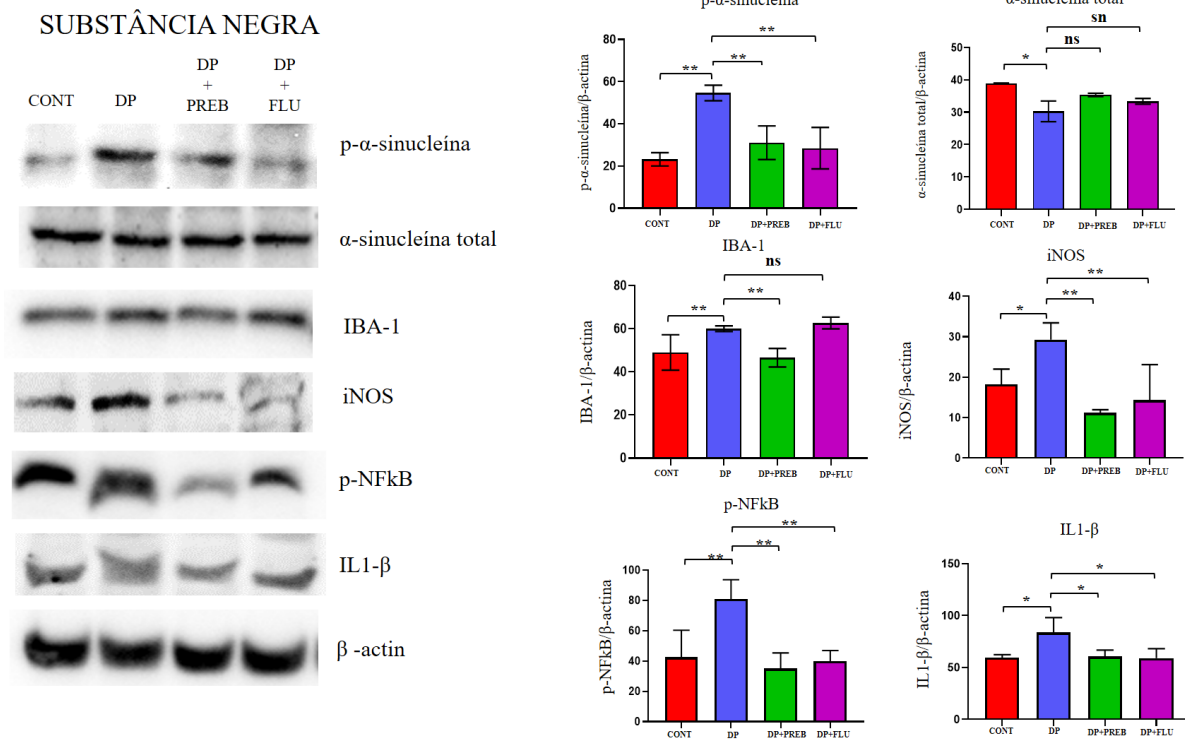


Fig. 12 Imagens representativas de bandas de western blot (painéis esquerdos) e quantificação de western blot de fosfo-α-sinucleína, α-sinucleína total; IBA-1, iNOS, NF-κB e IL1-β na substância negra. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=10 camundongos/grupo).

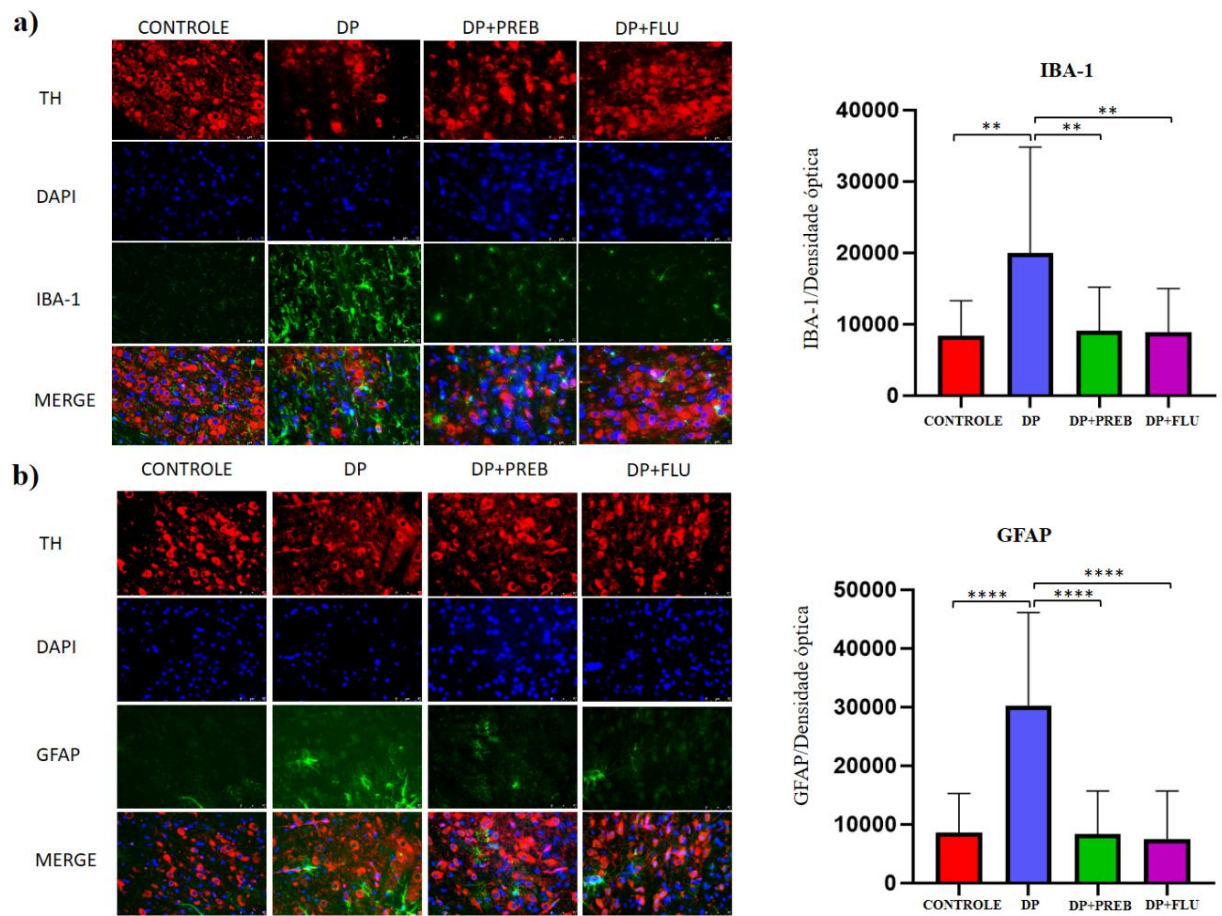


Fig. 13 a) Imunofluorescência para IBA-1 na substância negra. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n = 12$ imagens/grupo); b) Imunofluorescência para GFAP na substância negra. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. **** $p < 0,0001$. ($n = 12$ imagens/grupo).

- **Prebióticos atenuam a morte neuronal dopaminérgica e aumentam os fatores de neuroplasticidade na substância negra**

A análise de Western blotting mostrou que a administração sistêmica de rotenona causou a morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra evidenciada pela diminuição da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) (DP vs. CONTROL, $p = 0,0038$). No entanto, o tratamento com prebióticos foi capaz de atenuar a perda neuronal dopaminérgica (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0007$), assim como a fluoxetina (DP+FLU vs. DP, $p < 0,0001$). A rotenona causou perda de neuroplasticidade através da diminuição de p-CREB (DP vs. CONTROL, $p < 0,0001$) e BDNF (DP vs. CONTROL, $p < 0,0001$). No entanto, os prebióticos aumentaram a expressão proteica de p-CREB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0453$) e BDNF (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0404$). A fluoxetina também aumentou os níveis de expressão de TH (DP+FLU vs. DP, $p < 0,0001$), p-CREB (DP+FLU vs. DP, $p = 0,02$) e BDNF (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0003$) (Figura 14).

A análise de imunofluorescência também mostrou uma diminuição na imunorreatividade de TH na substância negra do grupo DP (DP vs. CONTROL, $p < 0,0001$). O tratamento com prebióticos aumentou a imunocoloração de TH na substância negra (DP+PREB vs. DP, $p < 0,0001$), assim como a fluoxetina (DP+FLU vs. DP, $p < 0,0001$) (Figura 15a).

As análises de imunofluorescência também confirmaram os resultados de p-CREB e BDNF por western blotting. O grupo DP apresentou uma diminuição em BDNF (DP vs. CONTROL, $p < 0,0001$) e p-CREB, embora este último não tenha sido estatisticamente significativo em comparação ao controle (DP vs. CONTROL, $p = 0,32$). Em contraste, os prebióticos aumentaram a marcação de BDNF (DP+PREB vs. DP, $p < 0,0001$) e p-CREB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,023$). Da mesma forma, a fluoxetina, o padrão ouro para respostas neuroplasticidade, também aumentou tanto o BDNF (DP+FLU vs. DP, $p < 0,0001$) quanto o p-CREB (DP+FLU vs. DP, $p = 0,003$). A sobreposição entre BDNF e p-CREB e a marcação dopaminérgica (TH) confirma a resposta neuroplasticidade em neurônios dopaminérgicos após tratamentos (Figura 15a e 15b).

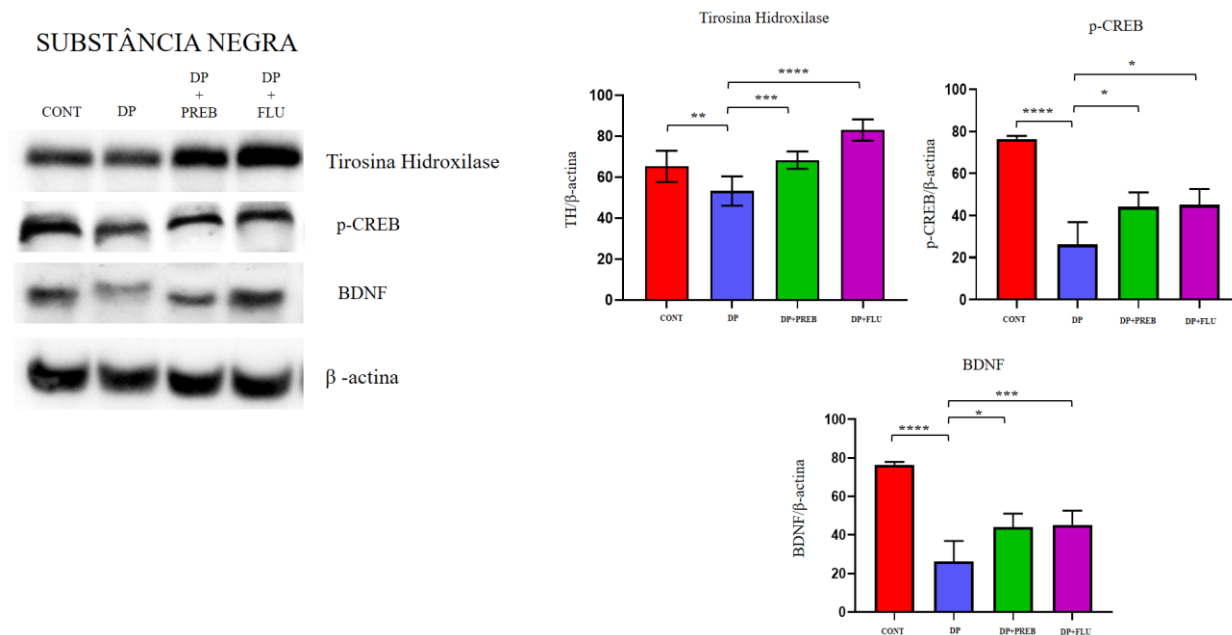


Fig. 14 Imagens representativas de bandas de western blot (painéis da esquerda) e quantificação de western blot de TH, p-CREB e BDNF na substância negra. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=10 camundongos/grupo).

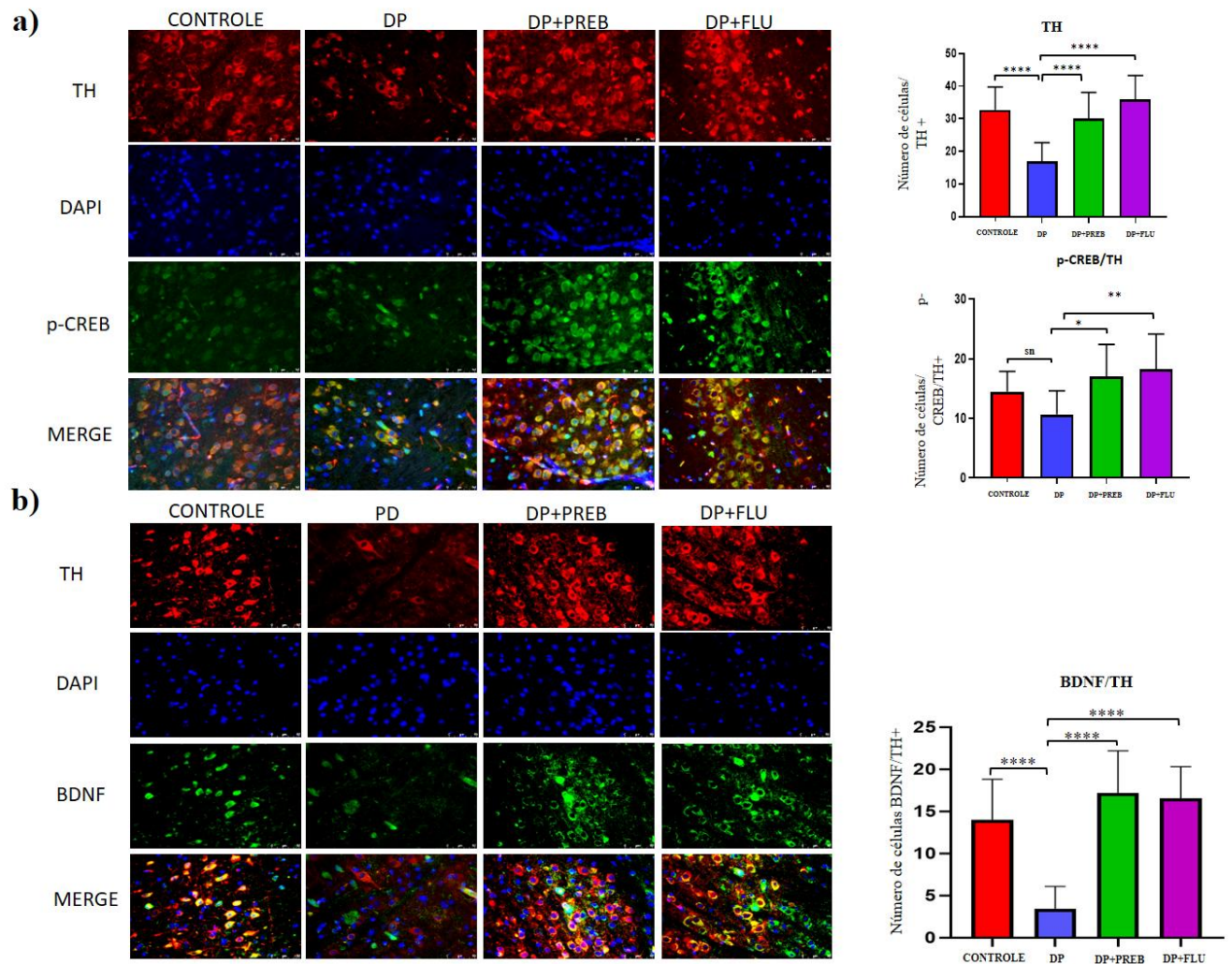


Fig. 15 a) Imunofluorescência para TH e pCREB na substância negra. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n = 12$ imagens/grupo); b) Imunofluorescência para TH e BDNF na substância negra. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. **** $p < 0,0001$. ($n = 12$ imagens/grupo).

• Os prebióticos reduziram a neuroinflamação induzida por rotenona no córtex pré-frontal

No córtex pré-frontal, a rotenona aumentou a expressão dos níveis de proteína de iNOS (DP vs. CONTROLE, $p < 0,0001$), NFkB fosforilado (DP vs. CONTROLE, $p = 0,049$) e IL1- β (DP vs. CONTROLE, $p < 0,0001$). Entretanto, em animais que foram tratados com prebióticos, houve uma diminuição significativa nos níveis de expressão de iNOS (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0001$), p-NFkB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,006$) e IL1- β (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0034$). A fluoxetina também diminuiu os níveis de expressão de iNOS (DP+FLU vs. DP, $p = 0,04$) e IL1- β (DP+FLU vs. DP, $p < 0,0001$) (Figura 16).

CÓRTEX PRE-FRONTAL

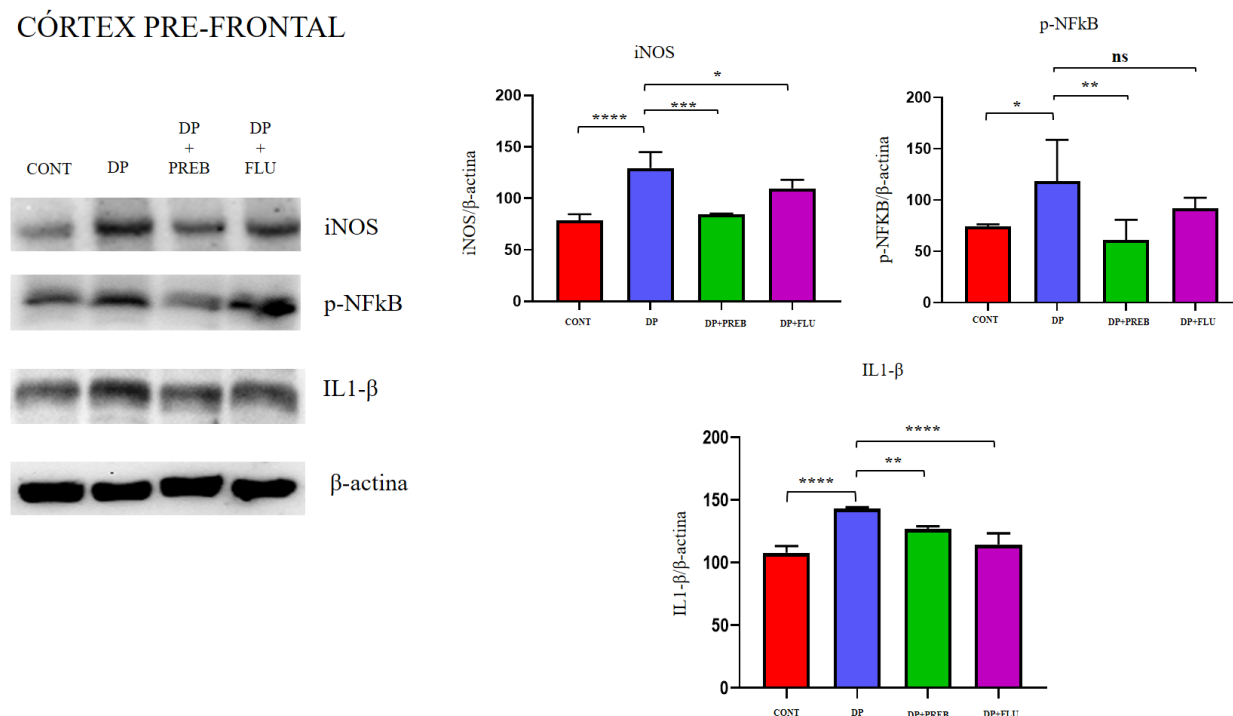


Fig. 16 Imagens representativas de bandas de western blot (painéis da esquerda) e quantificação de western blot de iNOS, NF-kB e IL1- β no córtex pré-frontal. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (n=10 camundongos/grupo).

• Os prebióticos aumentam a expressão do fator de transcrição de neuroplasticidade p-CREB, BDNF, PSD-95 e transportador de serotonina no córtex pré-frontal

O grupo PD, induzido com rotenona, mostrou uma diminuição dos níveis de CREB fosforilado (proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico) (DP vs. CONTROLE, $p = 0,016$), BDNF (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0014$), PSD-95 (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0169$) e transportador de serotonina (SERT) (DP vs. CONTROLE, $p = 0,0023$). Enquanto os prebióticos aumentaram os níveis de p-CREB (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0012$), BDNF (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0039$), PSD-95 (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0073$) e SERT (DP+PREB vs. DP, $p = 0,0282$) no córtex pré-frontal, indicando maiores níveis de serotonina e neuroplasticidade. A fluoxetina também aumentou p-CREB (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0008$), SERT (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0028$) e PSD-95 (DP+FLU vs. DP, $p = 0,0021$) (Figura 17).

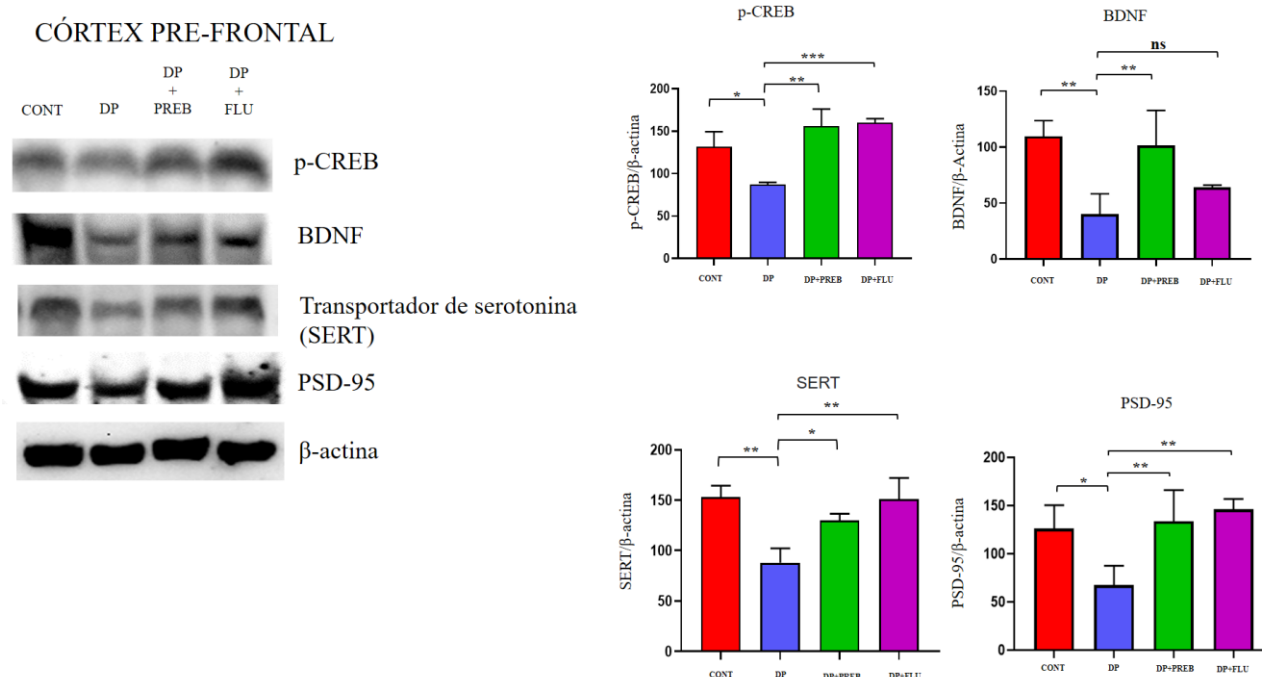


Fig. 17 Imagens representativas de bandas de western blot (painéis da esquerda) e quantificação de western blot de p-CREB, BDNF, SERT e PSD-95, no córtex pré-frontal. Os dados foram analisados por testes estatísticos de variância ANOVA unidirecional e teste post hoc de Tukey. NS: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ($n = 10$ camundongos/grupo).

Discussão

Nossos resultados mostram que o tratamento com FOS+GOS melhorou os sintomas motores da DP experimental induzida por rotenona. Os testes rotarod e campo aberto buscam validar o modelo experimental de DP, no qual a bradicinesia e a instabilidade postural ou perda de equilíbrio são patognômicas. A bradicinesia observada no teste de campo aberto e a perda de equilíbrio observada no teste rotarod em animais induzidos com rotenona já são atestadas por outros estudos, incluindo aqueles publicados por nosso grupo (Arab et al. 2021; Mendonça et al. 2022b). Quando tratados com prebióticos simultaneamente à rotenona, observamos no presente estudo que não houve desenvolvimento desses sintomas nos animais, indicando que os prebióticos previnem o déficit motor atestado tanto pelo rotarod quanto pelo campo aberto. Até o momento, não há estudos com tratamento com FOS e GOS na DP experimental. No entanto, podemos comparar nossos resultados com estudos que aplicaram probióticos como terapia. Probióticos são cepas cuja função inclui a fermentação de fibras prebióticas como fonte de energia. Alguns estudos mostraram que os probióticos podem atenuar ou até mesmo prevenir os sintomas motores da DP (Hsieh et al. 2020; Sun et al. 2021; Sancandi et al. 2023; Parra et al. 2023). A fluoxetina tendeu a atenuar os déficits motores; no entanto, nenhum dado significativo foi observado.

Na análise do comportamento do tipo depressivo, nossos dados mostraram que os animais com DP apresentaram menor preferência por sacarose (SPT) e maior tempo de imobilidade. Alguns estudos já mostraram a aplicabilidade de paradigmas usados na pesquisa experimental sobre depressão. No teste de preferência por sacarose (SPT), a anedonia no animal é medida pela redução do consumo de sacarose em comparação aos níveis basais, roedores anedônicos apresentam diminuição da preferência pela solução de sacarose, provavelmente devido a uma redução da sensação de recompensa pelo sabor doce, da mesma forma, a eficácia antidepressiva é avaliada pela maior preferência pela solução de sacarose (Wang et al. 2009; Schintu et al. 2012; Mendonça et al. 2022b, a). No teste de suspensão da cauda (TST), é avaliado um endofenótipo denominado "comportamento semelhante ao desespero", que é proporcional ao tempo de imobilidade (Schintu et al. 2012).

Nossos resultados demonstraram que o modelo de DP induzido por rotenona

desenvolve comportamento anedônico e semelhante ao desespero ou comportamento semelhante ao depressivo, confirmando estudos recentes usando modelos de DP induzidos por 6-OHDA (Bonato et al. 2018; Vecchia et al. 2021). Nossos dados também mostraram, pela primeira vez, que os prebióticos FOS e GOS foram capazes de inibir o desenvolvimento de comportamento depressivo anedônico ou semelhante ao desespero em camundongos com DP induzidos por rotenona, assim como a fluoxetina, que é o medicamento de referência para resposta antidepressiva.

A avaliação da permeabilidade intestinal pelo ensaio FITC-DEXTRAN não demonstrou passagem de dextrana para o soro, não indicando comprometimento da integridade da barreira epitelial intestinal. Embora um aumento da permeabilidade intestinal já tenha sido relatado em outros modelos de DP (Kelly et al. 2014; Dodiya et al. 2020; Yang et al. 2022; Sancandi et al. 2023), nosso modelo é relativamente agudo, com um curto período de indução com rotenona. Além disso, a via de administração da rotenona (subcutânea) proporciona menor biodisponibilidade do fármaco, o que pode não ser suficiente para causar um “leak gut”. O resultado do ensaio FITC-DEXTRAN corroborou os resultados da expressão da ocludina, uma proteína de junção celular, que também não diminuiu significativamente no grupo DP, reafirmando que não houve alterações significativas na permeabilidade intestinal. Entretanto, o tratamento com prebióticos promoveu um aumento da ocludina no intestino, indicando o papel dos prebióticos na manutenção da integridade intestinal já descrito na literatura para outros modelos experimentais (Wu et al. 2020; Han et al. 2020; de Paiva et al. 2023). Curiosamente, a fluoxetina também aumentou a marcação da ocludina no intestino; até onde sabemos, esse resultado não foi relatado em estudos anteriores.

A diversidade Alfa e beta não mudou significativamente entre os grupos, embora tenha havido uma tendência de diminuição da diversidade α no grupo induzido por DP e uma tendência de retorno aos níveis basais no grupo tratado com prebiótico. A diversidade Alfa pode ser usada para calcular a composição de espécies dentro de amostras, incluindo informações bidimensionais sobre número e abundância, enquanto a diversidade beta pode ser usada para estudar a composição de espécies entre comunidades (Parikh et al. 2020). Acreditamos que os dados de diversidade α e beta não foram estatisticamente significativos devido ao pequeno número de animais usados nesta análise.

Apesar disso, a rotenona promoveu disbiose intestinal alterando grupos de

bactérias que desempenham papéis na homeostase intestinal, enquanto o tratamento com prebióticos promoveu um aumento de grupos bacterianos benéficos, cuja abundância promove uma microbiota equilibrada. Entre os grupos bacterianos aumentados pelo tratamento prebiótico, destacam-se: a família Bacteroidaceae, *Bacteroides* spp, bem como espécies de *Alistipes* spp e *Lactobacillus reuteri* são conhecidas como grupos que produzem metabólitos importantes chamados ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Outros autores mostraram que *Lactobacillus reuteri* promoveu melhora na função motora, reduziu o estresse oxidativo e atenuou a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e no estriado em um modelo de DP induzido por 6-OHDA (Nápoles-Medina et al. 2023). Uma diminuição na abundância relativa de todas essas bactérias foi relatada em modelos de DP (Stewart et al. 2009; Van Kessel e El Aidy 2019; Hong et al. 2021; Huang et al. 2021). Além disso, os prebióticos também reduziram a abundância do gênero *Helicobacter* e da espécie *H. hepaticus*, que atuam como bactérias pró-inflamatórias no modelo transgênico de DP (Ahn et al. 2023).

SCFAs são metabólitos responsáveis por manter a homeostase intestinal modulando a integridade da barreira epitelial por meio da regulação imunológica e são fontes de energia para colonócitos ativando receptores acoplados à proteína G (GPRs) (Mohamed Elfadil et al. 2023). Os SCFAs acetato, propionato e butirato também foram relatados em vários estudos como benéficos ao sistema nervoso central. O butirato, um dos três principais SCFAs, desempenha papéis anti-inflamatórios, antioxidantes e de regulação epigenética em modelos experimentais (Liu et al. 2001; Schilderink et al. 2013). Em nosso estudo, tais funções dos SCFAs foram indicadas pelo aumento dos níveis de ocludina e GPR43. GPR43 é um receptor para acetato > propionato > butirato (Ikeda et al. 2022; de Paiva et al. 2023), cuja função é, entre outras, induzir a expressão de ocludina, uma proteína de junção que mantém a adesão entre as células epiteliais intestinais, mantendo assim a integridade epitelial.

Além da disbiose, a rotenona promoveu o acúmulo de fosfo- α -sinucleína intestinal e inflamação no tecido colônico com ativação de NF κ B e produção de IL1- β . Marcadores inflamatórios como IL1- β associados a inclusões de fósforo- α -sinucleína também foram encontrados em biópsias intestinais de pacientes com DP (Devos et al. 2013). Além disso, um modelo de DP induzido por rotenona (30mg/kg/dia) por 7 dias também promoveu inflamação intestinal por meio da produção de IL1- β e p-NF κ B associada à disbiose, o que provavelmente contribui para a inflamação intestinal do

meio (Zhao et al. 2021). Curiosamente, o tratamento com FOS e GOS atenuou não apenas o acúmulo de fosfo- α -sinucleína, mas também a expressão de NF κ B e IL1- β , diminuindo assim a inflamação no cólon, possivelmente devido ao aumento da abundância relativa de bactérias benéficas e à produção de SCFAs.

Descobrimos que a rotenona diminuiu a expressão da tirosina hidroxilase (TH), a enzima envolvida na síntese de dopamina na substância negra, e aumentou a fosforilação da α -sinucleína na substância negra e no cólon. A diminuição do TH reflete a morte de neurônios dopaminérgicos nessa região, um marcador neuropatológico da DP, assim como o acúmulo de α -sinucleína. Os aglomerados de α -sinucleína formam inclusões citoplasmáticas chamadas corpos de Lewy e neuritos dentro dos neurônios dopaminérgicos restantes do SNpc (Colla et al. 2012; Choi et al. 2013). Além disso, o acúmulo de fosfo- α -sinucleína também foi demonstrado no intestino de animais com DP, que poderia atingir o cérebro por meio da comunicação do eixo intestino-cérebro (Kelly et al. 2014; Seo et al. 2023). O papel preciso das formas tóxicas de α -sinucleína na etiologia da DP não é claro, no entanto, dados gerados a partir de modelos *in vivo* e *in vitro* mostram que formas agregadas de α -sinucleína podem contribuir para o processo neurodegenerativo na DP ao interferir na função lisossomal e mitocondrial, prejudicando a autofagia, a homeostase vesicular e o transporte de microtúbulos. Nossos resultados confirmam aqueles obtidos em modelos experimentais de DP induzidos por rotenona *in vitro* (Shin e Chung 2020) e *in vivo* (Dodiya et al. 2020). Além disso, esta é a primeira vez que um estudo mostrou que prebióticos e fluoxetina podem reduzir o acúmulo de α -sinucleína na substância negra e no cólon de animais induzidos por rotenona.

Dados anteriores do nosso grupo já demonstraram que a substância negra é afetada pela neuroinflamação neste modelo de DP (Mendonça et al. 2022b), e esses dados também são corroborados em outros modelos animais (Sampson et al. 2016; Ma et al. 2023; Geng et al. 2023). Microglia são células residentes do sistema nervoso central, principalmente responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios, e essa produção começa a partir de uma ativação do fenótipo inflamatório da microglia (Gao et al. 2023). A ativação microglial (microgliose) é avaliada por vários marcadores, incluindo IBA-1 (Kustrimovic et al. 2019). No presente estudo, encontramos um aumento na expressão de IBA-1 em animais induzidos com rotenona (microgliose) e uma reversão desse aumento em animais doentes tratados com prebióticos. Em nosso estudo, os prebióticos também reduziram a imunorreatividade dos astrócitos

induzida pela rotenona. A reatividade astrocítica, revelada pelo aumento da densidade óptica para GFAP, também faz parte de uma resposta neuroinflamatória. Um estudo recente de Yin et al. (2023) estudando um camundongo DP transgênico de α -sinucleína humana mutante A30P demonstrou que a sinalização da proteína G 5 (RGS5) promove o processo neurodegenerativo por meio do aumento da sinalização do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) em astrócitos (Yin et al. 2023). Finalmente, α -sinucleína, iNOS e IL1- β também foram atenuados pelo tratamento prebiótico, resultados que foram corroborados por estudos anteriores usando outros tratamentos alternativos em modelos de DP (Cai et al. 2022; Zamanian et al. 2023).

No presente estudo, o tratamento com FOS e GOS aumentou os níveis de serotonina no cérebro. Além disso, os prebióticos também aumentaram a expressão do transportador de serotonina (SERT), da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95) no córtex pré-frontal, que foram esgotados pelo tratamento com rotenona. O papel da serotonina na depressão e a perda de neuroplasticidade no córtex pré-frontal estão relacionados à depressão (Borrito-Escuela et al. 2021). Estudos relacionados à depressão mostram que o aumento da neuroplasticidade por meio do fosfo-CREB também promoveu o aumento da serotonina, o que resultou em melhora na depressão induzida por estresse de restrição espacial (SRS) em camundongos (Duman et al. 2016; Kraus et al. 2017; Li et al. 2019). Além disso, o PSD-95 também está relacionado à melhora do comportamento depressivo em um modelo de depressão induzida por modelo de separação materna em ratos (Deng et al. 2022).

Curiosamente, os prebióticos mostraram resultados semelhantes à fluoxetina usada aqui como padrão-ouro para tratamento da depressão. Além disso, os prebióticos também reduziram iNOS, NF- κ B e o mediador de inflamação IL-1 β . O componente neuroinflamatório na depressão contribui para o processo patológico da depressão. Mediadores neuroinflamatórios também são observados em modelos de DP com comportamento semelhante ao depressivo e contribuem para a neurodegeneração característica da DP (Kamińska et al. 2017; Okano et al. 2019; Zhao et al. 2021).

Em conjunto, nossos resultados sugerem o uso de FOS e GOS como uma nova abordagem terapêutica para futuras intervenções no tratamento da depressão associada à doença de Parkinson. Estudos clínicos com esses dois prebióticos devem

ser realizados para obter efeitos translacionais humanos.

Conclusão

Este estudo foi o primeiro a testar uma potencial estratégia terapêutica da combinação de FOS e GOS em um modelo de doença de Parkinson. Os resultados mostram que essa combinação promoveu melhora no desempenho motor e comportamento depressivo. O tratamento com prebióticos FOS e GOS promoveu um aumento nos metabólitos produtores de bactérias, como SCFAs. Esse resultado é corroborado pelo aumento do receptor para SCFAs, GPR43 e ocludina no intestino. Além disso, FOS e GOS reduziram a inflamação intestinal por meio da inibição de NFkB e consequentemente diminuíram a expressão de IL1- β e reduziram o acúmulo de α -sinucleína no intestino, promovendo assim a melhora na comunicação intestino-cérebro evidenciada pela diminuição da inflamação e α -sinucleína na substância negra. Além disso, FOS e GOS também reduziram a inflamação no córtex pré-frontal e na substância negra e promoveram a neuroplasticidade por meio do aumento da expressão de p-CREB, BDNF, transportador de serotonina e proteína pós-sináptica PSD-95. Curiosamente, os prebióticos melhoraram os níveis de serotonina no cérebro, corroborando a atenuação do comportamento do tipo depressivo. Portanto, FOS e GOS mostram resultados promissores e iniciais para um tratamento adjuvante para depressão em DP. A Figura 18 resume os efeitos de FOS e GOS relatados neste estudo.

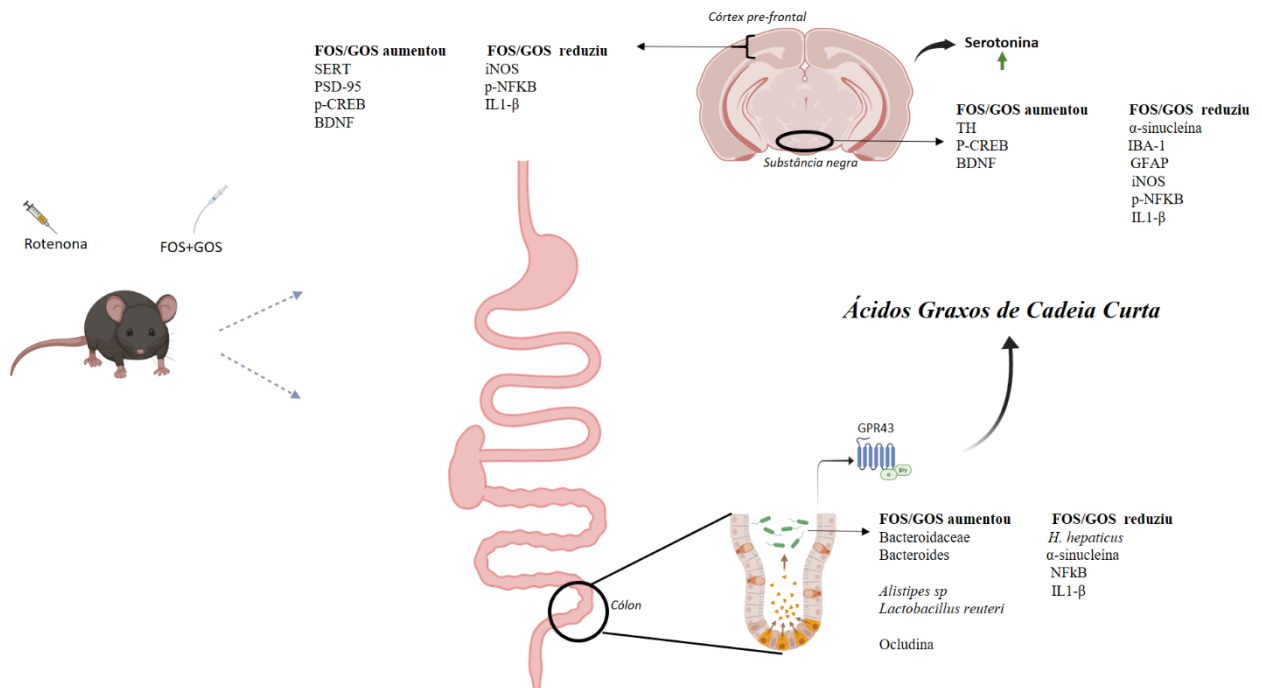


Fig. 18 FOS e GOS atuam no intestino aumentando a abundância relativa de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta Bacterioideceae, Bacterioides, Alistipes sp, Lactobacillus reuteri e reduzindo as espécies pró-inflamatórias *H. hepaticus*, α -sinucleína, p-NFkB, IL1- β . Consequentemente, FOS e GOS aumentam a expressão de ocludina e GPR43 no intestino. Na substância negra, FOS e GOS aumentam a expressão de TH e fatores de neuroplasticidade cerebral p-CREB e BDNF, além de reduzir IBA-1, GFAP, p-NFkB, IL1- β , iNOS e acúmulo de α -sinucleína. No córtex pré-frontal, FOS e GOS também reduziram a expressão dos marcadores inflamatórios p-NFkB, IL1- β , iNOS e promoveram aumento da neuroplasticidade por meio da expressão de SERT, PSD-95, BDNF e p-CREB. Finalmente, FOS e GOS também aumentaram os níveis de serotonina no cérebro.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Programa de Excelência em Pesquisa-Instituto Aggeu Magalhães (IAM-PROEP#400208/2019-9), o Programa de Geração de Conhecimento da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; #VPPCB-007-FIO-18-2-17), o Instituto de Ciência e Tecnologia de Neuroimunomodulação (INCT-NIM; #465489/2014-1) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #301777/2012-8). Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou relacionamentos pessoais conhecidos que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Contribuições dos autores

Ingrid Prata Mendonça: Escrita – rascunho original, Metodologia, Investigação, Conceitualização. Rodrigo Soares da Silva: Metodologia. Igor Henrique Rodrigues de Paiva: Metodologia. José Roberto Botelho de Souza: Metodologia, Análise formal. Christina Alves Peixoto: Redação – revisão e edição, Supervisão, Aquisição de financiamento, Análise formal, Conceitualização.

Disponibilidade dos dados

Todos os dados estão incluídos no manuscrito.

Referências

- Aas J, Gessert CE, Bakken JS (2003) Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis* 36:580–585. <https://doi.org/10.1086/367657>
- Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, et al (2014) Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy* 44:842–850. <https://doi.org/10.1111/CEA.12253>
- Ahn EH, Liu X, Alam AM, et al (2023) *Helicobacter hepaticus* augmentation triggers Dopaminergic degeneration and motor disorders in mice with Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 28:1337–1350. <https://doi.org/10.1038/S41380-022-01910-2>
- Aho VTE, Pereira PAB, Voutilainen S, et al (2019) Gut microbiota in Parkinson's disease: Temporal stability and relations to disease progression. *EBioMedicine* 44:691–707. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.05.064>
- Arab HH, Safar MM, Shahin NN (2021) Targeting ROS-Dependent AKT/GSK-3 β /NF- κ B and DJ-1/Nrf2 Pathways by Dapagliflozin Attenuates Neuronal Injury and Motor Dysfunction in Rotenone-Induced Parkinson's Disease Rat Model. *ACS Chem Neurosci* 12:689–703. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.0C00722>
- Ascherio A, Schwarzschild MA (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 15:1257–1272. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
- Bhattacharjee S, Vadieli N, Goldstone L, et al (2018) Patterns and Predictors of Depression Treatment among Older Adults with Parkinson's Disease and Depression in Ambulatory Care Settings in the United States. *Parkinsons Dis* 2018:6. <https://doi.org/10.1155/2018/3402983>
- Bonato JM, Bassani TB, Milani H, et al (2018) Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. *Exp Neurol* 300:188–200. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.11.009>
- Borrito-Escuela DO, Ambrogini P, Chruścicka B, et al (2021) The Role of Central Serotonin Neurons and 5-HT Heteroreceptor Complexes in the Pathophysiology of Depression: A Historical Perspective and Future Prospects. *Int J Mol Sci*

- 22:1–13. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041927>
- Braak H, Del Tredici K (2017) Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *J Parkinsons Dis* 7:S71–S85. <https://doi.org/10.3233/JPD-179001>
- Brudek T (2019) Inflammatory Bowel Diseases and Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 1–14. <https://doi.org/10.3233/jpd-191729>
- Burokas A, Arbolea S, Moloney RD, et al (2017) Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry* 82:472–487. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2016.12.031>
- Cai M, Zhuang W, Lv E, et al (2022) Kaempferol alleviates pyroptosis and microglia-mediated neuroinflammation in Parkinson's disease via inhibiting p38MAPK/NF- κ B signaling pathway. *Neurochem Int* 152:. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2021.105221>
- Can A, Dao DT, Terrillion CE, et al (2012) The tail suspension test. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/3769>
- Choi DY, Lee MK, Hong JT (2013) Lack of CCR5 modifies glial phenotypes and population of the nigral dopaminergic neurons, but not MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 49:159–168. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2012.08.001>
- Colla E, Coune P, Liu Y, et al (2012) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32:3306–3320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5367-11.2012>
- de Paiva IHR, da Silva RS, Mendonça IP, et al (2023) Fructooligosaccharide (FOS) and Galactooligosaccharide (GOS) Improve Neuroinflammation and Cognition By Up-regulating IRS/PI3K/AKT Signaling Pathway in Diet-induced Obese Mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 18:427–447. <https://doi.org/10.1007/S11481-023-10069-8>
- Deng D, Cui Y, Gan S, et al (2022) Sinisan alleviates depression-like behaviors by regulating mitochondrial function and synaptic plasticity in maternal separation rats. *Phytomedicine* 106:. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2022.154395>
- Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, et al (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 50:42–48. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2012.09.007>
- Dodiya HB, Forsyth CB, Voigt RM, et al (2020) Chronic stress-induced gut

- dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 135:. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2018.12.012>
- Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH (2016) Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med* 22:238–249. <https://doi.org/10.1038/NM.4050>
- Fiory F, Perruolo G, Cimmino I, et al (2019) The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. *Front Neurosci* 13:1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00868>
- Frisina PG, Haroutunian V, Libow LS (2009) The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Park Relat Disord* 15:144–148. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.038>
- Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S (2023) Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 8:. <https://doi.org/10.1038/S41392-023-01588-0>
- Gazerani P (2019) Probiotics for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/IJMS20174121>
- Geng L, Gao W, Saiyin H, et al (2023) MLKL deficiency alleviates neuroinflammation and motor deficits in the α -synuclein transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 18:. <https://doi.org/10.1186/S13024-023-00686-5>
- Han D, Li Z, Liu T, et al (2020) Prebiotics Regulation of Intestinal Microbiota Attenuates Cognitive Dysfunction Induced by Surgery Stimulation in APP/PS1 Mice. *Aging Dis* 11:1029–1045. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0106>
- Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, et al (2015) Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. *PLoS One* 10:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0142164>
- Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, et al (2017) Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord* 32:739–749. <https://doi.org/10.1002/MDS.26942>
- Hirayama M, Ohno K (2021) Parkinson's Disease and Gut Microbiota. *Ann Nutr Metab* 77 Suppl 2:28–35. <https://doi.org/10.1159/000518147>
- Hong Y, Sheng L, Zhong J, et al (2021) *Desulfovibrio vulgaris*, a potent acetic acid-producing bacterium, attenuates nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Gut Microbes* 13:1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1930874>

- Hsieh TH, Kuo CW, Hsieh KH, et al (2020) Probiotics Alleviate the Progressive Deterioration of Motor Functions in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Brain Sci* 10:1. <https://doi.org/10.3390/BRAINSKI10040206>
- Huang G, Wang Z, Wu G, et al (2021) Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp Phenolics Activate the Short-Chain Fatty Acid-Free Fatty Acid Receptor Anti-inflammatory Pathway by Regulating Microbiota and Mitigate Intestinal Barrier Damage in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *J Agric Food Chem* 69:3326–3339. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.0C07407>
- Ikeda T, Nishida A, Yamano M, Kimura I (2022) Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases. *Pharmacol Ther* 239:1. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2022.108273>
- Johnson ME, Stringer A, Bobrovskaya L (2018) Rotenone induces gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 65:174–185. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2018.02.013>
- Kamińska K, Lenda T, Konieczny J, et al (2017) Depressive-like neurochemical and behavioral markers of Parkinson's disease after 6-OHDA administered unilaterally to the rat medial forebrain bundle. *Pharmacol Rep* 69:985–994. <https://doi.org/10.1016/J.PHAREP.2017.05.016>
- Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al (2013) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498:99–103. <https://doi.org/10.1038/NATURE12198>
- Kelly LP, Carvey PM, Keshavarzian A, et al (2014) Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 29:999–1009. <https://doi.org/10.1002/MDS.25736>
- Kessel, S. P. v., El Aidy S (2019) Bacterial Metabolites Mirror Altered Gut 3 Microbiota Composition in Patients 4 with Parkinson's Disease. *J Park Dis*. <https://doi.org/10.3233/JPD-191780>
- Kraus C, Castrén E, Kasper S, Lanzenberger R (2017) Serotonin and neuroplasticity - Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci Biobehav Rev* 77:317–326. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2017.03.007>
- Kustrimovic N, Marino F, Cosentino M (2019) Peripheral Immunity, Immunoaging and

- Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Curr Med Chem* 26:3719–3753.
<https://doi.org/10.2174/0929867325666181009161048>
- Li Y, Liu J, Liu X, et al (2019) Antidepressant-Like Action of Single Facial Injection of Botulinum Neurotoxin A is Associated with Augmented 5-HT Levels and BDNF/ERK/CREB Pathways in Mouse Brain. *Neurosci Bull* 35:661–672.
<https://doi.org/10.1007/S12264-019-00367-8>
- Lin A, Zheng W, He Y, et al (2018) Gut microbiota in patients with Parkinson's disease in southern China. *Parkinsonism Relat Disord* 53:82–88.
<https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2018.05.007>
- Liu Q, Shimoyama T, Suzuki K, et al (2001) Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. *Scand J Gastroenterol* 36:744–750. <https://doi.org/10.1080/003655201300192012>
- Liu Y, Sun JD, Song LK, et al (2015) Environment-contact administration of rotenone: A new rodent model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 294:149–161.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2015.07.058>
- Ma C, Liu Y, Li S, et al (2023) Microglial cGAS drives neuroinflammation in the MPTP mouse models of Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 29:2018–2035.
<https://doi.org/10.1111/CNS.14157>
- Mendonça IP, de Paiva IHR, Duarte-Silva EP, et al (2022a) Metformin improves depressive-like behavior in experimental Parkinson's disease by inducing autophagy in the substantia nigra and hippocampus. *Inflammopharmacology* 30:1705–1716. <https://doi.org/10.1007/S10787-022-01043-6>
- Mendonça IP, Paiva IHR de, Duarte-Silva EP, et al (2022b) Metformin and fluoxetine improve depressive-like behavior in a murine model of Parkinson's disease through the modulation of neuroinflammation, neurogenesis and neuroplasticity. *Int Immunopharmacol* 102:. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.108415>
- Mohamed Elfadil O, Mundi MS, Abdelmagid MG, et al (2023) Butyrate: More Than a Short Chain Fatty Acid. *Curr Nutr Rep* 12:255–262.
<https://doi.org/10.1007/S13668-023-00461-4>
- Nápoles-Medina AY, Aguilar-Uscanga BR, Solís-Pacheco JR, et al (2023) Oral Administration of Lactobacillus Inhibits the Permeability of Blood-Brain and Gut Barriers in a Parkinsonism Model. *Behav Neurol* 2023:.
<https://doi.org/10.1155/2023/6686037>
- Okano M, Takahata K, Sugimoto J, Muraoka S (2019) Selegiline Recovers Synaptic

- Plasticity in the Medial Prefrontal Cortex and Improves Corresponding Depression-Like Behavior in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Behav Neurosci* 13:. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2019.00176>
- Parikh IJ, Estus JL, Zajac DJ, et al (2020) Murine Gut Microbiome Association With APOE Alleles. *Front Immunol* 11:. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00200>
- Parra I, Martínez I, Vásquez-Celaya L, et al (2023) Neuroprotective and Immunomodulatory Effects of Probiotics in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res* 41:187–200. <https://doi.org/10.1007/S12640-022-00627-Y>
- Peterson CT (2020) Dysfunction of the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurodegenerative Disease: The Promise of Therapeutic Modulation With Prebiotics, Medicinal Herbs, Probiotics, and Synbiotics. *J evidence-based Integr Med* 25:. <https://doi.org/10.1177/2515690X20957225>
- Quigley EMM (2017) Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17:. <https://doi.org/10.1007/S11910-017-0802-6>
- Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al (2016) Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00185>
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167:1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.018>
- Sancandi M, De Caro C, Cypaite N, et al (2023) Effects of a probiotic suspension Symprove™ on a rat early-stage Parkinson's disease model. *Front Aging Neurosci* 14:. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.986127>
- Schilderink R, Verseijden C, de Jonge WJ (2013) Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Front Immunol* 4:. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00226>
- Schintu N, Zhang X, Svenningsson P (2012) Studies of depression-related states in animal models of Parkinsonism. *J Parkinsons Dis* 2:87–106. <https://doi.org/10.3233/JPD-2012-12076>
- Seo MH, Kwon D, Kim SH, Yeo S (2023) Association between Decreased SGK1 and Increased Intestinal α -Synuclein in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 24:. <https://doi.org/10.3390/IJMS242216408>
- Shin WH, Chung KC (2020) Death-associated Protein Kinase 1 Phosphorylates α -Synuclein at Ser129 and Exacerbates Rotenone-induced Toxic Aggregation of

- α -Synuclein in Dopaminergic SH-SY5Y Cells. *Exp Neurobiol* 29:207–218.
<https://doi.org/10.5607/EN20014>
- Silva RS da, Mendonça IP, Paiva IHR de, et al (2023) Fructooligosaccharides and galactooligosaccharides improve hepatic steatosis via gut microbiota-brain axis modulation. *Int J Food Sci Nutr* 74:760–780.
<https://doi.org/10.1080/09637486.2023.2262779>
- Stewart ML, Savarino V, Slavin JL (2009) Assessment of dietary fiber fermentation: effect of *Lactobacillus reuteri* and reproducibility of short-chain fatty acid concentrations. *Mol Nutr Food Res* 53 Suppl 1:
<https://doi.org/10.1002/MNFR.200700523>
- Sun J, Li H, Jin Y, et al (2021) Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorated motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease via gut microbiota-GLP-1 pathway. *Brain Behav Immun* 91:703–715.
<https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.10.014>
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, et al (2014) The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol* 121:91–119. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>
- Tysnes OB, Storstein A (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 124:901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- Van Kessel SP, El Aidy S (2019) Bacterial Metabolites Mirror Altered Gut Microbiota Composition in Patients with Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 9:S359–S370. <https://doi.org/10.3233/JPD-191780>
- Vecchia DD, Kanazawa LKS, Wendler E, et al (2021) Ketamine reversed short-term memory impairment and depressive-like behavior in animal model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 168:63–73.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.12.011>
- Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, et al (2009) Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. *J Psychopharmacol* 23:295–304.
<https://doi.org/10.1177/0269881108089814>
- Wu Y, Zhang X, Han D, et al (2020) Short Administration of Combined Prebiotics Improved Microbial Colonization, Gut Barrier, and Growth Performance of Neonatal Piglets. *ACS omega* 5:20506–20516.
<https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C02667>
- Yang H, Li S, Le W (2022) Intestinal Permeability, Dysbiosis, Inflammation and

- Enteric Glia Cells: The Intestinal Etiology of Parkinson's Disease. *Aging Dis* 13:1381–1390. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.01281>
- Yin S, Ma X yue, Sun Y feng, et al (2023) RGS5 augments astrocyte activation and facilitates neuroinflammation via TNF signaling. *J Neuroinflammation* 20:. <https://doi.org/10.1186/S12974-023-02884-W>
- Zamanian MY, Terefe EM, Taheri N, et al (2023) Neuroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Pioglitazone on Parkinson's Disease: A Comprehensive Narrative Review of Clinical and Experimental Findings. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 22:1453–1461. <https://doi.org/10.2174/1871527322666221005122408>
- Zhang X, Tang B, Guo J (2023) Parkinson's disease and gut microbiota: from clinical to mechanistic and therapeutic studies. *Transl Neurodegener* 12:. <https://doi.org/10.1186/S40035-023-00392-8>
- Zhao Z, Ning J, Bao X qi, et al (2021) Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis. *Microbiome* 9:. <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01107-9>

4.2 ARTIGO 2 - Espada de dois gumes: a função complexa das células gliais entéricas nas doenças neurodegenerativas

Ingrid Prata Mendonça^{1,2}; Christina Alves Peixoto^{1,2*}

¹Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), PE, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

* Autor correspondente: Christina Alves Peixoto, Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-420. Número de telefone: (55) 81 21012557. E-mail: christina.peixoto@fiocruz.br

Ingrid Prata Mendonça, Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-420. Tel number: (55) 81 21012557. E-mail: ingrid.pmendonca2@ufpe.br.

Resumo

Nas últimas duas décadas, um número crescente de descobertas foram feitas sobre a comunicação bidirecional entre o Sistema Nervoso Entérico (SNE) e o Sistema Nervoso Central (SNC) no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Uma população de células pertencentes ao SNE, chamadas células gliais entéricas (EGCs), parece ser um participante importante nessa interação entre SNC e SNE. Esta revisão propõe uma discussão sobre: (1) o papel complexo de fenótipos distintos de células gliais entéricas envolvidas em doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (DH) e esclerose múltipla (EM); e, (2) quais são as potenciais estratégias terapêuticas envolvendo EGCs.

Palavras-chave: Células Gliais Entéricas; Eixo intestino-cérebro; Sistema Nervoso Entérico; Doenças Neurodegenerativas.

1. Introdução

O sistema nervoso entérico (SNE) é uma rede neural complexa composta de neurônios e células gliais entéricas (EGCs) que fornece controle local sobre as funções gastrointestinais regulando os reflexos entéricos (McClain et al. 2014; McClain et al. 2015), a homeostase sob condições fisiológicas (barreira intestinal, motilidade GI, etc.) e fisiopatológicas (Seguella e Gulbransen 2021). As EGCs têm um papel ativo no circuito neural intestinal (Gulbransen e Sharkey 2009; McClain et al. 2014) sendo suscetíveis à ativação por neurônios intrínsecos (de neurônios entéricos) ou neurônios extrínsecos (de neurônios autonômicos ou neurônios aferentes primários) (Delvalle et al, 2019).

Além disso, essas células integram uma rede de informações com neurônios, glia, células epiteliais e células imunes, por meio da sinalização de cálcio (Ochoa-Cortes et al. 2016; McClain et al. 2015). É importante ressaltar que as EGCs modulam o sistema imunológico intestinal e regulam a função da barreira epitelial (Grubišić e Gulbransen 2017a).

Embora dados atuais e vastos mostrem que as EGCs estão envolvidas na fisiopatologia gastrointestinal, muitas questões permanecem sobre o papel dessas células e suas interações neuroimunes em doenças extraintestinais, como doenças neurodegenerativas. Nesta revisão, focamos em estudos disponíveis sobre as alterações neuroplásticas das EGCS presentes no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA), esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (DH) e esclerose múltipla (EM).

2. Células Gliais Entéricas

Embora as EGCs compartilhem a mesma origem genética (de células progenitoras da crista neural bipotenciais), as células gliais são adaptadas a microambientes distintos. Portanto, para manter a homeostase local, elas adquirem subtipo específico (Boesmans et al. 2015).

As EGCs estão localizadas na mucosa intestinal e dentro dos gânglios ENS, nas camadas submucosa (plexo submucoso) e muscular (plexo mioentérico). Conforme mostrado na **figura 1**, os EGCs são classificados basicamente em quatro subtipos principais com base em suas características morfológicas e anatômicas: EGCs tipo I, localizados em gânglios entéricos que dão suporte à neurotransmissão do sistema nervoso entérico e atividades reflexivas gastrointestinais (Fung et al. 2017; Delvalle et al. 2018), e desempenham um papel na neuroinflamação (Langness et al. 2017) e na neurogênese (Le Berre-Scoul et al. 2017); EGCs interganglionares tipo II, localizados dentro de feixes de fibras nervosas que conectam gânglios mioentéricos por meio da propagação de sinais (Gulbransen e Sharkey 2009); as células gliais mucosas tipo III que regulam a diferenciação epitelial, migração, adesão e proliferação, fornecendo suporte à integridade da barreira intestinal epitelial (Grubišić e Gulbransen 2017b; Savidge et al. 2007; Liu et al. 2013), também modulando as respostas imunes e a sinalização neuroendócrina (Ibiza et al. 2016; Boesmans et al. 2019), as células gliais intramusculares tipo IV estão localizadas ao longo dos nervos na camada muscular cuja função ainda não é conhecida, mas parecem desempenhar funções semelhantes às células de Schwann não mielinizantes (Seguella e Gulbransen 2021).

A unidade neuronal-glial-epitelial é um modulador potente das funções epiteliais intestinais, incluindo a permeabilidade intestinal. Um conjunto de evidências confirma o papel crucial dos EGCs na manutenção da função da barreira epitelial intestinal, de modo que a ablação genética dos EGCs leva a uma perda dramática da integridade da barreira epitelial, indicando que sua perda ou disfunção pode contribuir para a doença inflamatória intestinal (Aubé et al. 2006; Bush et al. 1998).

As EGCs secretam fatores como o ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), que é um metabólito de ácido graxo poliinsaturado (PUFA) produzido a partir da lipoxigenase-15 (15-LOX). O 15-HETE favorece a integridade da barreira epitelial,

a resistência elétrica transepitelial e diminui a permeabilidade da barreira epitelial intestinal. Os altos níveis de 15-HETE produzidos por EGCs diminuem a permeabilidade epitelial intestinal em um meio inflamatório por meio de um aumento na expressão de zonula occludens-1 (ZO-1) pela inibição de uma proteína quinase de monofosfato de adenosina (AMPK) (Pochard et al. 2016). No entanto, outro estudo corroborou essa inibição de AMPK por 15-HETE, demonstrando que o uso de um inibidor de 15-LOX (ácido nordi-hidroguaiarético) induz a fosforilação e ativação de AMPK (Dashtipour et al. 2015). De fato, Pochard e cols. mostraram que o defeito da produção de 15-HETE pelas células gliais entéricas da doença de Crohn é responsável pelo aumento da permeabilidade da barreira epitelial intestinal (Pochard et al. 2016).

EGCs também secretam a s-nitrosoglutathiona derivada da glia (GSNO) que mantém a função da barreira da mucosa intestinal e protege contra inflamação (Savidge et al. 2007; Li et al. 2016). GSNO regula a integridade da junção estreita e a barreira da mucosa por meio do aumento da expressão de F-actina e proteínas associadas à junção estreita ZO-1 e ocludina. Além disso, GSNO atenuou significativamente a permeabilidade e restaurou a barreira da mucosa em espécimes de biópsia colônica de pacientes com doença de Crohn, um distúrbio de permeabilidade inflamatória bem conhecido associado à ruptura da rede de células gliais entéricas (Savidge et al. 2007).

O Fator Neurotrófico Derivado da Glia é outro fator crucial secretado pela liberação de EGCs (GDNF), que contribui diretamente para restaurar a integridade da barreira epitelial ao diminuir a permeabilidade epitelial e suprimir a resposta inflamatória da mucosa. Zhang et al (2010) administraram vetores adenovirais recombinantes intracoloniais codificando GDNF (Ad-GDNF) em colite experimental induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS). Esses autores descobriram que o GDNF reduziu significativamente a permeabilidade intestinal, inibiu a atividade de MPO, a expressão de IL-1beta e TNF-alfa e aumentou a expressão de ZO-1 e Akt (Zhang et al. 2010). Além disso, o GDNF preveniu fortemente a apoptose in vivo e atenuou a colite experimental. De acordo com esses resultados, o GDNF participa diretamente da restauração da função da barreira epitelial, reduzindo a permeabilidade epitelial e a inflamação da mucosa. Outro estudo mostrou que no intestino inflamado de pacientes com barreira epitelial intestinal (IEB) prejudicada, há uma diminuição nos níveis de GDNF associados à redução da proteína juncional desmossômica

desmogleína 2 (DSG2), aumento de p38 MAPK e citoqueratinas. Da mesma forma, o desafio das células Caco2 com citocinas pró-inflamatórias apresentou fosforilação de citoqueratina induzida por inflamação pela ativação de p38 MAPK, o que levou à perda de DSG2. Por sua vez, o GDNF restaurou a perda induzida por inflamação de DSG2 na borda celular in vivo e in vitro, resultando em aumento da adesão célula-célula (Meir et al. 2019).

A interação neurônio-glia também desempenha um papel fundamental na regulação da contratilidade intestinal e na modulação do trânsito colônico. Neurotransmissores como acetilcolina (ACh) e ATP liberados por neurônios excitatórios ativam a glia entérica por meio de alterações nas respostas de Ca^{2+} gliais, que, por sua vez, induzem a liberação de gliotransmissores como ATP e GABA por meio de canais de membrana compostos de conexina 43 (Cx43) (Brown et al. 2016a; Fried et al. 2017). Esses gliotransmissores atuam nos receptores P2X2/3 e GABAA expressos em neurônios excitatórios na motilidade ascendente (Auteri et al. 2015; King 2015). Alguns estudos mostraram que a ablação específica da glia do gene que codifica a conexina-43 (Cx43) limita a propagação das respostas de Ca^{2+} na rede glial e, por sua vez, induz a interrupção da motilidade intestinal e constipação em camundongos (McClain et al. 2014; McClain et al. 2015).

Em geral, a glia entérica é quase sempre ativada, mantendo a homeostase por meio do monitoramento de sinais extracelulares que desencadeiam cascatas fisiológicas de transdução de sinal intracelular, como aquelas mediadas por Ca^{2+} e AMPc para modular os reflexos intestinais e manter a homeostase (McClain et al. 2015; Delvalle et al. 2018). A gliose entérica reativa, em contraste, é a resposta deletéria na qual a glia exibe funções pró-inflamatórias aumentadas e interage com linfócitos, macrófagos e células assassinas naturais (NK) (Ding et al. 2018). Os critérios que definem a gliose entérica reativa incluem alterações na morfologia e/ou expressão de marcadores como GFAP e S100 β (Baydas et al. 2003; de Filippis et al. 2011); no entanto, tais critérios ainda são discutíveis (Seguella e Gulbransen 2021).

Os EGCs compartilham semelhanças com astrócitos, como a presença de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de ligação ao cálcio S100 β , acoplamento de junção comunicante e, após a ativação, expressam marcadores de células gliais e liberam citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-1 β e IL-6 (Hanani e reichenbach 1994; Gulbransen e Sharkey 2009; Grubišić et al. 2020). De acordo com seu estado de ativação, os EGCs podem fornecer suporte neurotrófico ou responder a estímulos

de danos, como inflamação (Grubišić e Gulbransen 2017b; Brown et al. 2016b), infecção (Selgrad et al. 2009) e câncer (Valès et al. 2019), nos quais adquirem um fenótipo pró-inflamatório ou pró-tumorigênico.

A associação entre glia intestinal reativa e doenças neurodegenerativas é evidente. Na doença de Parkinson, a constipação crônica está presente muitos anos antes do desenvolvimento de sintomas motores, o que está associado ao aumento do fenótipo glial reativo e à expressão de GFAP regulada positivamente em biópsias intestinais humanas (Clairembault et al. 2014; Clairembault et al. 2015). Da mesma forma, em um camundongo transgênico com superexpressão do precursor da proteína β -amiloide (A β PP), um modelo animal da doença de Alzheimer, descobriu-se que a GFAP era regulada positivamente no ENS (Semar et al. 2013).

A proteína de ligação ao cálcio S100 β em concentrações nanomolares promove a sobrevivência neuronal e o crescimento de neuritos, e estimula a proliferação glial; no entanto, em quantidades micromolares da proteína S100 β , ela está associada a várias neuropatologias, como a doença de Alzheimer e a síndrome de Down. No intestino, a expressão regulada positivamente e a liberação de S100 β em concentrações micromolares por EGCs se ligam ao RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada), levando à fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e consequente translocação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) que, por sua vez, ativa a transcrição de citocinas inflamatórias, iNOS e também S100 β (Cirillo et al. 2011a; Cirillo et al. 2011b). Em pacientes com doença celíaca e colite ulcerativa, EGCs modulam a inflamação dependente de NO por meio da superexpressão e liberação de S100 β (Esposito et al. 2007; Cirillo et al. 2009). Por sua vez, microorganismos patogênicos, lipopolissacarídeos (LPS) e outros produtos bacterianos ativam a sinalização TLR-S100 β -RAGE em EGCs e, subsequentemente, ativam as vias pró-inflamatórias MyD88 e NF- κ B a jusante. Alguns dados apoiam a ativação de EGCs pela via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B na hipersensibilidade visceral (VH), um contribuinte significativo para a síndrome do intestino irritável (IBS) em um modelo de rato induzido por estresse (Xu et al. 2018).

EGCs ativados também produzem fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), que também contribui para a hipersensibilidade visceral persistente e ativação imunológica (Grubišić et al. 2020). Além disso, EGCs aumentam a liberação de ATP que pode atuar nos receptores de purina P2X7 (P2X7R) para desencadear o efluxo de K⁺ e a subsequente montagem do NLRP3-inflamassoma e liberação de IL-

18 e IL-1 β por macrófagos e outras células imunes, aumentando assim a inflamação intestinal (Adinolfi et al. 2018). O aumento da liberação de ATP por EGCs ativados também promove a atividade de iNOS e a liberação de NO (Brown et al. 2016c).

Em resumo, os dados da pesquisa destacam o amplo impacto dos EGCs, revelando seu papel funcional na regulação de mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos. Isso inclui seu envolvimento em distúrbios gastrointestinais ou inflamação e seu papel potencial em doenças extra-gastrointestinais, como doenças neurodegenerativas.

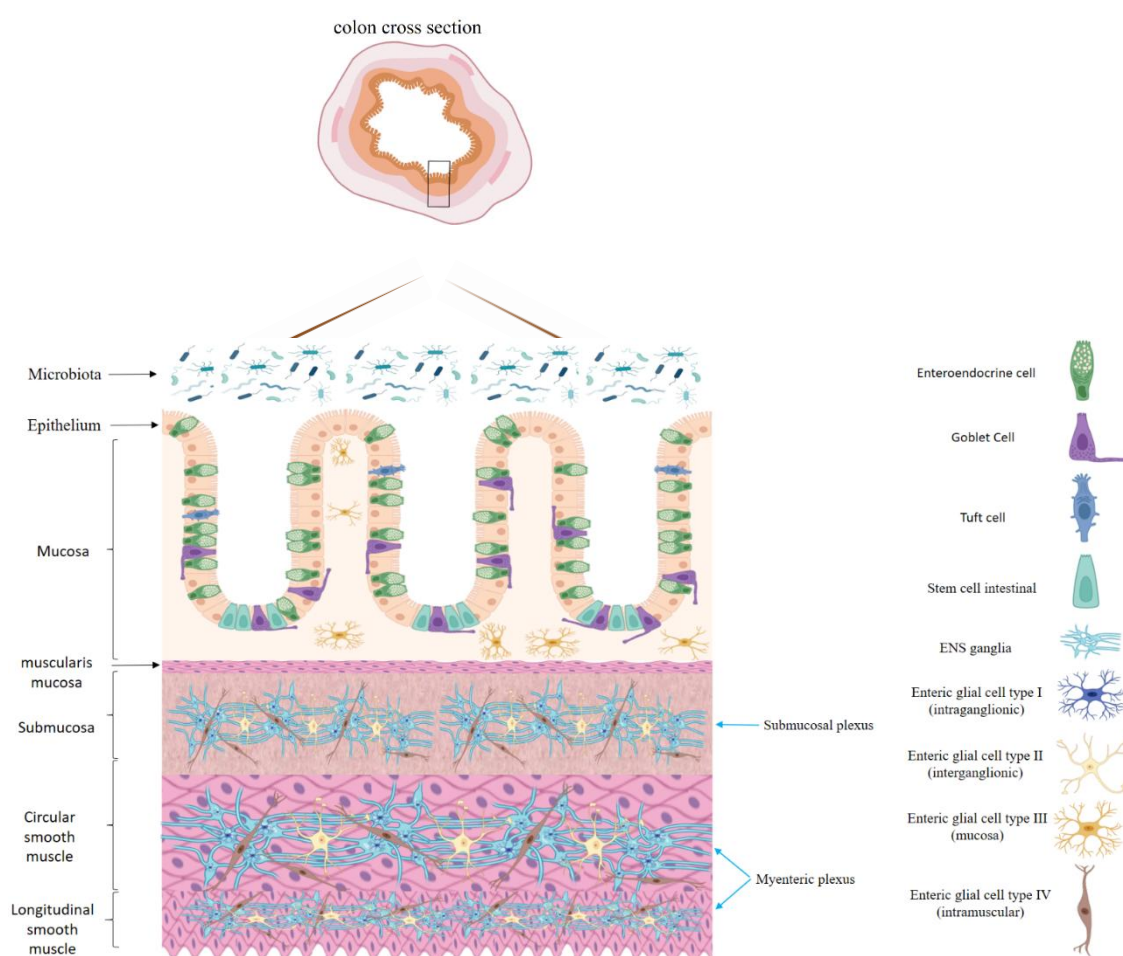


Figura. 1 Localização e classificação dos EGCs ao longo das camadas da parede intestinal na região do cólon: células enteroendócrinas, células caliciformes, células de tufo e células-tronco formam a barreira epitelial intestinal (epitélum) que fornece proteção contra microbiota e toxinas alimentares. Os EGCs tipo III são encontrados dentro da camada mucosa e interagem diretamente com células do epitélio intestinal.

Os EGCs tipo I estão localizados dentro dos gânglios (intraganglionares) e participam de sinapses entre neurônios ganglionares, que também estão presentes no plexo submucoso e mioentérico. Os EGCs tipo II estão localizados entre os gânglios (interganglionares). E os EGCs tipo IV estão localizados entre as camadas musculares.

3. Como as Células Gliais Entéricas participam do eixo intestino-cérebro?

A comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro ocorre por meio de diferentes mecanismos, incluindo vias neurais, imunológicas e endócrinas (Cryan et al. 2019). Portanto, o conceito do eixo microbiano-intestino-cérebro (MGB) foi proposto e se tornou um importante ponto de pesquisa no campo das doenças neurodegenerativas (Kowalski e Mulak 2019; Nagu et al. 2021), embora o mecanismo envolvido não esteja completamente claro. A disbiose intestinal tem uma associação próxima com a neuroinflamação e o comprometimento cognitivo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como DP, DA, EM, entre outras (Maiuolo et al. 2021). Mudanças na estrutura e função da microbiota levam ao aumento da produção de substâncias biológicas, como Lipopolissacarídeos (LPS), que interrompem a homeostase intestinal e afetam o sistema nervoso central através do eixo MGB, desencadeando o processo patológico de doenças neurodegenerativas, como inflamação, amiloide e acúmulo de proteína Tau no cérebro (Friedland 2015; Xu e Wang 2016). O LPS se liga aos receptores toll-like 4 (TLR-4) e ativa o fator de transcrição kappa B (NF- κ B), desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias e iniciando uma cascata de sinalização na célula inflamatória, resultando na síntese de IL-17, IL-1 β , TNF- α e óxido nítrico (Nishimori et al. 2012; Schachter et al. 2018; Kesika et al. 2021).

Curiosamente, o TLR4 também é expresso por EGCs. O estudo de Kovler e colegas (2021) mostrou que a glia entérica tem papéis críticos na regulação da motilidade intestinal e inflamação na enterocolite necrosante (NEC), uma doença grave de bebês prematuros. A perda de glia entérica mediada por TLR-4 no intestino prematuro pode levar à dismotilidade, precedendo o início da inflamação intestinal. A gravidade da perda de glia entérica da NEC também está correlacionada à depleção de amostras humanas de glia entérica e cepas de camundongos com deficiência de

glia (Kovler et al. 2021). Além do TLR4, as EGCs in vitro também aumentam a expressão de TLR2, MHC-II e TNF- α quando estimuladas com LPS e, na presença de linfócitos T CD4⁺ ingênuos, as EGCs atuam como células apresentadoras de antígenos, induzindo as células T CD4⁺ a secretar interleucinas inflamatórias, como IL-2 e IL-17 (Yang et al. 2022).

Na mesma linha, está bem estabelecido que a inflamação e os distúrbios intestinais desempenham um papel significativo no desenvolvimento de processos inflamatórios e degenerativos no cérebro. Essa conexão foi demonstrada em vários estudos com foco em doenças metabólicas, neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Paiva et al. 2024; Peirce e Alviña 2019; Marogianni et al. 2020; Sochocka et al. 2019). O meio inflamatório intestinal, desencadeado por LPS e outros metabólitos microbianos, induz gliose reativa de EGCs, levando ao aumento de marcadores citoplasmáticos como GFAP e inflamação sistêmica e do sistema nervoso central (Dodiya et al. 2020). Um estudo in vitro avaliando o perfil de expressão gênica de EGCs cultivados na presença de LPS revelou cerca de 70 genes expressos diferencialmente, além da secreção de citocinas no sobrenadante (Rosenbaum et al. 2016).

Além disso, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato, são metabólitos produzidos por algumas espécies de bactérias intestinais (Foster e McVey Neufeld 2013). Os AGCC regulam a motilidade intestinal e a integridade da barreira epitelial, funções também compartilhadas com EGCs. Curiosamente, os EGCs também expressam receptores acoplados à proteína G (GRP41 e GRP109) para AGCCs (Cossais et al. 2016). Além disso, os AGCCs desempenham papéis regulatórios importantes na inflamação local e sistêmica (Zhang et al. 2024). Portanto, uma microbiota saudável e um nível adequado de AGCCs são essenciais para a saúde do hospedeiro.

Cossais et al., destacaram que os AGCCs podem modular a proliferação de EGCs em modelo de rato. Neste estudo, o butirato inibiu a proliferação de EGC em ratos saudáveis 7 dias pós-natal; pois o cólon desses animais apresentou diminuição das células KI67/SX10⁺, marcador de proliferação e EGCs, respectivamente. Entretanto, a expressão de GFAP e S100 β , não foram alteradas, indicando que não houve diminuição da maturação (Cossais et al. 2016). Entretanto, estudos in vitro com linhagem celular derivada de glioma humano demonstraram que o butirato reduziu os níveis de GFAP e S100 β em 50% e 40%, respectivamente (Hirschfeld e Bressler

1987). Portanto, o papel dos AGCCs na função dos EGCs na saúde e na doença parece ser complexo e multifatorial.

O Sistema Nervoso Autônomo, por meio do nervo vago, cujas fibras inervam grande parte do trato gastrointestinal, também participa da disseminação de processos patológicos intestinais para o SNC, conforme demonstrado por estudos de vagotomia. No modelo experimental da doença de Parkinson, a interrupção do nervo vago impediu a disseminação da α -sinucleinopatia para o cérebro. Além disso, a vagotomia também impediu o comportamento depressivo em animais com disbiose intestinal (Kim et al. 2020; Yang et al. 2023). Curiosamente, parece haver algo em comum entre EGCs e o nervo vago na comunicação intestino-cérebro, conforme sugerido por Claudino dos Santos et al (2023), neste estudo, os autores mostraram que o acúmulo de proteínas mal dobradas, como a α -sinucleína, pode ocorrer inicialmente no ENS (neurônios e glia entérica) e posteriormente ascender ao SNC através do nervo vago (Claudino dos Santos et al. 2023). No entanto, é importante notar que nossa compreensão dos mecanismos e vias de sinalização através dos quais ocorre a comunicação entre a glia entérica, o nervo vago e regiões cerebrais específicas ainda está em constante evolução e sob investigação.

4. Influência das Células Gliais Entéricas em doenças neurodegenerativas

EGCs participam direta ou indiretamente de diversas patologias do SNC, incluindo aquelas que envolvem o eixo intestino-cérebro. Abaixo, discutiremos como EGCs podem influenciar o processo patológico em algumas doenças neurodegenerativas. A Tabela 1 resume os principais resultados deste tópico.

4.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressivamente incapacitante, que aumenta com a idade e afeta 1% da população acima de 60 anos. Pacientes com DP apresentam uma ampla gama de sintomas que podem ser motores (como bradicinesia, tremores e fraqueza muscular) e não motores (como depressão, comprometimento cognitivo e distúrbios gastrointestinais) (Tysnes e Storstein 2017). Estudos recentes têm mostrado cada vez mais o envolvimento do

sistema gastrointestinal na DP, mesmo décadas antes do início dos sintomas motores, o que está associado ao aumento do fenótipo glial reativo e à expressão de GFAP regulada positivamente em biópsias intestinais humanas (Clairembault et al. 2014; Clairembault et al. 2015). Além disso, pacientes e modelos animais apresentam inflamação intestinal, constipação e disbiose (Hong et al. 2022; Zhao et al. 2021b).

Conforme mencionado anteriormente, as EGCs são essenciais para manter a homeostase intestinal. Além disso, as EGCs produzem moléculas que regulam o reparo do tecido e a defesa do hospedeiro. Essas funções e a reatividade das EGCs parecem estar alteradas na DP (Claudino dos Santos et al., 2023).

Geralmente, as funções das EGCs dependem do seu estado de ativação; elas podem ser ativadas, reativas ou disfuncionais. A glia ativada ou reativa tem funções fisiológicas e defensivas dentro do ENS, e a glia disfuncional pode ser responsável por patologias como DP, distúrbios gastrointestinais e distúrbios imunológicos intestinais. Curiosamente, as principais características da glia disfuncional são redes gliais entéricas alteradas (Montalbán-Rodríguez et al. 2024).

No modelo de camundongos induzidos por DP 6-OHDA, Thomasi e colegas (2022) observaram alguns eventos gastrointestinais, como infiltrado inflamatório e aumento de células GFAP-positivas com morfologia ameboide com menos ramificações e corpos celulares arredondados na mucosa colônica do que aqueles observados no grupo controle (Thomasi et al. 2022). Outro modelo experimental de DP, induzido por rotenona, também mostrou aumento da expressão de α -sinucleína e GFAP no cólon de camundongos (Dodiya et al. 2020).

Em 2013, um estudo humano pioneiro mostrou que os marcadores gliais GFAP, S100 β e Sox-10 e os níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β , IL6 e IFN- γ estão aumentando no cólon de pacientes com DP em diferentes graus da doença. Isso revelou uma forte relação entre células gliais e inflamação intestinal, incluindo "glio-neuro-gastroenterologia" (Devos et al. 2013).

A presença de glia reativa, bem como o aumento de citocinas e vias inflamatórias no trato gastrointestinal, também estão relacionados ao acúmulo de α -sinucleína, uma proteína que, em seu estado agregado, causa disfunção neuronal, neurodegeneração e é um dos marcadores neuropatológicos da DP (Olanow e Brundin 2013). De acordo com a hipótese de Braak, produtos microbianos intestinais podem entrar em contato com neurônios entéricos e desencadear a agregação de α -sinucleína. A α -sinucleína agregada se espalha em direção ao sistema nervoso central

através do nervo vago e atinge a substância negra e outras regiões do cérebro (Rietdijk et al. 2017). Embora o cólon seja a região do intestino mais estudada considerando as hipóteses de Braak, uma região pouco estudada do intestino, o duodeno, também recebe inervação do nervo vago. Biópsias duodenais de pacientes com DP relataram aumento de α -sinucleína e GFAP, confirmando a hipótese de que, além da inflamação, o acúmulo de α -sinucleína também está relacionado à gliose entérica na DP (Emmi et al. 2023).

É importante destacar que uma das principais funções de alguns subtipos de EGCs é potencialmente modular as respostas imunes. Os receptores Toll-like, expressos nos EGCs, desencadeiam respostas imunes/inflamatórias na manutenção da integridade da barreira intestinal e da configuração da microbiota intestinal (Montalbán-Rodríguez et al. 2024). Assim, pode-se considerar que qualquer estímulo inflamatório no microambiente intestinal resultará da ativação dos EGCs.

4.2 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum e a causa mais comum de demência, afetando 30 milhões de pessoas em todo o mundo. O principal fenótipo clínico na apresentação é o fenótipo amnésico direcionado à memória episódica (Villain e Dubois 2019). Na doença de Alzheimer (DA), parece haver uma relação ainda mais forte entre patologia cerebral e EGCs. Enquanto na DP, a microglia desempenha um papel iniciador na neuroinflamação, o astrócito é a "estrela do show" na DA. Estudos no cérebro post-mortem de pacientes com DA identificaram depósitos de A β no citoplasma de astrócitos cerebrais (Nagele et al. 2003; Simpson et al. 2010).

Afinal, como os EGCs participam da patologia da DA? As EGCs são algumas vezes chamadas de "células semelhantes a astrócitos", pois se assemelham aos astrócitos em sua morfologia e padrão de expressão proteica (Esposito et al. 2016). Uma revisão recente (2023) discute que mediadores inflamatórios liberados por EGCs podem ascender por meio de vias de comunicação intestino-cérebro e causar astrogliose e neuroinflamação no SNC, assim como mediadores liberados por astrócitos no SNC podem causar alterações em EGCs por meio de vias descendentes, portanto, uma comunicação bidirecional entre astrócitos e EGCs.

Até o momento, nenhum estudo demonstrou alterações histológicas em EGCs,

como aumento de GFAP, S100- β e GDNF em pacientes com DA; no entanto, esses dados são de modelos animais. Em um modelo genético de DA (mutação do gene TgCRND8), Semar e cols demonstraram a ativação da glia entérica, ativação de vias inflamatórias intestinais e perda neuronal, além de forte expressão da proteína β -amiloide (Semar et al. 2013). Neste mesmo estudo, foi observado que a expressão da proteína β -amiloide no ENS foi mais pronunciada em animais jovens em comparação com animais adultos, sugerindo um início precoce da doença. Em um estudo mais recente (2021), D'Antongiovanni e colaboradores também observaram, em camundongos SAMP8, um modelo genético espontâneo de DA, aumento da expressão de S100- β e um aumento de mediadores inflamatórios derivados da glia no tecido colônico do camundongo, bem como em EGCs cultivados (D'Antongiovanni et al. 2021).

Embora haja evidências do envolvimento de EGC em modelos animais, os dados sobre patologia intestinal em humanos com DA são escassos; no entanto, existem estudos de revisão que também abordam a necessidade de desenvolver estudos clínicos longitudinais para uma avaliação minimamente invasiva para avaliar a patologia intestinal em pacientes com DA, incluindo a investigação do perfil de EGC nesses pacientes (Xie et al. 2022).

4.3 Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é considerada uma doença degenerativa do sistema nervoso, que causa paralisia motora progressiva, irreversível e limitante, tornando-a uma das doenças mais temidas conhecidas (Feldman et al. 2022). Apesar de ser amplamente estudada, a etiopatogenia da ELA permanece pouco compreendida; no entanto, nos últimos anos, pesquisas têm mostrado que um dos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da ELA é a inflamação intestinal (Chen et al. 2024).

O primeiro estudo envolvendo homeostase intestinal e progressão da ELA foi publicado em 2015, em um modelo murino com a mutação humana SOD1G93A, no qual os autores observaram estrutura de junção estreita danificada e aumento da permeabilidade com redução significativa nos níveis de expressão da proteína de junção estreita ZO-1 e da proteína de junção aderente E-caderina (Wu et al. 2015).

Recentemente, um grupo de pesquisa usando camundongos ALS que

expressam o mutante humano de proteína de ligação ao DNA de resposta transativa de 43 kDa (hmTDP43) mostrou uma expressão aumentada das proteínas GFAP e TDP43 e uma diminuição de α -SMA, um marcador de músculo liso, no cólon de camundongos mutantes, sugerindo uma relação entre gliose de EGC, proteína de agregação e perda muscular. Curiosamente, neste mesmo estudo, o isolamento de EGCs desses animais mostrou aumento da agregação da expressão de hmTDP43, GFAP e IBA-1 (Zhang et al. 2024).

É importante destacar que, assim como em outras doenças neurodegenerativas, na ELA um dos principais componentes moleculares patológicos são inclusões intracitoplasmáticas de proteínas agregadas presentes em neurônios e células gliais, incluindo EGCs, levando a processos mais complexos dentro da célula como excitotoxicidade do glutamato, disfunção mitocondrial grave, desequilíbrio redox, alterações no metabolismo do RNA, maior ativação microglial e de astrócitos e desregulação da autofagia (Jeon et al. 2019; Chidambaram et al. 2022). Entretanto, ainda não está claro quais desses processos são os iniciadores da neurodegeneração.

Novamente, apesar das evidências em modelos animais e cultura de EGC, dados sobre patologia intestinal e gliose reativa em humanos ainda não foram obtidos, o que limita nossa discussão sobre o mecanismo de envolvimento de tais células na patologia da ELA. Entretanto, ressaltamos que os resultados pré-clínicos aqui apresentados apontam para a necessidade de estudos clínicos sobre o assunto.

4.4 Doença de Huntington (DH)

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa progressiva de origem autossômica dominante, caracterizada por sintomas como distúrbios do movimento, déficits cognitivos, anormalidades psiquiátricas e sintomas periféricos (incluindo disfunção gastrointestinal). Pacientes com DH frequentemente sofrem de diarreia crônica, constipação, distúrbios esofágicos e inflamação gástrica (Ekwudo et al. 2024).

Há fortes evidências de disbiose intestinal na DH em relação a esses distúrbios intestinais. A composição da microbiota pode ser complexa mesmo na presença de disbiose; por exemplo, o estudo de Du et al. (2021) encontrou aumento da diversidade α (riqueza), diversidade β (estrutura) e abundância relativa alterada em vários táxons

em pacientes com DH em comparação com aqueles em controles saudáveis. Além disso, observou-se que a abundância relativa de *Intestinomonas* e *Bilophila* se correlacionou com altas concentrações de IL-4 e IL-6, nesses pacientes, sugerindo que alterações na microbiota intestinal estão associadas à ocorrência de um estado inflamatório crônico sistêmico (Du et al. 2021). Em contraste, outro estudo analisou 42 pacientes com DH e encontrou menor diversidade alfa (riqueza) em amostras de fezes, com alterações na microbiota sendo correlacionadas com sinais clínicos e desempenho cognitivo (Wasser et al. 2020).

Já está estabelecido que processos inflamatórios também estão presentes na DH, incluindo inflamação intestinal e altos níveis de citocinas no plasma dos pacientes (Björkqvist et al. 2008; Du et al. 2021). A disbiose intestinal pode levar à produção exacerbada de LPS por bactérias patogênicas, o LPS desencadeia processos inflamatórios intestinais ao se ligar aos receptores toll-like tipo 4 (TLR-4), aumentando a expressão de citocinas inflamatórias no microambiente intestinal (Paiva et al. 2024).

Os EGCs possuem TLR-4 em sua superfície, e sua participação na patologia intestinal da DH pode ser um elo ainda não explorado em modelos experimentais. No entanto, sabe-se, por exemplo, que a ativação do TLR4 em células gliais entéricas promove colite necrosante e está associada à redução da produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o que também foi observado em pacientes em DH (Kovler et al. 2021; Bates et al. 2015).

Dados associando diretamente a ELA aos EGCs são escassos, mas isso representa uma lacuna que deve ser mais investigada, uma vez que os pacientes apresentam diversos sintomas gastrointestinais. Considerando que o envolvimento dos EGCs em processos patológicos intestinais é indiscutível, conforme apresentado nesta revisão, é provável que alterações funcionais nos EGCs existam em modelos animais e pacientes.

4.5 Esclerose Múltipla (EM)

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune do sistema nervoso central de natureza neurodegenerativa. Além dos sintomas motores, sensoriais e cognitivos, a disfunção intestinal em pacientes com EM é altamente prevalente, como constipação e incontinência fecal, que podem coexistir e se alternar, impactando a qualidade de vida do paciente e as interações sociais, além de sobrecarregar os

cuidadores (Spear et al. 2018; Preziosi et al. 2018). As alterações do microbioma intestinal na EM também estão associadas a disfunções intestinais, como em outros distúrbios neurodegenerativos exemplificados em outros lugares (Montgomery et al. 2024).

O principal evento molecular que ocorre na EM é a produção de autoanticorpos, incluindo contra a proteína proteolipídica da mielina (PLP), a proteína mais abundante na mielina do sistema nervoso central (Greer e Pender 2008). O ENS, por sua vez, não tem mielina, mas a glia entérica compartilha similaridades transcricionais com astrócitos e oligodendrócitos, incluindo a expressão de GFAP, PLP1 e proteína básica de mielina (MBP) (Jessen e Mirsky 1980; Rao et al. 2015).

Recentemente, em um modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), um estudo mostrou uma contribuição do fator de maturação glial (GMF- β), que aumenta as respostas pró-inflamatórias e exacerba a patologia intestinal no modelo de EAE. Neste estudo, a inibição do fator de maturação glial (GMF- β) reverteu os sintomas intestinais, diminuindo a permeabilidade epitelial, restaurando a proteína de junção estreita ZO-1, melhorando a disbiose intestinal e a regulação positiva das células Treg (Subhramanian et al. 2023).

Além disso, Spear e colegas (2018) observaram uma diminuição de GFAP no cólon de camundongos induzidos com EAE em paralelo com o desenvolvimento de constipação. Para investigar se essa diminuição era devido à autoimunidade, o soro de pacientes com EM foi analisado, e a presença de autoanticorpos contra células gliais entéricas foi detectada (Spear et al. 2018).

Ao contrário das outras doenças mencionadas ao longo do artigo, o aumento de EGCs, conhecido como gliose, não está bem estabelecido como um fator importante na EM. No entanto, está claro que essas células sofrem uma mudança significativa na função, particularmente na presença de disfunções intestinais, o que pode ter um impacto profundo no desenvolvimento da EM. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para detalhar como as disfunções gliais ocorrem na EM.

Tabela 1: Envolvimento das EGCs nas principais doenças neurodegenerativas.

Doença	Organismo/modelo	Principais resultados envolvendo EGCs	Autores
Doença de Parkinson	Camundongos/6-OHDA	Infiltrado inflamatório e aumento de células GFAP-positivas com morfologia amebóide com menos ramificações e corpos celulares arredondados na mucosa colônica.	Thomasi et al., 2022.
Doença de Parkinson	camundongo/Rotenone	Aumento da expressão de α -sinucleína e GFAP no cólon de camundongos	Dodiya et al, 2020
Doença de Parkinson	pacientes/ biopsias	Os marcadores gliais GFAP, S100 β e Sox-10 e os níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β , IL6 e IFN- γ estão aumentando no cólon	Devos et al., 2013
Doença de Alzheimer	camundongos/ TgCRND8 modelo genético	Ativação da glia entérica, ativação das vias inflamatórias intestinais e perda neuronal, além da forte expressão da proteína β -amiloide no cólon	Semar et al., 2013
Doença de Alzheimer	camundongo/ SAMP8 modelo genético e EGCs em cultura	Aumento da expressão de S100- β e aumento de mediadores inflamatórios derivados da glia no tecido colônico do camundongo	D'Antongiovanni et al, 2021
Doença de Alzheimer	camundongo/ hmTDP43 modelo genético e EGCs em cultura	Aumento da expressão das proteínas GFAP e TDP43 e diminuição de α -SMA, um marcador do músculo liso, no cólon de camundongos. Agregação de hmTDP43 e aumento da expressão de GFAP e IBA1 in vitro.	Zhang et al, 2024
Esclerose Múltipla	camundongo/ Encefalomielite Autoimmune Experimental (EAE)	Aumento do fator de maturação glial (GMF- β), que aumenta as respostas pró-inflamatórias e exacerba a patologia intestinal, aumento da permeabilidade epitelial, diminuição da proteína de junção estreita ZO-1	Subhranian et al. 2023
Esclerose Múltipla	Mice/ Experimental Encefalomielite Autoimmune Experimental (EAE) e soro de pacientes com esclerose múltipla	Em camundongos, diminuição da GFAP no cólon de camundongos induzida por EAE em paralelo ao desenvolvimento de constipação. No soro de pacientes com SM, presença de autoanticorpos contra células gliais entéricas.	Spear et al., 2018

5. Fenótipos dualísticos das Células Gliais Entéricas

Até agora, foi discutido como EGCs contribuem prejudicialmente para os processos patológicos de doenças neurodegenerativas, no entanto, EGCs em si também podem promover efeitos benéficos. Conforme demonstrado por Kovler e colegas (2021), o BDNF produzido por EGCs protege contra inflamação intestinal e inibe o desenvolvimento de colite necrosante (Kovler et al. 2021). Além disso, em contraste com a influência de EGCs na patologia de DA, EGCs também foram estudados como um tipo de tratamento para DA em um modelo de camundongo, no qual o transplante autólogo dessas células no cérebro de camundongos com DA reduziu o número de placas e emaranhados de A β , bem como atenuou a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Esposito et al. 2016).

EGCs presentes no ENS e identificados pela expressão de GFAP desempenham um papel importante na manutenção da integridade epitelial intestinal (Yu e Li 2014). Cheadle e colegas (2013) observaram que adicionar monocamada de EGCs a células epiteliais preveniu a diminuição na expressão de proteínas de junção estreita ocludina e zônula-occludina causada por toxinas (Cheadle et al. 2013). Um estudo recente com modelo de camundongos C57BL/6 mostrou que a melhora da colite ulcerativa foi associada à produção de GDNF a partir de EGCs (Li et al. 2020).

Assim, moléculas produzidas pelos próprios EGCs também têm o potencial de atenuar processos inflamatórios intestinais. Isso também parece verdadeiro para a modulação da inflamação realizada por EGCs. O perfil transcricional da glia entérica reativa de camundongos e humanos sugere que essas células podem produzir citocinas e/ou neurotrofinas que contribuem para a neuroplasticidade durante a inflamação (Delvalle et al. 2018), e a glia entérica ativada pode produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, mas os efeitos específicos das citocinas e/ou quimiocinas derivadas da glia não estão bem definidos. Algumas citocinas gliais, como IL-1 β e IL-6, podem aumentar a excitabilidade neuronal (Murakami et al. 2008), enquanto outras, como CXCL2, CXCL10, IL-22 e IL-23, têm um papel imunossupressor local (Keramarrec et al. 2016).

Um estudo recente mostrou que EGCs podem ser fenótipos E1 e E2 polarizados semelhantes ao macrófago ativado clássico (M1) e macrófago ativado alternativo (M2). EGCs expostos a LPS aumentaram significativamente as expressões

dos marcadores E1 CD16, CD32, CD80, CD86 MHC II e iNOS, enquanto reduziram os níveis dos marcadores E2 Arg1 e CD206. No entanto, a ativação do receptor GABAB (GABABR) pode modular a polarização de EGCs para o fenótipo E2 por meio da supressão da via NF- κ B, protegendo assim contra a inflamação intestinal induzida por LPS. A ativação de GABAR inibiu significativamente os níveis de mRNA de fatores pró-inflamatórios (IL-6 e IL-1 β), GFAP e GDNF, enquanto não exibiu efeitos no fator anti-inflamatório (TGF- β) e S100 β , sugerindo que GABAR regula a sinalização de EGCs durante a inflamação. Além disso, análises *in vivo* demonstraram que em camundongos induzidos por LPS, a ativação de GABABR mitigou o dano intestinal por meio da modulação das expressões de fatores inflamatórios, fortalecendo os níveis de sIgA e IgG, por meio da inibição da via NF- κ B, facilitando a polarização de EGCs no fenótipo E2 (Deng et al. 2023).

Essa dualidade fenotípica também foi confirmada por Yang et al. (2022), que observou que EGCs modulam a resposta inflamatória estimulada por LPS quando co-cultivados com linfócitos T CD4⁺ ingênuos. Neste estudo, os autores mostraram que EGCs estimulados com LPS e IFN- γ exibiram as expressões de MHC-II, CD80, CD86, GDNF, TLR-2 e TNF- α . No entanto, quando os EGCs estimulados estavam na presença dos sobrenadantes de *Bifidobacterium bifidum* e *Bacteroides fragilis*, a expressão de MHC-II, CD80, CD86, GDNF, TLR-2 e TNF- α foi inibida. Quando os EGCs pré-tratados foram cocultivados com células T CD4⁺ ingênuas, as expressões de IL-4, IL-2 e IL-17 foram significativamente aumentadas por células T CD4⁺. Além disso, o sobrenadante de *B. bifidum* e *B. fragilis* regulou negativamente as expressões de IL-4, IL-2 e IL-17 e aumentou a expressão de IL-10 por células T CD4⁺. Os dados sugerem que moléculas derivadas da microbiota, como os SCFAs, podem interferir no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas modulando a polarização dos EGCs.

Assim, as EGCs podem influenciar patologias neurodegenerativas de forma dualística, às vezes em gliose reativa liberando mediadores inflamatórios, às vezes promovendo homeostase e resiliência diante de lesões inflamatórias (Figura 2). A caracterização detalhada do fenótipo dessas células, cujas configurações de polarização binária podem desempenhar um papel central em condições patológicas por meio de uma série de cascatas de sinais imunológicos, deve revelar alguns aspectos interessantes. Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para desvendar toda a gama de funções das EGCs no contexto de doenças

neurodegenerativas.

6. Estratégias terapêuticas para doenças neurodegenerativas visando as Células Gliais Entéricas

6.1 Abordagens farmacológicas

A glia entérica serve como um possível alvo terapêutico farmacológico, dados seus efeitos neuromodulatórios e imunomodulatórios; no entanto, até o momento, poucos estudos abordaram o desenvolvimento de terapias que influenciam especificamente EGCs. Abaixo, listamos alguns estudos que direta ou indiretamente demonstraram que algumas abordagens farmacológicas podem influenciar mecanismos gliais e, portanto, podem afetar doenças neurodegenerativas.

Alguns estudos mostraram maneiras de intervir com estratégias farmacológicas nas alterações em EGCs que ocorrem em doenças neurodegenerativas. Uma dessas estratégias é a inibição de enzimas que participam do metabolismo do triptofano, como a indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano-2,3-dioxigenase (TDO ou TDO2), que regulam a primeira etapa e limitadora da taxa da via da quinurenina (Kyn) (Ye et al. 2019). TDO é uma enzima que produz metabólitos neurotóxicos a partir do triptofano, mais especificamente 3-HK e ácido quinolínico (QA), que contribuem para a neurodegeneração devido ao estresse oxidativo e à excitotoxicidade do glutamato, respectivamente (Okuda et al. 1996; Stone e Perkins 1981).

A inibição farmacológica de TDO reverteu os déficits motores e cognitivos e neutralizou a disfunção intestinal em um modelo de DP induzido por rotenona. Camundongos tratados com um inibidor de TDO mostraram uma redução na gliose entérica ao diminuir a expressão de GFAP e diminuir o acúmulo de α -sinucleína no plexo entérico, melhorando os sintomas intestinais. Assim, de acordo com os autores, a inibição de TDO pode ser uma estratégia terapêutica potencial para diminuir os sintomas motores, cognitivos e gastrointestinais na doença de Parkinson (Perez-Pardo et al. 2021). Há um estudo clínico de fase 3 em andamento testando a vacina terapêutica IO102-IO103, que está sendo desenvolvida para atingir os mecanismos imunossupressores pela inibição da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Veja mais, <https://clinicaltrials.gov/> , NCT03047928), o que pode representar um potencial hábil

para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Kjeldsen et al. 2021).

Outra alternativa farmacológica surge da reutilização de medicamentos. A ceftriaxona, um antibiótico beta-lactâmico, comumente usado por suas propriedades antibacterianas, pode oferecer efeito neuroprotetor em alguns distúrbios neurológicos associados à excitotoxicidade do glutamato (Kaur e Prakash 2017). Em um modelo murino de DP, o tratamento com ceftriaxona promoveu uma melhora no déficit motor em paralelo ao aumento da abundância de bactérias intestinais benéficas, aumento da integridade da barreira epitelial intestinal e diminuição da expressão de TLR-4, NF- κ B e citocinas inflamatórias intestinais (Zhou et al. 2021). Embora o estudo de Zhou et al (2021) não tenha avaliado diretamente os EGCs, espera-se que um perfil pró-inflamatório dos EGCs tenha sido inibido pelo medicamento, uma vez que os EGCs participam ativamente desse processo inflamatório. No entanto, mais estudos serão necessários para confirmar como os EGCs estão respondendo à ceftriaxona.

A inflamação intestinal induz níveis aumentados de S100 β em células gliais entéricas e está envolvida na produção de citocinas pró-inflamatórias. Curiosamente, a pentamidina, um inibidor de S100 β , reverteu o efeito do 5-fluorouracil na morte neuronal e na gliose reativa no intestino por meio da via dependente de S100B-RAGE-NF- κ B (Costa et al. 2019). Em um modelo de DA, a pentamidina causou a redução da expressão da proteína GFAP, S100 β e RAGE, que são sinais de gliose reativa, e induziu a expressão de p53 em astrócitos. A pentamidina também reduziu a expressão de mediadores e marcadores pró-inflamatórios, reduzindo assim a neuroinflamação no cérebro de DA (Cirillo et al. 2015). Infelizmente, este último estudo não avaliou a reatividade glial no intestino, apenas no cérebro, porém, no estudo realizado por (Costa et al. 2019), há claramente um papel antigliose entérica pela pentamidina, que poderia ser uma potencial estratégia terapêutica desencadeando a glia entérica em doenças neurodegenerativas.

6.2 Abordagens nutracêuticas

Outra estratégia abrange uma classe de compostos chamados nutracêuticos, que são alimentos ou partes de alimentos que fornecem benefícios à saúde. Alguns alimentos ou suplementos podem influenciar o sistema nervoso entérico, incluindo a regulação da barreira intestinal, esvaziamento gástrico e trânsito colônico. Os

nutrientes contribuem para a síntese de neurotransmissores entéricos e podem estar envolvidos na expressão de fatores neurotróficos derivados de células gliais. Alguns estudos mostraram que nutrientes específicos podem promover efeitos gliatróficos e prevenir a reatividade glial patológica, conforme descrito abaixo.

Os probióticos são microrganismos vivos não patogênicos administrados para melhorar o equilíbrio microbiano, particularmente no trato gastrointestinal, eles exercem seus efeitos benéficos por meio de vários mecanismos, incluindo redução do pH intestinal, diminuição da colonização e invasão por organismos patogênicos e modificação da resposta imune do hospedeiro (Williams 2010). Giancamillo e cols (2010) demonstraram que leitões saudáveis tratados com o probiótico *Pedococcus acidilactici* têm células gliais entéricas GFAP+ significativamente maiores nos plexos submucosos interno e externo dos animais tratados, indicando a plasticidade do SNE em resposta à ingestão de probióticos (Di Giancamillo et al. 2010). Como nenhum processo patológico estava presente, pois os animais eram saudáveis, o aumento nas células GFAP+ pode significar uma melhora na homeostase intestinal, que também é realizada por EGCs.

Castanhas-do-pará (*Bertholletia excelsa*) são uma importante fonte alimentar de selênio, fibras, ácidos graxos insaturados e polifenóis. Além disso, vários estudos indicaram que a suplementação da dieta com castanhas-do-pará tem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Stockler-Pinto et al. 2014; Cominetti et al. 2012; Schott et al. 2018; Maranhão et al. 2011). Curiosamente, as castanhas-do-pará exercem efeitos diferentes sobre os EGCs dependendo da dose em animais saudáveis. Um estudo testou uma dieta com 5% e 10% de castanhas-do-pará, no grupo de animais que recebeu a dieta com 5% houve aumento significativo da GFAP, em contrapartida, nos animais que receberam dieta contendo 10% de castanhas-do-pará houve redução da GFAP, diminuição da área do gânglio mioentérico e aumento do tempo de esvaziamento gástrico (Almeida et al. 2022).

Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de café está relacionado a menor risco de desenvolvimento de DP. Miyazaki e colegas (2019) investigaram os efeitos de dois componentes do café, ácido cafeico (AC) e ácido clorogênico (CGA), em um modelo experimental de DP induzida por rotenona e células mesencefálicas ou entéricas cultivadas primárias. Este estudo mostrou que a administração de AC e AGC aumentou as moléculas antioxidantes em astrócitos mesencefálicos e células gliais entéricas e preveniu a neurodegeneração induzida por rotenona no cérebro e

no plexo mioentérico. Esses autores propuseram que os componentes do café poderiam ser usados como uma estratégia terapêutica baseada em alimentos de neuroproteção para melhorar os sintomas motores e gastrointestinais da doença de Parkinson (Miyazaki et al. 2019).

Os polifenóis são compostos derivados de plantas com propriedades antioxidantes e podem ser considerados uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Serra et al. 2018). Dois tipos principais de polifenóis são relevantes para este estudo: flavonoides e não flavonoides, como será discutido abaixo.

A quercetina é um flavonoide encontrado em vários alimentos, como maçãs, cebolas e brócolis. Devido às suas propriedades antioxidantes, a quercetina é estudada em modelos de diabetes. A suplementação de quercetina aliviou os danos causados pelo diabetes em um modelo induzido por estreptozotocina, promovendo um efeito neuroprotetor e reduzindo a perda glial entérica no duodeno e jejuno (Lopes et al. 2012; de Souza et al. 2017). A quercetina também reduz a neurodegeneração e a inflamação jejunal no modelo experimental de artrite reumatoide (AR). O tratamento com 50 mg/kg de quercetina reduziu a inflamação intestinal, atenuou a diminuição da densidade de neurônios e, curiosamente, também atenuou a diminuição de células gliais entéricas, incluindo uma redução na expressão de GDNF e área de ocupação por EGCS sugerindo que, neste caso, EGCs não estavam realizando um perfil pró-inflamatório, uma vez que os animais induzidos à AR tiveram uma diminuição significativa na densidade de EGC (Piovezana Bossolani et al. 2019). Além disso, a quercetina usada *in vitro* reduziu significativamente a expressão de TLR4, receptor 3 semelhante a NOD (NLRP3), caspase-1, gasdermina D, IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF- α . Também inibiu a ativação de NF- κ B e aumentou a expressão de zonula occludens 1 e claudinas, enquanto reduziu as células apoptóticas. Os resultados *in vivo* mostraram que a quercetina reduziu significativamente a inflamação, protegeu a estrutura do cólon e do ceco e preveniu o sangue oculto nas fezes induzido por LPS (Zhao et al. 2021a).

O resveratrol é um polifenol não flavonoide que também possui propriedades antioxidantes. Estudos experimentais mostraram que a administração prévia de resveratrol em animais submetidos à isquemia intestinal reverteu as alterações morfológicas em neurônios entéricos e reduziu o aumento de EGCs (gliose reativa) nesses animais (Borges et al. 2016). Da mesma forma, em camundongos diabéticos

induzidos por estreptozotocina, o tratamento com resveratrol atenuou o estresse oxidativo e nitrosativo e a perda de neurônios entéricos, bem como reduziu a gliose entérica reativa (Ferreira et al. 2018). O tratamento com resveratrol também foi associado à neurodegeneração atenuada e à ativação astrocítica no hipocampo de ratos diabéticos (Jing et al. 2013).

Finalmente, em relação às perspectivas futuras, o uso de ferramentas farmacológicas e nutracêuticas para tratar doenças neurodegenerativas é um tópico de discussão e investigação em andamento. As doses translacionais para humanos, os efeitos benéficos para cada doença neurodegenerativa, a duração desses efeitos e os potenciais efeitos colaterais são áreas-chave de pesquisa e engajamento (**Figura 2**). Infelizmente, a eficácia dessas estratégias parece estar relacionada ao desenvolvimento de biomarcadores precoces dessas doenças neurodegenerativas, uma vez que o início dessas doenças pode ser silencioso e levar décadas de desenvolvimento até o momento do diagnóstico. No entanto, distúrbios gastrointestinais envolvendo a ação dos EGCs, bem como todo o sistema nervoso entérico, podem estar presentes como um sintoma prodrômico, quando os sinais de doenças neurodegenerativas ainda não são detectados. Assim, estratégias como medicamentos administrados localmente, biológicos ou abordagens nutracêuticas devem ser consideradas e personalizadas como um tratamento adjuvante de acordo com cada caso clínico e ajustado às necessidades de cada paciente.

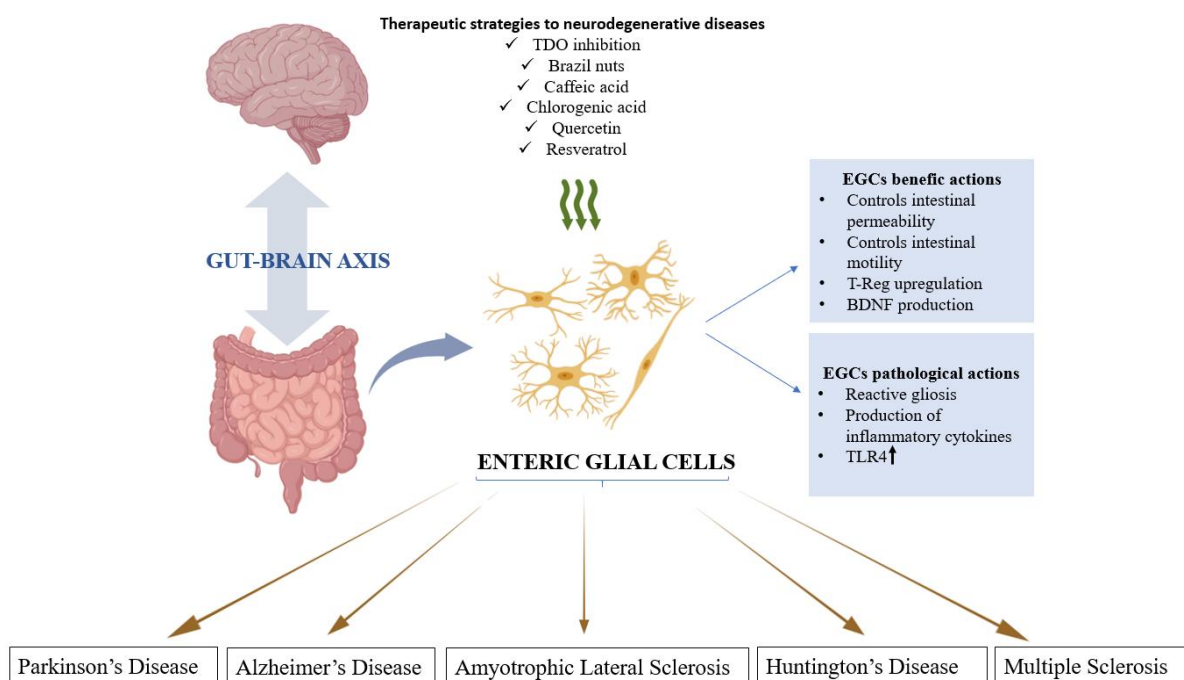


Figura. 2 As células gliais entéricas (EGCs) presentes no Sistema Nervoso Entérico participam de forma dualística, realizando ações protetoras e patológicas em doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica, Doença de Huntington e Esclerose Múltipla. Alternativas farmacológicas e nutracêuticas podem ser utilizadas como estratégias terapêuticas visando EGCs para o tratamento dessas doenças

Contribuições dos autores - I.P.M. e C.P. conceberam e escreveram o manuscrito. C.P. revisou o manuscrito de forma ampla e crítica.

Financiamento - Este trabalho foi apoiado pelo Programa de Excelência em Pesquisa - Instituto Aggeu Magalhães (IAM-PROEP# 005-FIO-22) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq;#301891/2022-2).

Declaração de Interesse Concorrente

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou

relacionamentos pessoais conhecidos que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo

Aprovação Ética

Não aplicável.

Consentimento para Publicação

Os autores confirmam o consentimento para publicação

Referências

- Adinolfi E., Giuliani A. L., Marchi E. De, Pegoraro A., Orioli E., Virgilio F. Di (2018) The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol* **151**, 234–244.
- Almeida P. P. de, Thomasi B. B. de M., Costa N. da S., Valdetaro L., Pereira A. D., Gomes A. L. T., Stockler-Pinto M. B. (2022) Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) Retards Gastric Emptying and Modulates Enteric Glial Cells in a Dose-Dependent Manner. *Journal of the American Nutrition Association* **41**.
- Aubé A. C., Cabarrocas J., Bauer J., Philippe D., Aubert P., Doulay F., Liblau R., Galmiche J. P., Neunlist M. (2006) Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* **55**, 630–637.
- Auteri M., Zizzo M. G., Serio R. (2015) GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacol Res* **93**, 11–21.
- Bates G. P., Dorsey R., Gusella J. F., Hayden M. R., Kay C., Leavitt B. R., Nance M., et al. (2015) Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* **1**.
- Baydas G., Nedzvetskii V. S., Tuzcu M., Yasar A., Kirichenko S. V. (2003) Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: Effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* **462**, 67–71.
- Berre-Scoul C. Le, Chevalier J., Oleynikova E., Cossais F., Talon S., Neunlist M., Boudin H. (2017) A novel enteric neuron–glia coculture system reveals the role of glia in

- neuronal development. *Journal of Physiology* **595**, 583–598.
- Björkqvist M., Wild E. J., Thiele J., Silvestroni A., Andre R., Lahiri N., Raibon E., et al. (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1869–1877.
- Boesmans W., Hao M. M., Fung C., Li Z., Haute C. Van den, Tack J., Pachnis V., Berghe P. Vanden (2019) Structurally defined signaling in neuro-glia units in the enteric nervous system. *Glia* **67**, 1167–1178.
- Boesmans W., Lasrado R., Berghe P. Vanden, Pachnis V. (2015) Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* **63**, 229–241.
- Borges S. C., Silva de Souza A. C. da, Beraldi E. J., Schneider L. C. L., Buttow N. C. (2016) Resveratrol promotes myenteric neuroprotection in the ileum of rats after ischemia-reperfusion injury. *Life Sci* **166**, 54–59.
- Brown I. A. M., McClain J. L., Watson R. E., Patel B. A., Gulbransen B. D. (2016a) Enteric Glia Mediate Neuron Death in Colitis Through Purinergic Pathways That Require Connexin-43 and Nitric Oxide. *Cmgh* **2**, 77–91.
- Brown I. A. M., McClain J. L., Watson R. E., Patel B. A., Gulbransen B. D. (2016b) Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 77–91.
- Brown I. A. M., McClain J. L., Watson R. E., Patel B. A., Gulbransen B. D. (2016c) Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 77–91.
- Bush T. G., Savidge T. C., Freeman T. C., Cox H. J., Campbell E. A., Mucke L., Johnson M. H., Sofroniew M. V. (1998) Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* **93**, 189–201.
- Cheadle G. A., Costantini T. W., Lopez N., Bansal V., Eliceiri B. P., Coimbra R. (2013) Enteric Glia Cells Attenuate Cytomix-Induced Intestinal Epithelial Barrier Breakdown. *PLoS One* **8**, 1–11.
- Chen S., Cai X., Lao L., Wang Y., Su H., Sun H. (2024) Brain-Gut-Microbiota Axis in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Overview and Future Directions. *Aging Dis* **15**, 74–95.
- Chidambaram S. B., Essa M. M., Rathipriya A. G., Bishir M., Ray B., Mahalakshmi A. M., Tousif A. H., et al. (2022) Gut dysbiosis, defective autophagy and altered immune responses in neurodegenerative diseases: Tales of a vicious cycle. *Pharmacol Ther*

231, 107988.

- Cirillo C., Capoccia E., Iuvone T., Cuomo R., Sarnelli G., Steardo L., Esposito G. (2015) S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2015**.
- Cirillo C., Sarnelli G., Esposito G., Grosso M., Petruzzelli R., Izzo P., Calì G., et al. (2009) Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. *Neurogastroenterology and motility* **21**.
- Cirillo C., Sarnelli G., Esposito G., Turco F., Steardo L., Cuomo R. (2011a) S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. *World J Gastroenterol* **17**, 1261–1266.
- Cirillo C., Sarnelli G., Turco F., Mango A., Grosso M., Aprea G., Masone S., Cuomo R. (2011b) Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterology and motility* **23**.
- Clairembault T., Kamphuis W., Leclair-Visonneau L., Rolli-Derkinderen M., Coron E., Neunlist M., Hol E. M., Derkinderen P. (2014) Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* **130**, 805–815.
- Clairembault T., Leclair-Visonneau L., Neunlist M., Derkinderen P. (2015) Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease? *Mov Disord* **30**, 494–498.
- Claudino dos Santos J. C., Lima M. P. P., Brito G. A. de C., Viana G. S. de B. (2023) Role of enteric glia and microbiota-gut-brain axis in parkinson disease pathogenesis. *Ageing Res Rev* **84**.
- Cominetti C., Bortoli M. C. de, Garrido A. B., Cozzolino S. M. F. (2012) Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutrition Research* **32**, 403–407.
- Cossais F., Durand T., Chevalier J., Boudaud M., Kermarrec L., Aubert P., Neveu I., Naveilhan P., Neunlist M. (2016) Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **310**, G941–G951.
- Costa D. V. S., Bon-Frauches A. C., Silva A. M. H. P., Lima-Júnior R. C. P., Martins C. S., Leitão R. F. C., Freitas G. B., et al. (2019) 5-Fluorouracil Induces Enteric Neuron Death and Glial Activation During Intestinal Mucositis via a S100B-RAGE-NFκB-Dependent Pathway. *Sci Rep* **9**, 1–14.
- Cryan J. F., O'Riordan K. J., Cowan C. S. M., Sandhu K. V., Bastiaanssen T. F. S., Boehme M., Codagnone M. G., et al. (2019) The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol*

Rev **99**, 1877–2013.

- D'Antongiovanni V., Pellegrini C., Antonioli L., Benvenuti L., Salvo C. Di, Flori L., Piccarducci R., et al. (2021) Palmitoylethanolamide Counteracts Enteric Inflammation and Bowel Motor Dysfunctions in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* **12**, 1–15.
- Dashtipour K., Johnson E., Kani C., Kani K., Hadi E., Ghamsary M., Pezeshkian S., Chen J. J. (2015) Effect of exercise on motor and nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* **2015**, 5.
- Delvalle N. M., Dharshika C., Morales-Soto W., Fried D. E., Gaudette L., Gulbransen B. D. (2018) Communication Between Enteric Neurons, Glia, and Nociceptors Underlies the Effects of Tachykinins on Neuroinflammation. *Cmgh* **6**, 321–344.
- Deng Z., Li D., Yan X., Lan J., Han D., Fan K., Chang J., Ma Y. (2023) Activation of GABA receptor attenuates intestinal inflammation by modulating enteric glial cells function through inhibiting NF- κ B pathway. *Life Sci* **329**, 121984.
- Devos D., Lebouvier T., Lardeux B., Biraud M., Rouaud T., Pouclet H., Coron E., et al. (2013) Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **50**, 42–48.
- Ding M., Shen Y., Wang P., Xie Z., Xu S., Zhu Z. Y., Wang Y., et al. (2018) Exosomes Isolated From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid-Beta Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* **43**, 2165–2177.
- Dodiya H. B., Forsyth C. B., Voigt R. M., Engen P. A., Patel J., Shaikh M., Green S. J., et al. (2020) Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **135**, 104352.
- Du G., Dong W., Yang Q., Yu X., Ma J., Gu W., Huang Y. (2021) Altered Gut Microbiota Related to Inflammatory Responses in Patients With Huntington's Disease. *Front Immunol* **11**, 1–12.
- Ekwudo M. N., Gubert C., Hannan A. J. (2024) The microbiota–gut–brain axis in Huntington's disease: pathogenic mechanisms and therapeutic targets. *FEBS Journal*.
- Emmi A., Sandre M., Russo F. P., Tombesi G., Garri F., Campagnolo M., Carecchio M., et al. (2023) Duodenal alpha-Synuclein Pathology and Enteric Gliosis in Advanced Parkinson's Disease. *Movement Disorders* **38**, 885–894.
- Esposito E., Matteo V. Di, Benigno A., Pierucci M., Crescimanno G., Giovanni G. Di

- (2007) Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **205**, 295–312.
- Esposito G., Sarnelli G., Capoccia E., Cirillo C., Pesce M., Lu J., Calì G., Cuomo R., Steardo L. (2016) Autologous transplantation of intestine-isolated glia cells improves neuropathology and restores cognitive deficits in β amyloid-induced neurodegeneration. *Sci Rep* **6**, 1–11.
- Feldman E. L., Goutman S. A., Petri S., Mazzini L., Savelieff M. G., Shaw P. J., Sobue G. (2022) Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* **400**, 1363–1380.
- Ferreira P. E. B., Beraldi E. J., Borges S. C., Natali M. R. M., Buttow N. C. (2018) Resveratrol promotes neuroprotection and attenuates oxidative and nitrosative stress in the small intestine in diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **105**, 724–733.
- Filippis D. de, Esposito G., Cirillo C., Cipriano M., Winter B. Y. de, Scuderi C., Sarnelli G., et al. (2011) Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One* **6**, 1–8.
- Foster J. A., McVey Neufeld K. A. (2013) Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* **36**, 305–312.
- Fried D. E., Watson R. E., Robson S. C., Gulbransen B. D. (2017) Ammonia modifies enteric neuromuscular transmission through glial γ -aminobutyric acid signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **313**, G570–G580.
- Friedland R. P. (2015) Mechanisms of Molecular Mimicry Involving the Microbiota in Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* **45**, 349–362.
- Fung C., Boesmans W., Cirillo C., Foong J. P. P., Bornstein J. C., Berghe P. Vanden (2017) VPAC receptor subtypes tune purinergic Neuron-to-Glia communication in the Murine submucosal plexus. *Front Cell Neurosci* **11**, 1–16.
- Giancamillo A. Di, Vitari F., Bosi G., Savoini G., Domeneghini C. (2010) The chemical code of porcine enteric neurons and the number of enteric glial cells are altered by dietary probiotics. *Neurogastroenterology and Motility* **22**, 271–278.
- Greer J. M., Pender M. P. (2008) Myelin proteolipid protein: An effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *J Autoimmun* **31**, 281–287.
- Grubišić V., Gulbransen B. D. (2017a) Enteric glia: the most alimentary of all glia. *Journal of Physiology* **595**, 557–570.
- Grubišić V., Gulbransen B. D. (2017b) Enteric glial activity regulates secretomotor function in the mouse colon but does not acutely affect gut permeability. *Journal of*

- Physiology* **595**, 3409–3424.
- Grubišić V., McClain J. L., Fried D. E., Grants I., Csizmadia E., Ajijola O. A., Watson R. E., et al. (2020) Sensitivity following Inflammation. **32**.
- Gulbransen B. D., Sharkey K. A. (2009) Purinergic Neuron-to-Glia Signaling in the Enteric Nervous System. *Gastroenterology* **136**, 1349–1358.
- Hanani M., reichenbach A. (1994) Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* **278**, 153–160.
- Hirschfeld A., Bressler J. (1987) Effect of sodium butyrate on S-100 protein levels and the cAMP response. *J Cell Physiol* **133**, 158–162.
- Hong C. T., Chan L., Chen K. Y., Lee H. H., Huang L. K., Yang Y. C. S. H., Liu Y. R., Hu C. J. (2022) Rifaximin Modifies Gut Microbiota and Attenuates Inflammation in Parkinson's Disease: Preclinical and Clinical Studies. *Cells* **11**.
- Ibiza S., García-Cassani B., Ribeiro H., Carvalho T., Almeida L., Marques R., Misic A. M., et al. (2016) Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* **535**, 440–443.
- Jeon G. S., Shim Y. M., Lee D. Y., Kim J. S., Kang M. J., Ahn S. H., Shin J. Y., Geum D., Hong Y. H., Sung J. J. (2019) Pathological Modification of TDP-43 in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Mol Neurobiol* **56**, 2007–2021.
- Jessen K. R., Mirsky R. (1980) *Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein*.
- Jing Y. H., Chen K. H., Kuo P. C., Pao C. C., Chen J. K. (2013) Neurodegeneration in streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinology* **98**, 116–127.
- Kaur B., Prakash A. (2017) Ceftriaxone attenuates glutamate-mediated neuro-inflammation and restores BDNF in MPTP model of Parkinson's disease in rats. *Pathophysiology* **24**, 71–79.
- Kermarrec L., Durand T., Neunlist M., Naveilhan P., Neveu I. (2016) Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. *J Neuroimmunol* **295–296**, 79–83.
- Kesika P., Suganthi N., Sivamaruthi B. S., Chaiyasut C. (2021) Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life Sci* **264**, 118627.
- Kim S., Kwon S., Kam T., Panicker N., Karuppagounder S., Lee S., Lee J. H., et al. (2020) HHS Public Access. **103**, 627–641.
- King B. F. (2015) Purinergic signalling in the enteric nervous system (An overview of

- current perspectives). *Auton Neurosci* **191**, 141–147.
- Kjeldsen J. W., Lorentzen C. L., Martinenaite E., Ellebaek E., Donia M., Holmstroem R. B., Klausen T. W., et al. (2021) Nivolumab in Metastatic Melanoma. **27**.
- Kovler M. L., Gonzalez Salazar A. J., Fulton W. B., Lu P., Yamaguchi Y., Zhou Q., Sampah M., et al. (2021) Toll-like receptor 4-mediated enteric glia loss is critical for the development of necrotizing enterocolitis. *Sci Transl Med* **13**, 1–29.
- Kowalski K., Mulak A. (2019) Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *J Neurogastroenterol Motil* **25**, 48–60.
- Langness S., Kojima M., Coimbra R., Eliceiri B. P., Costantini T. W. (2017) Enteric glia cells are critical to limiting the intestinal inflammatory response after injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **312**, G274–G282.
- Li H., Fan C., Lu H., Feng C., He P., Yang X., Xiang C., Zuo J., Tang W. (2020) Protective role of berberine on ulcerative colitis through modulating enteric glial cells–intestinal epithelial cells–immune cells interactions. *Acta Pharm Sin B* **10**, 447–461.
- Li Z., Zhang X., Zhou H., Liu W., Li J. (2016) Exogenous S-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **80**, 977–984.
- Liu Y. A., Chung Y. C., Pan S. T., Shen M. Y., Hou Y. C., Peng S. J., Pasricha P. J., Tang S. C. (2013) 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterology and Motility* **25**, 324–338.
- Lopes C. R. P., Ferreira P. E. B., Zanoni J. N., Alves A. M. P., Alves É. P. B., Buttow N. C. (2012) Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Dig Dis Sci* **57**, 3106–3115.
- Maiuolo J., Gliozzi M., Musolino V., Carresi C., Scarano F., Nucera S., Scicchitano M., et al. (2021) The Contribution of Gut Microbiota–Brain Axis in the Development of Brain Disorders. *Front Neurosci* **15**.
- Maranhão P. A., Kraemer-Aguiar L. G., Oliveira C. L. De, Kuschnir M. C. C., Vieira Y. R., Souza M. G. C., Koury J. C., Bouskela E. (2011) Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: A randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* **8**, 32.
- Marogianni C., Sokratous M., Dardiotis E., Hadjigeorgiou G. M., Bogdanos D., Xiromerisiou G. (2020) Neurodegeneration and inflammation—an interesting interplay in parkinson's disease. *Int J Mol Sci* **21**, 1–15.
- McClain J. L., Fried D. E., Gulbransen B. D. (2015) Agonist-Evoked Ca²⁺ Signaling in

- Enteric Glia Drives Neural Programs That Regulate Intestinal Motility in Mice. *Cmgh* **1**, 631–645.
- McClain J. L., Grubišić V., Fried D., Gomez-Suarez R. A., Leininger G. M., Sévigny J., Parpura V., Gulbransen B. D. (2014) Ca²⁺ responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. *Gastroenterology* **146**, 497–507.
- Meir M., Burkard N., Ungewiß H., Diefenbacher M., Flemming S., Kannapin F., Germer C. T., et al. (2019) Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* **129**, 2824–2840.
- Miyazaki I., Isooka N., Wada K., Kikuoka R., Kitamura Y., Asanuma M. (2019) Effects of enteric environmental modification by coffee components on neurodegeneration in Rotenone-Treated Mice. *Cells* **8**, 1–18.
- Montalbán-Rodríguez A., Abalo R., López-Gómez L. (2024) From the Gut to the Brain: The Role of Enteric Glial Cells and Their Involvement in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **25**.
- Montgomery T. L., Wang Q., Mirza A., Dwyer D., Wu Q., Dowling C. A., Martens J. W. S., Yang J., Kremmentsov D. N., Mao-Draayer Y. (2024) Identification of commensal gut microbiota signatures as predictors of clinical severity and disease progression in multiple sclerosis. *Sci Rep* **14**.
- Murakami M., Ohta T., Ito S. (2008) Interleukin-1 β enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial B1 receptor expression. *Neuroscience* **151**, 222–231.
- Nagele R. G., D'Andrea M. R., Lee H., Venkataraman V., Wang H. Y. (2003) Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res* **971**, 197–209.
- Nagu P., Parashar A., Behl T., Mehta V. (2021) Gut Microbiota Composition and Epigenetic Molecular Changes Connected to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience* **71**, 1436–1455.
- Nishimori J. H., Newman T. N., Oppong G. O., Rapsinski G. J., Yen J. H., Biesecker S. G., Wilson R. P., et al. (2012) Microbial amyloids induce interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 responses via toll-like receptor 2 activation in the intestinal mucosa. *Infect Immun* **80**, 4398–4408.
- Ochoa-Cortes F., Turco F., Linan-Rico A., Soghomonyan S., Whitaker E., Wehner S., Cuomo R., Christofi F. L. (2016) Enteric Glial Cells: A New Frontier in

- Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 433–449.
- Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H. (1996) Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12553–12558.
- Olanow C. W., Brundin P. (2013) Parkinson's Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? *Movement Disorders* **28**, 31–40.
- Paiva I. H. R. de, Maciel L. M., Silva R. S. da, Mendonça I. P., Souza J. R. B. de, Peixoto C. A. (2024) Prebiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and ameliorate anxiety and depression-like behavior in HFD-fed mice. *Food Research International* **182**.
- Peirce J. M., Alviña K. (2019) The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. *J Neurosci Res* **97**, 1223–1241.
- Perez-Pardo P., Grobбен Y., Willemsen-Seegers N., Hartog M., Tutone M., Muller M., Adolfs Y., et al. (2021) Pharmacological validation of TDO as a target for Parkinson's disease. *FEBS Journal* **288**, 4311–4331.
- Piovezana Bossolani G. D., Silva B. T., Colombo Martins Perles J. V., Lima M. M., Vieira Frez F. C., Garcia de Souza S. R., Sehaber-Sierakowski C. C., Bersani-Amado C. A., Zandoni J. N. (2019) Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. *Life Sci* **238**, 116956.
- Pochard C., Coquenlorge S., Jaulin J., Cenac N., Vergnolle N., Meurette G., Freyssinet M., Neunlist M., Rolli-Derkinderen M. (2016) Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells from Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterology* **150**, 168–180.
- Preziosi G., Gordon-Dixon A., Emmanuel A. (2018) Neurogenic bowel dysfunction in patients with multiple sclerosis: prevalence, impact, and management strategies. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* **Volume 8**, 79–90.
- Rao M., Nelms B. D., Dong L., Salinas-Rios V., Rutlin M., Gershon M. D., Corfas G. (2015) Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia* **63**, 2040–2057.
- Rietdijk C. D., Perez-Pardo P., Garssen J., Wezel R. J. A. van, Kraneveld A. D. (2017) Exploring Braak's hypothesis of parkinson's disease. *Front Neurol* **8**.
- Rosenbaum C., Schick M. A., Wollborn J., Heider A., Scholz C. J., Cecil A., Niesler B.,

- Hirrlinger J., Walles H., Metzger M. (2016) Activation of myenteric glia during acute inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One* **11**, 1–20.
- Savidge T. C., Newman P., Pothoulakis C., Ruhl A., Neunlist M., Bourreille A., Hurst R., Sofroniew M. V. (2007) Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. *Gastroenterology* **132**, 1344–1358.
- Schachter J., Martel J., Lin C. S., Chang C. J., Wu T. R., Lu C. C., Ko Y. F., Lai H. C., Ojcius D. M., Young J. D. (2018) Effects of obesity on depression: A role for inflammation and the gut microbiota. *Brain Behav Immun* **69**, 1–8.
- Schott K. L., Assmann C. E., Teixeira C. F., Boligon A. A., Waechter S. R., Duarte F. A., Ribeiro E. E., Cruz I. B. M. da (2018) Brazil nut improves the oxidative metabolism of superoxide-hydrogen peroxide chemically-imbalanced human fibroblasts in a nutrigenomic manner. *Food and Chemical Toxicology* **121**, 519–526.
- Seguella L., Gulbransen B. D. (2021) Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **18**, 571–587.
- Selgrad M., Giorgio R. De, Fini L., Cogliandro R. F., Williams S., Stanghellini V., Barbara G., et al. (2009) JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* **58**, 25–32.
- Semar S., Klotz M., Letiembre M., Ginneken C. Van, Braun A., Jost V., Bischof M., et al. (2013) Changes of the enteric nervous system in amyloid- β protein precursor transgenic mice correlate with disease progression. *Journal of Alzheimer's Disease* **36**, 7–20.
- Serra D., Almeida L. M., Dinis T. C. P. (2018) Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis. *Trends Food Sci Technol* **78**, 224–233.
- Simpson J. E., Ince P. G., Lace G., Forster G., Shaw P. J., Matthews F., Savva G., Brayne C., Wharton S. B. (2010) Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* **31**, 578–590.
- Sochocka M., Donskow-Łysoniewska K., Diniz B. S., Kurpas D., Brzozowska E., Leszek J. (2019) The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review. *Mol Neurobiol* **56**, 1841–1851.
- Souza S. R. G. de, Neto M. H. de M., Perles J. V. C. M., Frez F. C. V., Zignani I., Ramalho F. V., Hermes-Uliana C., Bossolani G. D. P., Zanoni J. N. (2017) Antioxidant effects of the quercetin in the jejunal myenteric innervation of diabetic rats. *Front Med (Lausanne)* **4**, 4–11.

- Spear E. T., Holt E. A., Joyce E. J., Haag M. M., Mawe S. M., Hennig G. W., Lavoie B., Applebee A. M., Teuscher C., Mawe G. M. (2018) Altered gastrointestinal motility involving autoantibodies in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neurogastroenterology and Motility* **30**, 1–11.
- Stockler-Pinto M. B., Mafra D., Moraes C., Lobo J., Boaventura G. T., Farage N. E., Silva W. S., Cozzolino S. F., Malm O. (2014) Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. *Biol Trace Elem Res* **158**, 105–112.
- Stone T. W., Perkins M. N. (1981) Quinolinic acid: A potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* **72**, 411–412.
- Subhramanian S., Ariyath A., Sabhi R., Xavier T., Anandakuttan A., Kanno S., Thennavan A., et al. (2023) Translational Significance of GMF- β Inhibition by Indazole-4-yl-methanol in Enteric Glial Cells for Treating Multiple Sclerosis. *ACS Chem Neurosci* **14**, 72–86.
- Thomasi B. B. de M., Valdetaro L., Ricciardi M. C. G., Hayashide L., Fernandes A. C. M. N., Mussauer A., Silva M. L. da, et al. (2022) Enteric glial cell reactivity in colonic layers and mucosal modulation in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Brain Res Bull* **187**, 111–121.
- Tysnes O. B., Storstein A. (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* **124**, 901–905.
- Valès S., Bacola G., Biraud M., Touvron M., Bessard A., Geraldo F., Dougherty K. A., et al. (2019) Tumor cells hijack enteric glia to activate colon cancer stem cells and stimulate tumorigenesis. *EBioMedicine* **49**, 172–188.
- Villain N., Dubois B. (2019) Alzheimer ' s disease including focal presentations To cite this version : HAL Id : hal-02271750. **39**, 213–226.
- Wasser C. I., Mercieca E. C., Kong G., Hannan A. J., McKeown S. J., Glikmann-Johnston Y., Stout J. C. (2020) Gut dysbiosis in Huntington's disease: Associations among gut microbiota, cognitive performance and clinical outcomes. *Brain Commun* **2**, 1–13.
- Williams N. T. (2010) Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* **67**, 449–458.
- Wu S., Yi J., Zhang Y. G., Zhou J., Sun J. (2015) Leaky intestine and impaired microbiome in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Rep* **3**, 1–10.
- Xie J., Hoecke L. Van, Vandenbroucke R. E. (2022) The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Front Immunol* **12**, 1–18.

- Xu R., Wang Q. Q. (2016) Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol* **10**.
- Xu S., Qin B., Shi A., Zhao J., Guo X., Dong L. (2018) Oxytocin inhibited stress induced visceral hypersensitivity, enteric glial cells activation, and release of proinflammatory cytokines in maternal separated rats. *Eur J Pharmacol* **818**, 578–584.
- Yang Y., Eguchi A., Wan X., Chang L., Wang X., Qu Y., Mori C., Hashimoto K. (2023) A role of gut–microbiota–brain axis via subdiaphragmatic vagus nerve in depression-like phenotypes in *Chrna7* knock-out mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **120**, 110652.
- Yang Y. hua, Qian W., Hou X. hua, Dai C. bing (2022) *Bifidobacterium bifidum* and *Bacteroides fragilis* Induced Differential Immune Regulation of Enteric Glial Cells Subjected to Exogenous Inflammatory Stimulation. *Inflammation* **45**, 2388–2405.
- Ye Z., Yue L., Shi J., Shao M., Wu T. (2019) Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications. *J Cancer* **10**, 2771–2782.
- Yu Y. B., Li Y. Q. (2014) Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World J Gastroenterol* **20**, 11273–11280.
- Zhang D. K., He F. Q., Li T. K., Pang X. H., Cui D., Xie Q., Huang X. L., Gan H. T. (2010) Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *Journal of Pathology* **222**, 213–222.
- Zhang Y., Xia Y., Sun J. (2024) Probiotics and microbial metabolites maintain barrier and neuromuscular functions and clean protein aggregation to delay disease progression in TDP43 mutation mice. *Gut Microbes* **16**, 1–24.
- Zhao X., Kong D., Zhou Q., Wei G., Song J., Liang Y., Du G. (2021a) Baicalein alleviates depression-like behavior in rotenone- induced Parkinson's disease model in mice through activating the BDNF/TrkB/CREB pathway. *Biomed Pharmacother* **140**.
- Zhao Z., Ning J., Bao X. qi, Shang M., Ma J., Li G., Zhang D. (2021b) Fecal microbiota transplantation protects rotenone-induced Parkinson's disease mice via suppressing inflammation mediated by the lipopolysaccharide-TLR4 signaling pathway through the microbiota-gut-brain axis. *Microbiome* **9**, 1–27.
- Zhou X., Lu J., Wei K., Wei J., Tian P., Yue M., Wang Y., et al. (2021) Neuroprotective Effect of Ceftriaxone on MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Model by Regulating Inflammation and Intestinal Microbiota. *Oxid Med Cell Longev* **2021**.

5. CONCLUSÕES

FOS e GOS atuam no intestino aumentando a abundância relativa de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta *Bacterioideaceae*, *Bacterioides*, *Alistipes* sp, *Lactobacillus reuteri* e reduzindo as espécies pró-inflamatórias *H. hepaticus*, α -sinucleína, p-NFkB, IL1- β . Consequentemente, FOS e GOS aumentam a expressão de ocludina e GPR43 no intestino.

Na substância negra, região mais evidentemente afetada na DP, FOS e GOS aumentaram a expressão de TH e fatores de neuroplasticidade cerebral p-CREB e BDNF, além de reduzirem neuroinflamação e reatividade glial através da redução de IBA-1, GFAP, p-NFkB, IL1-B, iNOS e acúmulo de α -sinucleína.

No córtex pré-frontal, região envolvida nos sintomas depressivos, FOS e GOS também reduziram a expressão dos marcadores inflamatórios p-NFkB, IL1- β , iNOS e promoveram aumento da neuroplasticidade por meio da expressão de SERT, PSD-95, BDNF e p-CREB. Finalmente, FOS e GOS também aumentaram os níveis de serotonina no cérebro.

Em conclusão, este estudo demonstrou pela primeira vez os benefícios da administração da combinação de apenas dois prebióticos, FOS e GOS, na melhora da disbiose e inflamação intestinal, déficits motores e sintomas tipo-depressivos em camundongos induzidos com DP.

6. SÚMULA CURRICULAR

- Minистраção de palestra em mesa redonda intitulada “A influencia da dieta nos processos fisiológicos mediante a microbiota intestinal e seus metabólitos” na X Semana de Biociências e Biotecnologia Oferecida pelo Instituto Aggeu Magalhães. (2022)
- Minистраção do minicurso “Imunohistoquímica e imunofluorescência: Diagnóstico e pesquisa”, no evento JULHO NO CECINE (UFPE). (2023)
- Apresentação de trabalho em forma de pôster no VIII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEUROQUÍMICA E FISIOPATOLOGIA DA CÉLULA GLIAL, na Universidade Federal da Bahia (UFBA). (2023)
- Minистраção de aulas no Centro Universitário Maurício de Nassau (2023)
- Realização de estágio sanduíche no Laboratório de Neuroplasticidade da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), por seis meses. (2024).
- Minистраção de aulas de Neurofisiologia em Estágio Docência para o curso de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco (2024).

7. REFERÊNCIAS

1. AAS, J.; GESSERT, C. E.; BAKKEN, J.S. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 3, p. 580-585, 2003.
2. ABRAHAMSSON, T. R. et al. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. **Clin Exp Allergy**, v. 44, p. 842-50, 2014.
3. AGUIRRE, M.; VENEMA, K. The art of targeting gut microbiota for tackling human obesity. **Genes Nutr**, v. 10, n. 7, 2015.
4. ALABI, A. O. et al. Methyl jasmonate abrogates rotenone-induced parkinsonian-like symptoms through inhibition of oxidative stress, release of pro-inflammatory cytokines, and down-regulation of immunopositive cells of NF- κ B and α -synuclein expressions in mice. **NeuroToxicology**, v. 74, n. January, p. 172–183, 2019.
5. ALRAFIAH, A. et al. Assessment of the Levels of Level of Biomarkers of Bone Matrix Glycoproteins and Inflammatory Cytokines from Saudi Parkinson Patients. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 2690205, 2019.
6. ANDERSON, G.; MAES, M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: Interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 2, p. 771–783, 2014.
7. ARBOLEYA, S.; WATKINS, C.; STANTON, C.; ROSS, R.P. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. **Front Microbiol**, v. 7, n. 8, 2016.
8. ARNOLD, B. et al. Integrating multiple aspects of mitochondrial dynamics in neurons: age-related differences and dynamic changes in a chronic rotenone model. **Neurobiol Dis**, v. 41, n. 1, p. 189-200, 2011.
9. ARPAIA, N. et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v.504, n. 12, p. 451-5, 2013.
10. ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 5, p. 174-80, 2011.
11. BAEK, J. Y. et al. Inhibition of Microglia-Derived Oxidative Stress by Ciliary Neurotrophic Factor Protects Dopamine Neurons In Vivo from MPP⁺

- Neurotoxicity. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3543;, 2018.
12. BERMON, S. et al. The microbiota: an exercise immunology perspective. **Exerc Immunol Rev.** v. 21, p. 70-79, 2015.
 13. BERNAL-PACHECO, O. et al. Nonmotor manifestations in parkinson disease. **Neurologist**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2012.
 14. BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 12, p. 1301-1306, 2000.
 15. BEZARD, E. et al. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. **Mov Disord**, v. 28, n. 1, p. 61-70, 2013.
 16. BHATTARAI, Y. Role of gut microbiota in regulating gastrointestinal dysfunction and motor symptoms in a mouse model of Parkinson's disease. **Gut Microbes.** v. 13, n. 1, 2021.
 17. BHIDAYASIRI, R. et al. Management of dysphagia and gastroparesis in Parkinson's disease in real-world clinical practice - Balancing pharmacological and non-pharmacological approaches. **Front Aging Neurosci**, v. 14, n. 8, 2022.
 18. BLOEM, B.R.; OKUN, M.S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **Lancet**. v. 397, n. 6, p. 2284-2303, 2021.
 19. BLOEMEN, J.G. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. **Clin Nutr.** v. 397, n. 6, p. 657-61, 2009.
 20. BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 7, n. s1, p. S71–S85, 2017.
 21. BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 3, p. 197-211, 2003.
 22. BRAVO, J.A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 108 n. 10, p. 16050-5, 2011.

23. BROWNING, K.N.; TRAVAGLI, R.A.; Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. **Compr Physiol.** v. 4, n. 10, p. 1339-1368, 2014.
24. BRUDEK T. Inflammatory Bowel Diseases and Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis.** v. 9, p. S331-S344, 2019.
25. BUROKAS, A. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. **Biol Psychiatry.** V. 82, n. 10, p. 472-487, 2017.
26. CACABELOS R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. **Int J Mol Sci.** v. 18, n. 3, 2017.
27. CAPECCI, M. et al. Clinical effects of robot-assisted gait training and treadmill training for Parkinson's disease. A randomized controlled trial. **Ann Phys Rehabil Med.** v. 62, n. 9, p. 303-312, 2019.
28. CAPUTI, V.; GIRON, MC.; Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci.** v. 19, n. 6, 2018.
29. CARICILLI, A.M.; CASTOLDI, A.; CÂMARA, N.O. Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. **World J Gastrointest Pathophysiol.** v. 5, n. 2, p.18-32, 2014.
30. CHAMBERS, E.S.; MORRISON, D.J. FROST, G.; Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? **Proc Nutr Soc.** v. 74, n. 8, p. 328-36, 2015.
31. CHASE, T. N.; NG, L. K. Y. Central Monoamine Metabolism in Parkinson's Disease. **Archives of Neurology,** v. 27, n. 6, p. 486–491, 1972.
32. CIRSTEAN, M.S. et al. Microbiota Composition and Metabolism Are Associated With Gut Function in Parkinson's Disease. **Mov Disord,** v. 35, n. 7, p. 1208-1217, 2020.
33. CONNOLLY, B.S.; LANG, A.E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. **JAMA,** v. 311, n. 4, p.1670-83, 2014.
34. CONTIN, M.; MARTINELLI, P. Pharmacokinetics of levodopa. **J Neurol.** v. 257, n. 11, p. S253-61, 2010.
35. CRYAN, J.F.; O'MAHONY, S.M. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. **Neurogastroenterol Motil,** v. 23, n. 3, p. 187-92, 2011.
36. CZIMMER, J.; MILLION, M.; TACHÉ, Y. Urocortin 2 acts centrally to delay gastric emptying through sympathetic pathways while CRF and urocortin 1

- inhibitory actions are vagal dependent in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 3, p. G511-8, 2006.
37. DE DEURWAERDÈRE, P.; DI GIOVANNI, G.; MILLAN, M.J. Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry. **Prog Neurobiol**. v. 151, n. 4, p. 57-100, 2017.
 38. DE WEERTH, C. Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 83, n. 12, p. 458-471, 2017.
 39. DEN BESTEN, G. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2398-408, 2015.
 40. DESBONNET, L. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. **J Psychiatr Res**, v. 43, n. 12, p. 164-74, 2008.
 41. DETKA, J. et al. Neuroendocrine link between stress, depression and diabetes. **Pharmacol Rep**, v. 65, p. 1591-600, 2013.
 42. DEUEL, L.M.; SEEBERGER, L.C. Complementary Therapies in Parkinson Disease: a Review of Acupuncture, Tai Chi, Qi Gong, Yoga, and Cannabis. **Neurotherapeutics**, v. 17, n. 10, p. 1434-1455. 2020.
 43. ENACHE, D.; PARIANTE, C. M.; MONDELLI, V. Markers of central inflammation in major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of studies examining cerebrospinal fluid, positron emission tomography and post-mortem brain tissue. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 81, p. 24–40, 2019.
 44. ERNY, D. et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 965-77. 2015.
 45. FABBRINI, G. et al. Levodopa-induced dyskinesias. **Mov Disord**, v. 22, n. 7, p. 1379-1389, 2007.
 46. FOSTER, J.A.; RINAMAN, L.; CRYAN, J.F. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. **Neurobiol Stress**. v. 7, n. 3, p. 124-136. 2017.
 47. FRISINA, P.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 15, n. 2, p. 144–148, fev. 2009.

48. GOSWAMI, P. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Instigates the Rotenone Induced Oxidative Apoptotic Neuronal Death: a Study in Rat Brain. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 10. p. 5384-400, 2016.
49. GOLDMAN, J. G.; POSTUMA, R. Premotor and non-motor features of Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 27, n. 4, p. 434–441, 2014.
50. GONZÁLEZ-CASACUBERTA, I. et al. Bioenergetics and Autophagic Imbalance in Patients-Derived Cell Models of Parkinson Disease Supports Systemic Dysfunction in Neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. September, p. 1–20, 2019.
51. GRASSET, E.A. et al. Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. **Cell Metab**, v. 25, n. 5, p. 1075-1090, 2017.
52. GRENHAM, S. et al. Brain-gut-microbe communication in health and disease. **Front Physiol**, v. 2, n. 12, 2011.
53. GUAN, J. et al. GPER Agonist G1 Attenuates Neuroinflammation and Dopaminergic Neurodegeneration in Parkinson Disease. **Neuroimmunomodulation**. v. 30, n. p. 213-214, 2023.
54. GUO, Z. Rotenone impairs learning and memory in mice through microglia-mediated blood brain barrier disruption and neuronal apoptosis. **Chemosphere**, v. 291, n. 3, 2022.
55. GUYTON, Arthur C. *et al.* **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1173 p. ISBN 978-85-352-4980-4.
56. HÅKANSSON, A. et al. Interaction of polymorphisms in the genes encoding interleukin-6 and estrogen receptor beta on the susceptibility to Parkinson's disease. **American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics**, v. 133 B, n. 1, p. 88–92, 2005.
57. HASEGAWA, S. et al. Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. 142-164, 2015.
58. HILL-BURNS, E.M.; DEBELIUS, J.W.; MORTON, J.T. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures in the gut microbiome. **Mov Disord**, v. 32, n. 5, p. 739-749, 2017.

59. HILTON, D. et al. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 127, n. 2, p. 235-41, 2014.
60. HOBSON, D.E. Clinical manifestations of Parkinson's disease and parkinsonism. **Can J Neurol Sci**, v. 30, n. 3, p. S2-9, 2003.
61. HODES, G. E. et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 16136–16141, 2014.
62. HOUSER, M.C.; TANSEY, M.G. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? **NPJ ParkinsonsDis**, v. 3, n. 1, 2017.
63. ILIEVA, N.M. et al. LRRK2 kinase inhibition protects against Parkinson's disease-associated environmental toxicants. **Neurobiol Dis**, v. 196, n. 6, 2024.
64. IVANOV, I.I.; HONDA K. Intestinal commensalmicrobes as immunomodulators. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 10, p. 496-508, 2012.
65. JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: neuropsychiatric aspects. **Compr Physiol**, v. 4, n. 4, p. 715-38, 2014.
66. JOHANSSON, B.; ROOS, B. E. 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's syndrome treated with L-DOPA. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 232–235, 1971.
67. JOHNSON, M.E.; STRINGER, A.; BOBROVSKAYA, L. Rotenone induces gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 65, n. 3, p. 174-185, 2018.
68. KARLSSON, F.H. et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. **Nature**, v. 498, n. 6, p. 99-103, 2013.
69. KESHAVARZIAN, A. et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. **MovDisord**, v. 30, n. 9, p. 1351-60, 2015.
70. KESSEL, S. P. V., EL AIDY, S. Bacterial Metabolites Mirror Altered Gut 3 Microbiota Composition in Patients 4 with Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, 2019.

71. KIM, M.S. et al. Advanced human iPSC-based preclinical model for Parkinson's disease with optogenetic alpha-synuclein aggregation. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 7, p. 973-986, 2023.
72. KRIKS, S. et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. **Nature**, v. 480, n. 11, p. 547-51, 2011.
73. KRÜGER, R. et al. Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 107, n. 5, p. 553–562, 2000.
74. LEE, Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 10, 2012.
75. LEENTJENS, A. F. G. et al. Higher Incidence of Depression Preceding the Onset of Parkinson's Disease: A Register Study. **Movement Disorders**. [s.l.: s.n.].
76. LEES, A.J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, p. 2055-66, 2009.
77. LEY, R.E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 12, p. 1022-3, 2006a.
78. LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 837-48, 2006b.
79. LOANE, D.J. et al. Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 6, p. 920-31, 2009.
80. LORENZL, S. et al. Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. **Exp Neurol**. v. 178, n. 11, p. 13-20., 2002.
81. LUBOMSKI, M.; DAVIS, R.L.; SUE, C.M. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 267, n. 5, p. 1377-1388, 2020.
82. LÜHRS, H. et al. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. **Scand J Gastroenterol**, v. 37, n. 4, p. 458-66, 2002.
83. MACHADO, M. M. F. et al. PPAR-γ agonist pioglitazone reduces microglial proliferation and NF-κB activation in the substantia nigra in the 6-

- hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 4, p. 556–564, 2019.
84. MACHADO, S.M.J. et al. Music Therapy and Parkinson's Disease: A Systematic Review from 2015-2020. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 11, 2021.
85. MA, M. et al. Antidepressant effects of combination of brexpiprazole and fluoxetine on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 4, p. 525–533, 1 fev. 2017.
86. MATTILA, K. M. et al. Association of an interleukin 1b gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, n. 6, p. 400–402, 2002.
87. MAYEUX, R. et al. Altered serotonin metabolism in depressed patients with parkinson's disease. **Neurology**, v. 34, n. 5, p. 642–646, 1984.
88. MCNAMARA, R.K.; LOTRICH, F.E. Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: a new therapeutic target? **Expert Rev Neurother**, v. 12, n. 9, p. 1143-61, 2012.
89. MCNELIS JC. et al. GPR43 Potentiates β -Cell Function in Obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3203-17, 2015.
90. MEI, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of dexrazoxane on dopaminergic neuron degeneration in rodent models of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 160, n. January, p. 107758, 2019.
91. MÉNARD, C. et al. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 62–80, 2017.
92. MENDONÇA, I.P. et al. Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: A review. **Int Immunopharmacol**, v. 83, n. 6, 2020.
93. MENZA, M. et al. The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. **Psychosomatics**, v. 51, n. 6, p. 474–479, 2010.
94. MERTSALMI, T.H. Et al. More than constipation - bowel symptoms in Parkinson's disease and their connection to gut microbiota. **Eur J Neurol**, v. 24, n. 11, p. 1375-1383, 2017.

95. METTA, V. et al. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: molecular pathology and implications of gut microbiome, probiotics, and fecal microbiota transplantation. **J Neurol**, v. 269, n. 3, p. 1154-1163, 2022.
96. MILLER, A.H.; MALETIC, V.; RAISON, C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 5, p. 732-41, 2009.
97. MILLER, D.B.; O'CALLAGHAN, J.P. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. S40-6, 2015.
98. MILLER, T.L.; WOLIN, M.J. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, n. 5, p. 1589-92, 1996.
99. BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêutica da Doença de Parkinson**. Brasília, 2017.
100. MORRISON, D.J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**. v. 7, n. 5, p. 189-200. 2016.
101. MÜLLER, N. et al. Childhood Adversity and Current Stress are related to Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Major Depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 253, n. November 2018, p. 270–276, 2019.
102. NISHINA, P.M.; FREEDLAND, R.A. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. **J Nutr**, v. 120, n. 7, p. 668-73, 1990.
103. NISHIO, J.; HONDA, K. Immunoregulation by the gut microbiota. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 11, p. 3635-50. 2012.
104. NOWAK, P. et al. Molekularne mechanizmy działania lewodopy w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona [Molecular mechanisms of levodopa action in animal models of Parkinson's disease]. **Neurol Neurochir Pol**, v. 40, n. 12, p. 517-25, 2006.
105. NUTT, J.G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa. **Mov Disord**, v. 3, p. S580-4, 2008.
106. NUTT, J.G.; HOLFORD, N.H. The response to levodopa in Parkinson's disease: imposing pharmacological law and order. *Ann Neurol*. v. 39, n. 5, p. 561-73. 1996.

107. OBESO, J.A. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 3, p. S548-59, 2008.
108. OLANOW, C.W.; SCHAPIRA, A.H. Therapeutic prospects for Parkinson disease. **Ann Neurol**, v. 74, n. 9, p. 337-47, 2013.
109. ORRHAGE, K.; NORD, C.E. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. **Drugs Exp Clin Res**. v. 26, p. 95-111, 2000.
110. OSIMO, E. F. et al. Prevalence of low-grade inflammation in depression: A systematic review and meta-analysis of CRP levels. **Psychological Medicine**, v. 49, n. 12, p. 1958–1970, 2019.
111. PARK, E. S.; KIM, S. R.; JIN, B. K. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 contributes to mesencephalic dopaminergic neuronal survival by inhibiting microglia-originated oxidative stress. **Brain Research Bulletin**, v. 89, n. 3–4, p. 92–96, 2012.
112. PASRICHA, T.S.; GUERRERO-LOPEZ, I.L.; KUO, B. Management of Gastrointestinal Symptoms in Parkinson's Disease: A Comprehensive Review of Clinical Presentation, Workup, and Treatment. **J Clin Gastroenterol**, v. 58, n. 3, p. 211-220, 2024.
113. PEREZ-PARDO, P. et al. Gut bacterial composition in a mouse model of Parkinson's disease. **Benef Microbes**, v. 9, n. 9, p. 799-814, 2018.
114. PEREZ-PARDO, P. et al. Promising Effects of Neurorestorative Diets on Motor, Cognitive, and Gastrointestinal Dysfunction after Symptom Development in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Front Aging Neurosci**, v. 9, n. 3, 2017.
115. PETERSEN, C; ROUND, JL; Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 7, p. 1024-33, 2014.
116. PETROV, V.A. Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease. **Bull Exp Biol Med**. v. 162, n. 4, p. 734-737. 2017.
117. PIRUNKASET, E. et al. Effect of Diacetylcurcumin Manganese Complex on Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondria Dysfunction, and Inflammation in the SH-SY5Y Parkinson's Disease Cell Model. **Molecules**, v. 29, n. 2, 2024.
118. PURVES, Dale P. *et al.* **Neurociências**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 936 p. ISBN 978-0-87893-697-7.

119. QUIGLEY, E.M.M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. **CurrNeurolNeurosci Rep**, v. 17, n. 10, 2017.
120. RADDER, D.L.M. et al. Physiotherapy in Parkinson's Disease: A Meta-Analysis of Present Treatment Modalities. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 34, n. 10, p. 871-880, 2020.
121. REMY, P. et al. Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, n. 6, p. 1314–1322, 2005.
122. RHEE, S.H.; POTHOUKAKIS, C.; MAYER, E.A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 5, p. 306-14, 2009.
123. RÍOS-COVIÁN, D. et al. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. **Front Microbiol**, v. 17, n. 2, 2016.
124. ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br J Nutr**. v. 104, n. 8, p. S1-63, 2010.
125. ROSENBLAT, J.D. et al. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 53, n. 8 p. 23-34, 2014.
126. SACHELI, M.A. et al. Exercise increases caudate dopamine release and ventral striatal activation in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 34, n. 12, p. 1891-1900, 2019.
127. SAMPSON, T.R. et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. **Cel**, v. 167, n. 12, p. 1469-1480, 2016.
128. SANTOS-GARCIA, D. et al. Gastroparesia y otros síntomas gastrointestinales en la enfermedad de Parkinson [Gastroparesis and other gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease]. **Rev Neurol**, v. 61, n. 9, p. 261-70, 2015.
129. SAVIGNAC, H.M. et al. Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT_{2A} receptor and IL1- β levels in male mice. **Brain Behav Immun**, v. 52, n. 2, p. 120-131, 2016.
130. SAVIGNAC, H.M. et al. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. **Neurochem Int**, v. 63, n. 12, p. 756-64, 2013.

131. SCHEPERJANS, F. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. **MovDisord**, v. 30, n. 3, p. 350-8, 2015.
132. SHERER, T.B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 23, n. 11, p. 10756-64, 2003.
133. SIMONYAN, K. Recent advances in understanding the role of the basal ganglia. **Faculty Rev-122**, v. 8, n. 1, 2019.
134. SOLEIMANI, N. et al. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. **Fish Shellfish Immunol**, V. 32, n. 2, p. 316-21, 2012.
135. STEINER, J.A.; QUANSAH, E.; BRUNDIN, P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. **Cell Tissue Res**, v. 373, n. 7, p. 161-173. 2018.
136. STILLING, R.M.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. Microbial genes, brain & behaviour – epigenetic regulation of the gut–brain axis. **Genes, Brain and Behavior**, v. 13, p. 69-86, 2014.
137. STODDARD-BENNETT, T.; REIJO P.R. Treatment of Parkinson's Disease through Personalized Medicine and Induced Pluripotent Stem Cells. **Cells**. v. 8, n. 1, 2019.
138. SUN, J. et al. Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorated motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease via gut microbiota-GLP-1 pathway. **Brain Behav Immun**, v. 91, n. 1, p. 703-715, 2021.
139. SURATHI, P. et al. Research in Parkinson's disease in India: A review. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 19 n. 3, p. 9-20, 2016.
140. TAI, Y.C. et al. Irritable bowel syndrome based on Rome IV diagnostic criteria associates with non-motor symptoms of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 113, n. 8, 2023.
141. TANNER, C. M.; GOLDMAN, S. M. Epidemiology of parkinson's disease. **Neurologic Clinics**, v. 14, n. 2, p. 317, 2005.
142. TYSNES, O.B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 124, n. 8, p. 901-905, 2017
143. UNGER, M.M. et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. **Parkinsonism RelatDisord**, v. 32, n. 11, p. 66-72, 2016.

144. VALCHEVA, R.; DIELEMAN, L.A. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, n. 2, p. 27-37, 2016.
145. VULEVIC, J. et al. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. **Br J Nutr.** v, 144, n. 8, p. 586-95, 2015.
146. WAHNER, A. D. et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 64, n. 6, p. 836–840, 2007.
147. WANG, X.M. et al. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the peripheral blood and the severity of depression and anxiety in patients with Parkinson's disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 9 p. 3853-3856, 2016.
148. WEAVER, C.M. et al. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 6, p. 6501-10, 2011.
149. WEINTRAUB, D. et al. Effect of Psychiatric and Other Nonmotor Symptoms on Disability in Parkinson's Disease. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 52, n. 5, p. 784–788, 2004.
150. ZHANG, Y. et al. Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy in vitro and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacological research**, v. 150, 1 dez. 2019.
151. ZHONG, J. et al. Baicalin ameliorates chronic mild stress-induced depression-like behaviors in mice and attenuates inflammatory cytokines and oxidative stress. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 52, n. 7, p. e8434, 2019.

8. ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL



Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IAM)

Termo Aditivo ao Certificado de Licença Nº 169/2021

Recife, 18 de novembro de 2024

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães – CEUA/IAM, em atenção à solicitação da pesquisadora Christina Peixoto, autoriza a alteração no projeto CEUA nº 169/2021 - “ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DE PREBIÓTICOS (FRUTO- OLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEO) SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL E AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON”, que encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ. A CEUA concede a extensão de 90 dias sobre o prazo de vigência da licença. Desta forma, esta licença está vigente até 01 de junho de 2025.

Documento assinado digitalmente
VIRGINIA MARIA BARROS DE LORENA
Data: 18/11/2024 16:55:06-0100
verifique em <https://validar.it.gov.br>

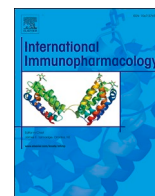
Virgínia Maria Barros de Lorena
Coordenadora CEUA/IAM
Mat. Siape 1984445

9. ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Metformin and fluoxetine improve depressive-like behavior in a murine model of Parkinson's disease through the modulation of neuroinflammation, neurogenesis and neuroplasticity

Ingrid Prata Mendonça^{a,b}, Igor Henrique Rodrigues de Paiva^{a,b},
Eduardo Pereira Duarte-Silva^{a,c}, Michel Gomes de Melo^{a,b}, Rodrigo Soares da Silva^{a,b},
Wilma Helena de Oliveira^a, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa^d,
Christina Alves Peixoto^{a,e,*}

^a Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), PE, Brazil

^b Postgraduate Program in Biological Sciences (PPGCB), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil

^c Postgraduate Program in Biosciences and Biotechnology for Health (PPGBBS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-PE)/Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil

^d Neurophysiology Laboratory, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Parkinson's disease
Rotenone
Depression
Metformin
Fluoxetine

ABSTRACT

Thereabout 30–40% of patients with Parkinson's Disease (PD) also have depression contributing to the loss of quality of life. Among the patients who treat depression, about 50% do not show significant improvement due to the limited efficacy of the treatment. So far, there are no effective disease-modifying treatments that can impede its progression. The current clinical approach is based on symptom management. Nonetheless, the reuse of drugs with excellent safety profiles represents an attractive alternative strategy for treating of different clinical aspects of PD. In this study, we evaluated the effects of metformin separately and associated with fluoxetine on depressive like-behavior and motor alterations in experimental Parkinson's disease. C57BL6 mice were induced with rotenone (2.5 mg/kg/day) for 20 days and treated with metformin (200 mg/kg/day) and fluoxetine (10 mg/kg/day) from the 5th day of induction. The animals were submitted to Sucrose Preference, Tail Suspension, and rotarod tests. Hippocampus, prefrontal cortex, and substantia nigra were dissected for molecular and morphological analysis. Metformin and fluoxetine prevented depressive-like behavior and improved motor impairment and increased TH nigral positive cells. Metformin and fluoxetine also reduced IBA-1 and GFAP positive cells in the hippocampus. Moreover, metformin reduced the phospho-NF- κ B, IL-1 β in the prefrontal cortex and iNOS levels in the hippocampus. Both metformin and fluoxetine increased neurogenesis by increasing KI67, but only the combined treatment increased neuronal survival by NeuN positive cells in the hippocampus. In addition, fluoxetine reduced cell death, decreasing caspase-3 and PARP-1 levels. Lastly, metformin potentiated the effect of fluoxetine on neuroplasticity by increasing BDNF positive cells. Metformin has antidepressant and anti-parkinsonian potential due to anti-inflammatory neurogenic, and neuroplasticity-inducing effects when combined with fluoxetine.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the imbalance between cholinergic and dopaminergic activity in the striatum and cortical regions due to the progressive death of

dopaminergic neurons from the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) [1]. The classic motor symptoms of PD are resting tremor, muscle stiffness, bradykinesia, and changes in posture and balance, while depression is the main psychiatric non-motor symptom associated with PD [2–4].

* Corresponding authors at: Christina Alves Peixoto, Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, CEP 50670-420, Brasil. Tel. : +(55) 81 21012557.

E-mail addresses: ingridpratamendonca@gmail.com (I.P. Mendonça), christina.peixoto@fiocruz.br (C.A. Peixoto).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108415>

Received 21 September 2021; Received in revised form 10 November 2021; Accepted 25 November 2021

Available online 8 December 2021

1567-5769/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

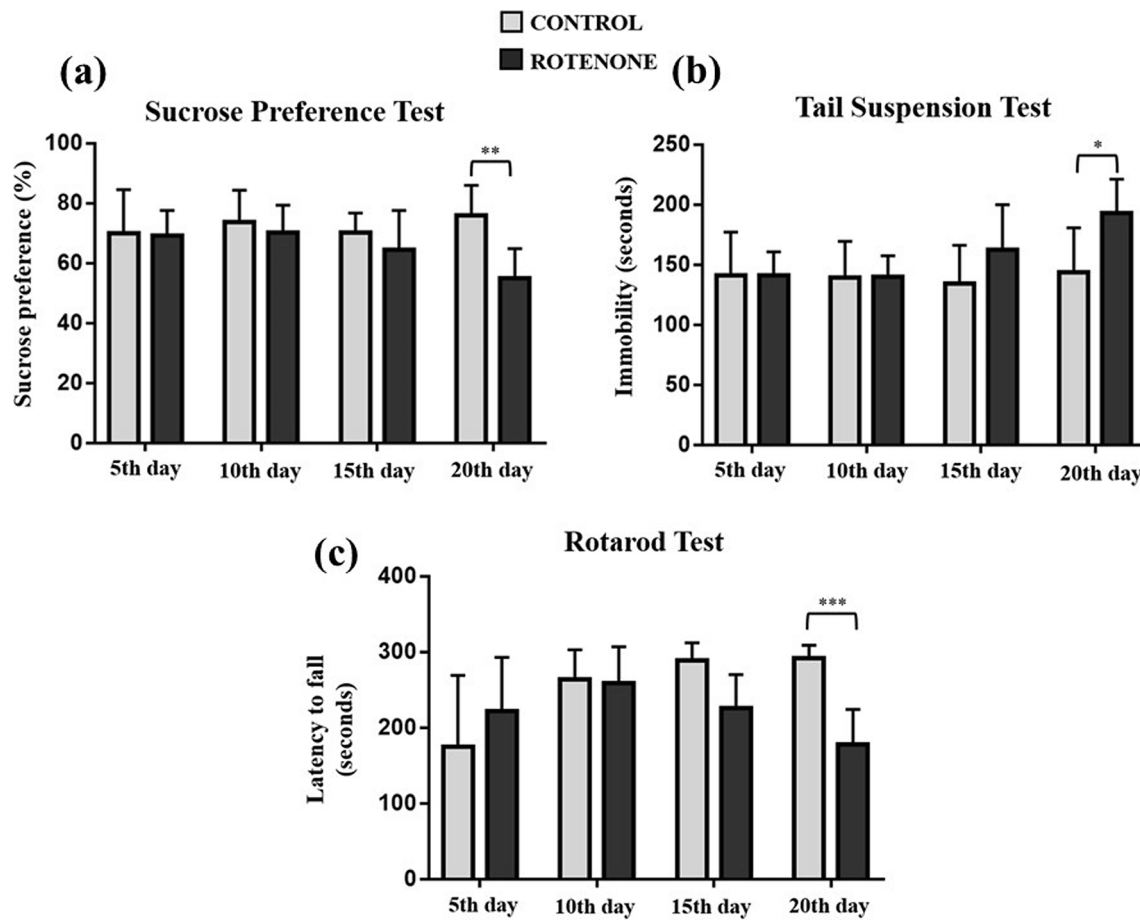


Fig. 1. Pilot study: (a) **Sucrose Preference Test** evaluated by percentage (%) of CONTROL and ROTENONE groups on days 5th ($p > 0.9999$), 10th ($p = 0.9473$), 15th ($p = 0.723$) and 20th ($p^{**} = 0.0016$) along the induction period with 2.5 mg/kg of rotenone daily; (b) **Tail Suspension Test** evaluated immobility time of CONTROL and ROTENONE groups on days 5th ($p > 0.9999$), 10th ($p > 0.9999$), 15th ($p = 0.2977$) and 20th ($p^{*} = 0.0139$) along the induction period with 2.5 mg/kg of rotenone daily; (c) **Rotarod test** assessed by latency to fall (seconds) of CONTROL and ROTENONE groups on days 5th ($p = 0.1983$), 10th ($p = 0.9994$), 15th ($p = 0.0773$) and 20th ($p^{***} = 0.0003$) along the induction period with 2.5 mg/kg of rotenone daily. Values are presented as mean $\pm$ SD, statistical differences were analyzed by two-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc test.

Thereabout 30–40% of PD patients have depression, contributing to the worsening of quality of life of these patients. The pathogenesis of depression is not restricted to changes in monoaminergic signaling but includes disorders of the endocrine and immune system, glutamate excitotoxicity, abnormal autophagy process and microglial activation with high levels of inflammatory mediators [5,6]. In PD pathophysiology, cytoplasmic aggregates of α -synuclein increase oxidative stress, impair autophagy and promote glial reactivity leading to neuro-inflammation with activation of the Nuclear Transcription Factor kappa B (NF- κ B) and consequent expression of pro-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor (TNF- α) interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin (IL-6) [7,8].

Clinical studies indicate a bidirectional relationship between inflammation and depression; depression can induce inflammatory processes, and inflammation can induce depressive episodes [9–11]. In PD patients, the increased expression of inflammatory cytokines was positively correlated with the severity of depression and anxiety with high levels of TNF- α , high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and soluble IL-2 receptor [12]. Moreover, an experimental study using C57BL/6 mice in a PD model showed depressive behavior, impaired recent memory performance and increased Cyclooxygenase 2 (COX-2) and TNF- α inflammation markers [13].

Metformin, the drug more prescribed for type 2 diabetes mellitus (T2DM) treatment, has anti-inflammatory activity by inhibiting NF- κ B in addition to neurogenesis-inducing effects, suggesting that

metformin may have therapeutic action in neurodegenerative and neuroinflammatory diseases [14–16]. By its turn, fluoxetine is a drug belonging to the class of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and also has anti-inflammatory effect and induce neurogenesis. SSRIs are the most commonly prescribed drugs for the treatment of depression and various anxiety disorders. Although the actions of SSRIs at molecular and cellular levels are still poorly understood, several studies suggest that SSRIs exert their behavioral activity in rodents through cellular and molecular changes in the hippocampus as well as in other brain structures [17–20]. In addition, studies show that a combined treatment of metformin and fluoxetine was more effective than fluoxetine alone in improving the depressive phenotype in animal models of depression induced by chronic restraint stress and a high-lipid diet, by increasing gene expression of trophic factors and increased long-term potentiation (LTP) in the hippocampus [21,22].

Among parkinsonian patients who treat depression, about 50% do not show significant improvement due to the limited efficacy of the available treatment [3,23]. Therefore, it is necessary to develop therapeutic alternatives to treat depression in patients with PD.

The present study evaluated the effects of metformin alone or in combination with fluoxetine on depressive-like behavior and motor impairment as well as molecular changes in the prefrontal cortex and hippocampus in a rotenone-induced PD model.

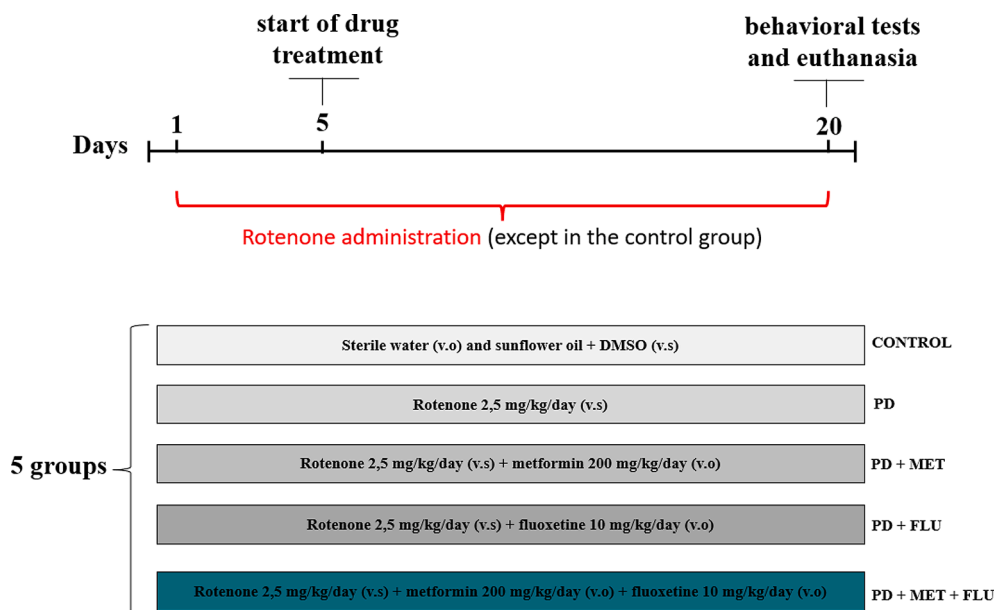


Fig. 2. Experimental design. All the animals were divided into five groups: CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU. Rotenone administration was performed daily for 20 days; Treatments with drugs were realized for 15 days from the 5th day of induction with rotenone. On the 20th day, the animals were submitted to the rotarod, preference of sucrose and tail suspension tests, and then euthanized.

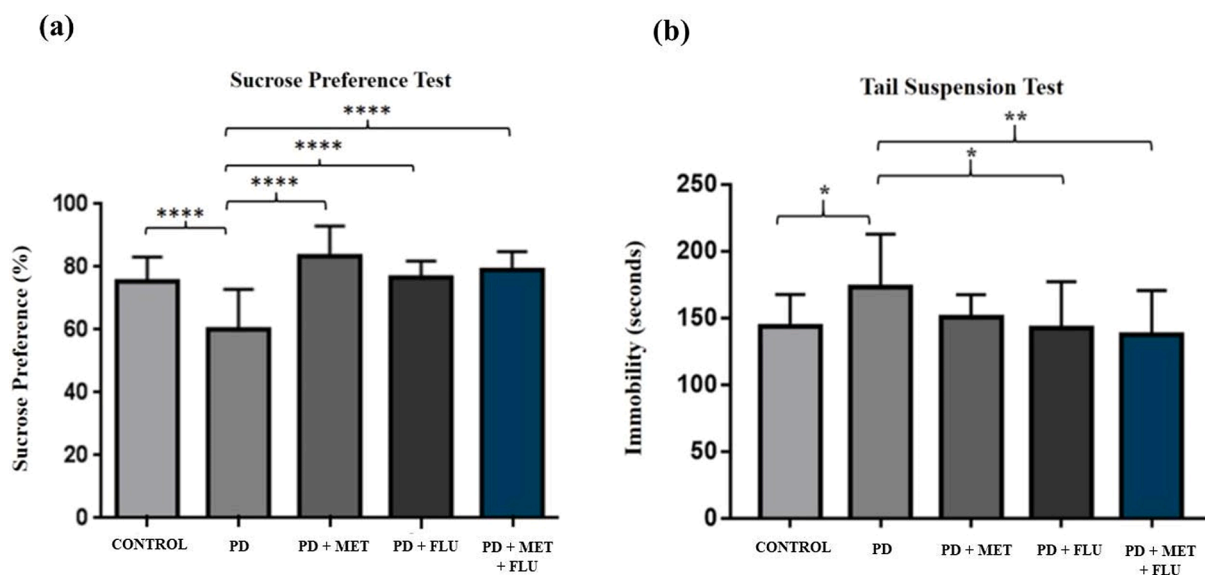


Fig. 3. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on antidepressive behavior in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean $\pm$ SD): (a) Effect of drugs on sucrose preference, analyzed by ANOVA statistical tests of variance one-way ($p < 0.05$) and Tukey's post-hoc test, data shown as a percentage (%). ****: $p < 0.0001$; (b) Effect of drugs on Immobility Time presented in seconds (s), analyzed by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. *: $p = 0.1$; **: $p = 0.006$.

2. Materials and methods

2.1. Pilot study

Firstly, was conducted a pilot study. Male 8-week-old C57BL/6 mice were randomly assigned into two groups: CONTROL ($n = 10$) and ROTENONE ($n = 10$). The CONTROL group received vehicle solution (98% sunflower oil + 2% DMSO); the group rotenone received rotenone at a concentration of 2.5 mg/kg/day diluted in the vehicle solution, both vehicle solution and rotenone were administrated daily subcutaneously. This concentration was selected based on previous rodent studies (Basani et al., 2014; Morais et al., 2012; Zaminelli et al., 2014). Animals

were submitted to Sucrose Preference, Tail suspension, and Rotarod tests on the 5th, 10th, 15th, and 20th induction day. All the experiments in the present study were approved by the Animal Studies Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Institute (protocol number: 140/2019). All the animals were kept in a light-dark cycle (12 h light/dark), humidity 60 ± 10 , maintained in microisolators at a temperature of 23 ± 2 °C, with free access to water and fed (commercial diet). The animals care and treatment were performed by the guidelines of the National Institutes of Health Guide and Care of Laboratory Animals.

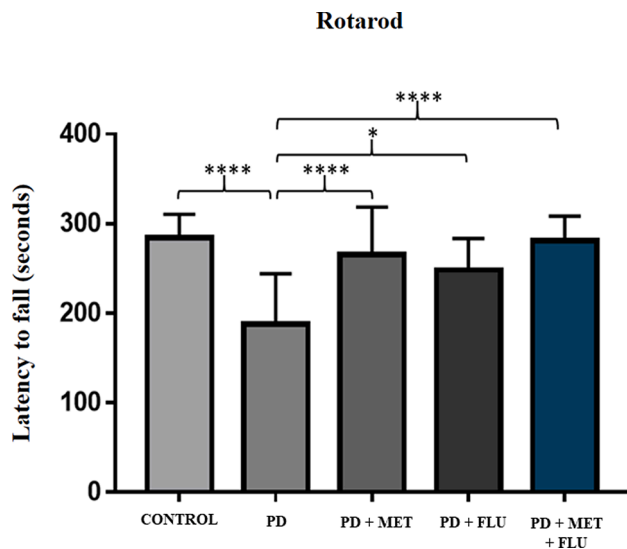


Fig. 4. Effects of metformin, fluoxetine and the association of both drugs on motor deficits in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU, assessed by the Rotarod test (mean $\pm$ SD), statistically analyzed by one-way variance test ANOVA ($p < 0.05$) and Tukey's post-hoc test, *: $p = 0.01$; ****: $p < 0.0001$.

2.2. Induction of experimental Parkinson's disease and treatments

Since the time of onset of depressive-behavior symptoms was established (day 20th – see results), 50 animals were subdivided into 5 experimental groups ($n = 10$ /group) as shown in Fig. 2 (1) CONTROL - animals received vehicle solution subcutaneously and water orally; (2) PD - animals received 2,5 mg/Kg/day of Rotenone subcutaneously; (3) PD + Metformin - animals received rotenone subcutaneously and metformin orally; (4) PD + Fluoxetine - animals received rotenone subcutaneously and fluoxetine orally; (5) PD + Metformin and Fluoxetine - animals received rotenone subcutaneously and metformin + fluoxetine orally. The drugs Metformin hydrochloride (Merck S.A., Rio de Janeiro, Brazil) and Fluoxetine hydrochloride (Eurofarma Laboratórios S.A., São Paulo, Brazil), were administered for 15 consecutive days at dose of 200 mg/Kg/day and 10 mg/Kg/day, respectively, starting at the 5th day of induction with rotenone (Fig. 2). The metformin hydrochloride dose chosen is equivalent to a human dose of 1000 mg/day [24], which is approximately an average of the recommended daily doses of 500 and 2000 mg for diabetic patients [25]. The fluoxetine hydrochloride dose was chosen is equivalent to a human dose of 50 mg/day [24], and as published elsewhere [21]. All groups were submitted to sucrose preference, tail suspension, and rotarod tests. After behavioral and motor tests, half of the animals was sacrificed by an intraperitoneally anesthetic overdose (150 mg/kg of thiopental + 1 mg/kg of lidocaine) for analysis by western blotting. Another half of animals was anesthetized and underwent transcardiac perfusion with fixative for immunohistochemical analysis.

2.3. Sucrose preference test (Anhedonia)

The Sucrose Preference Test (SPT) was performed on the 20th of rotenone-induction. The animals were presented with two bottles of water on opposite sides of the cage, one containing only water and the other containing a 2% sucrose solution, for a 24-hour habituation period. After this period, the animals were separated into individual cages and then replenished for 24 h more with two bottles previously weighed, during this period the bottles were changed on one side once to avoid the tendency of the animal for one of the bottles, at the end from that period the bottles were weighed again and consumption was established as the difference in bottle weights of before and after the 24

h period (before - after = consumption), the percentage of sucrose consumption was calculated using the equation: % of preference sucrose = sucrose consumption $\times$ 100/total consumption. Total consumption was defined as the sum of water consumption and sucrose consumption [26].

2.4. Tail suspension test (despair-like behavior)

The Tail Suspension Test (TST) consists of evaluating “despair-like behavior” which represents an endophenotype of the depression induced in animals. In this test, the animals are suspended by their tails with adhesive tape, in a position that can not escape or holding close surfaces, the lack of behavior related to escape is considered immobility [27]. We adapted the protocol by Can and collaborators (2012). The animals were individually suspended by their tails and accustomed to that position for the first minute, then, for the next five minutes, immobility time was recorded, which is directly proportional to depressive behavior, then the animals were returned to their respective cages.

2.5. Rotarod

The rotary bar test or Rotarod represents one of the main and oldest approaches to characterize motor dysfunctions in animal models, and it is a test that assesses the motor coordination and balance of the animal by its ability to remain on the cylindrical rod, which moves rotationally at a constant or accelerated speed for some time [28]. The apparatus used consists of four dividers for four animals and the cylindrical bar. The animals were initially adapted to the rotating bar for 5 min two days before the test (on day 18th) at a constant speed of 5 rpm. On the 20th day, the animals were accustomed in the test room for 30 min, and then they were placed on the rotating rod, under a speed of 5 to 37 rpm. The animals remained on the rod for a maximum period of 300 s; during this period, the latency to fall was recorded, reflecting the animal motor impairment level.

2.6. Immunohistochemistry

Part of the animals was perfused transcardially with 20 ml of saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA) (40 ml) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7. Then, the brains were removed and post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7 (monobasic heptahydrate and sodium phosphate basic; Sigma - Aldrich). The samples were dehydrated in several washing steps with ethanol (Insofar Chemical Co., RJ, Brazil), purified in xylol, and included in paraffin (Merck, USA). The brain coronal sections were cut using the RM 2035 microtome (Reichert S, Leica) and mounted on glass slides, rehydrated, and treated with 20 mM citrate buffer (at pH 6.0) at 100 °C for 30 min. The endogenous peroxidase blockade was performed with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂), and the sections were blocked with 5% bovine serum albumin (Miles, Naperville, IL, USA) for 1 h at room temperature. The primary polyclonal antibodies used to assess hippocampal glial reactivity were: anti-GFAP (Novus Biological, catalog number NB300-141 at 1:1000 dilution) and anti-IBA-1 (Wako, catalog number 016-20001 at 1:500 dilution). To assess neuronal death and survival in the hippocampus were used anti-caspase-3 (Abcam - ab4051 at 1:100 dilution), anti-PARP-1 (Abcam - ab6079 at 1:100 dilution) and anti-NeuN (Novus Biologicals - NBP177686 at 1:100 dilution), respectively. For the assessment of hippocampal neuroplasticity were used anti-p-CREB (Cell Signaling, catalog number 9198 at 1:500 dilution) and anti-BDNF (ANT-010 Alomone labs at 1:500 dilution) antibodies. Sections of the substantia nigra were incubated with anti-Tyrosine Hydroxylase (AB152-Merk, at 1:500 dilution) to access dopaminergic neuronal death. All antibodies were incubated in tissues overnight at 4 °C. Sections were incubated with a secondary antibody conjugated with biotin for 1 h after washing (Dako

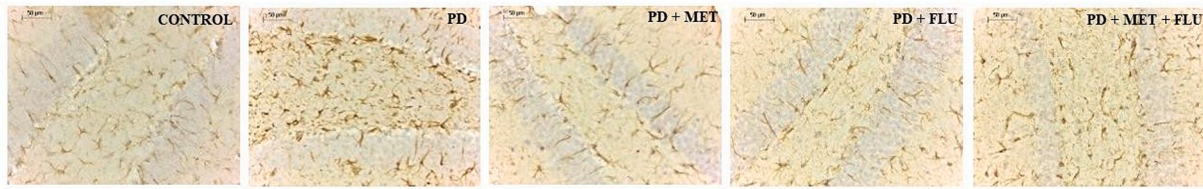
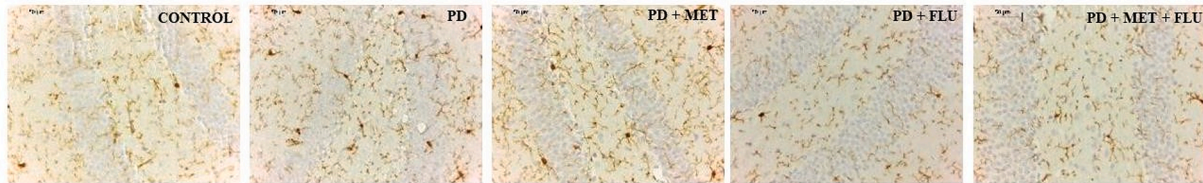
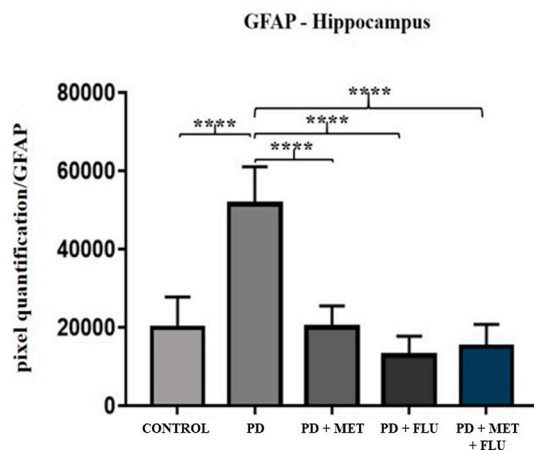
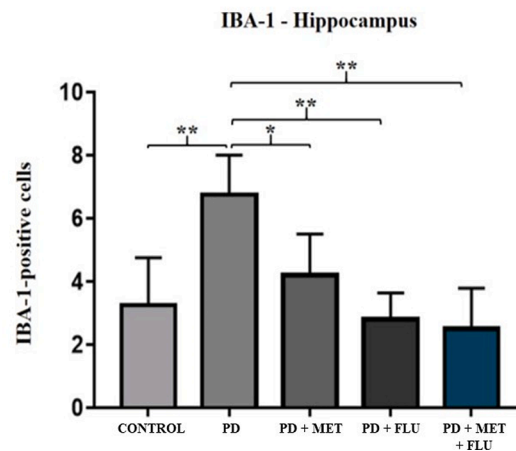
(a) GFAP**(b) IBA-1****(c)****(d)**

Fig. 5. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on the expression of GFAP and IBA-1 hippocampal in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean $\pm$ SD). Positive immunoreactivity is indicated by dark brown color: **(a)** Immunohistochemistry images for GFAP labeling, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; **(b)** Representative images from immunohistochemistry for IBA-1 labeling, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; **(c)** Graphical representation of GFAP optical density obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. ****: $p < 0.0001$; **(d)** Graphical representation of the IBA-1 optical density obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. *: $p = 0.04$ (PD Vs PD + MET); **: $p = 0.007$ (CONT Vs PD); $p = 0.0012$ (PD Vs PD + MET + FLU); $p = 0.0015$ (PD Vs PD + FLU).

Cytomation, Biotinylated Link Universal HRP; K0690, CA, USA). The sections were revealed by incubation with 30–3-diaminobenzidine (DAB) as a chromogen, contrasted with the Carrazi's hematoxylin, and assembled in Entellan (Merck, catalog number: 1079610100, USA). The images were captured by the microscope (Leica ICC50 HD). Three slides from 3 different animals were used to obtain 9 images per group ($n = 9$), the optical density was performed using the GIMP version 2.6.11 (GNU Image Manipulation Program software, CNET Networks, Inc. Australia) and the counting of positive cells was performed using the ImageJ version 1.52 program.

2.7. Immunofluorescence

To assess the hippocampal neurogenesis process, sections paraffin-embedded were treated with a blocking buffer (1 $\times$ TBS-T + 5% bovine serum albumin) for 1 h, and then incubated overnight with the primary anti-Ki67 (Abcam 15,580 at 1:300 dilution). The sections were then incubated with a secondary fluorescent Alexa fluor 488 anti-rabbit (Vector Laboratories at 1:100 dilution) antibody for 2 h. Subsequently, the sections were incubated with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI,

Invitrogen at 1:200 dilution) for nuclear labelling for 5 min, in the dark. The images were captured by the fluorescence microscope (Zeiss Micro Imaging GmbH) equipped with a camera (Zeiss Axio Cam MRM). Three slides from 3 different animals were used to obtain 9 images per group ($n = 9$), and the optical density and was made using the program GIMP version 2.6.11 (GNU Image Manipulation Program software, CNET Networks, Inc. Australia).

2.8. Western blotting

The hippocampus and prefrontal cortex were homogenized in a tube containing extraction cocktail (10 mM/l EDTA, 2 mmol/l phenyl methane sulfonyl fluoride, 100 mmol/l sodium fluoride, sodium 10 mmol/l, 10 mmol/l sodium orthovanadate, 10 μ M aprotinin and 100 mmol/l Tris-aminomethane - pH 7.4) using a manual macerator for tissue breakdown and protein release. Thereafter, the homogenate was centrifuged and the supernatant extracted, obtaining a pool of samples of each group. In an electrophoresis gel, 20 μ g of total protein per group was applied. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio Rad 162–0115), blocked for 1 h with 5% bovine serum albumin

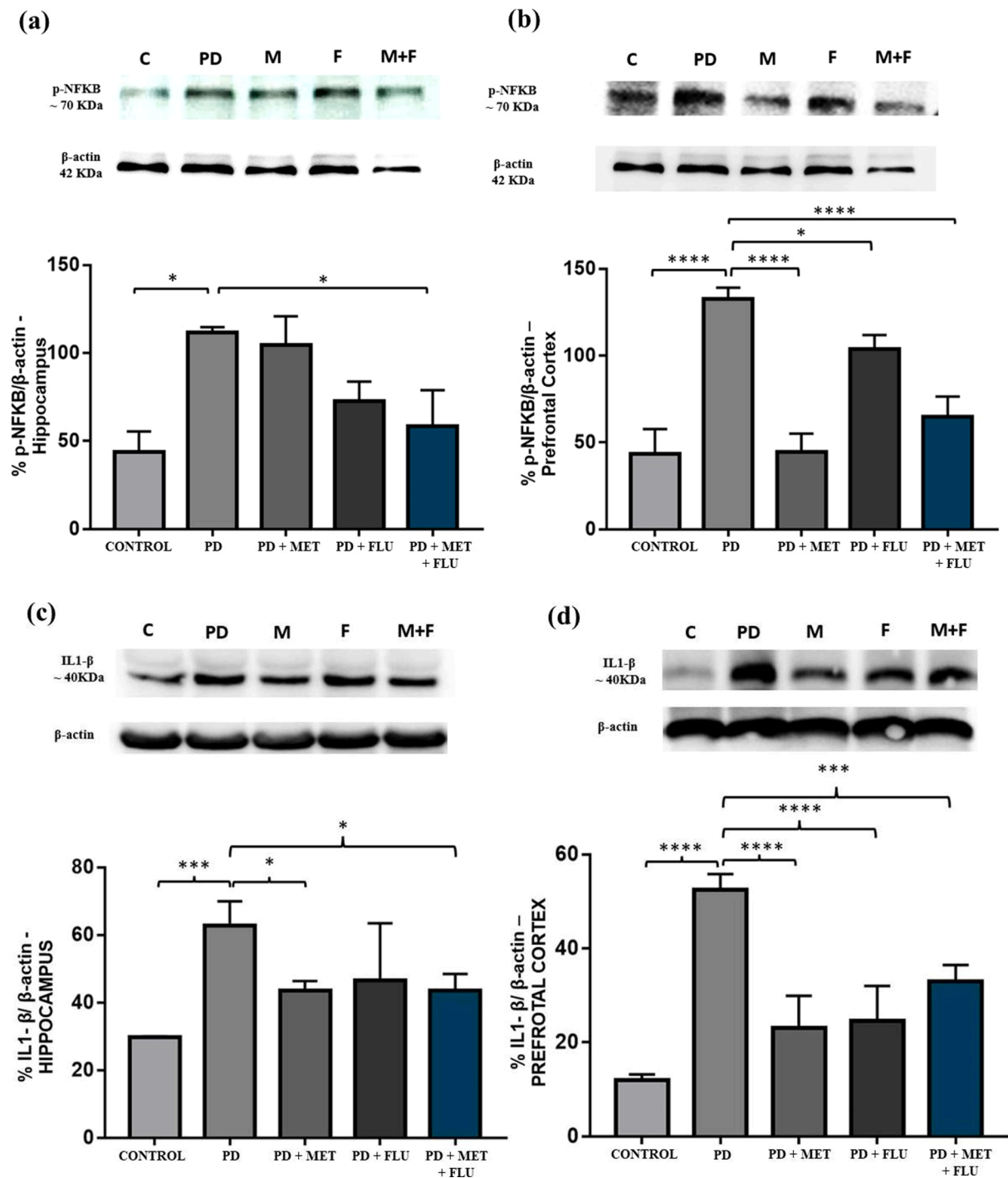


Fig. 6. Proteins levels in the hippocampus and prefrontal cortex of animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean ± SD): (a) protein levels of p-NF-kB in the hippocampus. *: $p = 0.0146$; (b) p-NF-kB protein levels in the prefrontal cortex. ****: $p < 0.0001$, *: $p = 0.01$; (c) IL-1 β protein levels in the hippocampus. ***: $p = 0.0005$, *: $p = 0.03$; (d) IL-1 β protein levels in the prefrontal cortex. ****: $p < 0.0001$ ****: $p = 0.0006$; (e) iNOS protein levels in the hippocampus. ****: $p < 0.0001$; (f) iNOS protein levels in the prefrontal cortex. **: $p = 0.006$, *: $p = 0.02$. Quantification by pixel density of bands by imageJ. Bands were analyzed by one-way ANOVA - statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test.

(Miles, Naperville, IL, USA) diluted in TBS-T and incubated overnight at 4 °C with primary antibody anti-p-NF-kB (3033 Cell Signaling, at 1:1000 dilution), anti-IL-1 β (BBP232 GENWAY at 1:500 dilution) anti-iNOS (610600 BD at 1:500 dilution), and β -actin (A2228, Sigma-Aldrich, at 1:2000 dilution). The technique was performed in duplicate for confirmation of results and β -actin was used as a control by ratio of protein/ β -actin in each group. The bands were detected by a chemiluminescent

reagent (Immobilon Forte Western HRP substrate WBLUF0500) and visualized by iBright CL1500 Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific). ImageJ software version 1.50i was used to quantify the pixels density of bands.

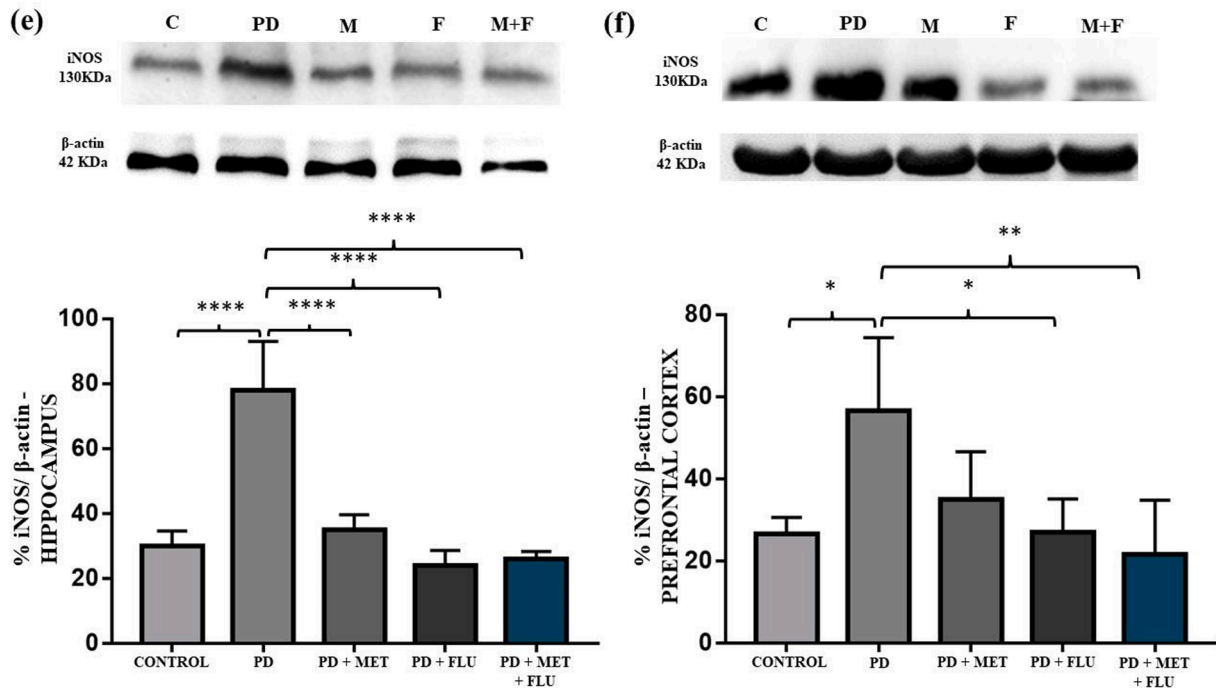


Fig. 6. (continued).

2.9. Statistical analysis

The GraphPad Prism (version 7.0) was used for the statistical analyses. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tuckey's post-hoc test. The pilot study was analyzed by two-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc test. Probability values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Pilot study - rotenone induces depressive-like behavior and moderate motor impairment on day 20th of induction with rotenone

In the pilot study, animals of the CONTROL and ROTENONE groups were submitted to SPT, TST and Rotarod test on day 5th, 10th, 15th and 20th of induction with rotenone. Only on day 20th, animals of the ROTENONE group showed less sucrose preference and more significant immobility assessed by SPT and TST, respectively, in relation to the CONTROL group (CONTROL Vs PD SPT p -value = 0.0016; CONTROL Vs PD TST p -value = 0.013) (Fig. 1a and 1b). In addition, the ROTENONE group also showed a 39% decrease in latency time to fall compared to the control group in the rotarod test on the 20th day (CONTROL Vs PD p -value = 0.0003) (Fig. 1c).

3.2. Metformin and fluoxetine reversed the depressive-like behavior in rotenone-induced animals

The rotenone-induced animals showed less preference for sucrose evaluated by the SPT compared to the control (CONTROL Vs PD p -value < 0.0001). However, both treatments, metformin (PD Vs PD + MET p -value < 0.0001) and fluoxetine (PD Vs PD + FLU p -value < 0.0001) alone or in combination (PD Vs PD + MET + FLU p -value < 0.0001) were able to prevent this behavior, demonstrating an anti-depressant action (Fig. 3a). The same pattern was observed in the TST, in which the immobility time is proportional to depressive-like behavior. In TST, rotenone-induced animals had a longer immobility time compared to the control (CONTROL Vs PD p -value = 0.01), while both fluoxetine alone

(PD Vs PD + FLU p -value = 0.02) and fluoxetine associated with metformin (PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.006) prevented the immobility behavior, as shown in Fig. 3b.

3.3. Treatment with metformin and fluoxetine reversed motor deficits rotenone-induced

As seen in Fig. 4, rotenone-induced animals showed loss of motor coordination assessed by the rotarod test (CONTROL Vs PD p -value < 0.0001). Meanwhile, treatment with metformin alone (PD Vs PD + MET p < 0.0001) and in combination with fluoxetine (PD Vs PD + FLU p -value < 0.0001), as well as fluoxetine alone (PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.01), were able to prevent the motor impairment.

3.4. Metformin and fluoxetine attenuated the hippocampal glial reactivity

In the hippocampus, administration of rotenone significantly increased the density and number of glial cells. There was a increasing in Glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive cells compared to the control group (CONTROL Vs PD p -value < 0.0001). As seen in the Fig. 5a and 5c, the treatment with metformin and fluoxetine alone and in combination was able to attenuate the hippocampal reactive gliosis significantly (PD Vs PD + MET, PD Vs PD + FLU, PD Vs PD + MET + FLU p -value < 0.0001). Rotenone also significantly increased the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) positive cells in relation to the control group (CONTROL Vs PD p -value = 0.007). Treatments with metformin and fluoxetine alone and in combination significantly reduced IBA-1 positive cells (PD Vs PD + MET p -value = 0.04; PD Vs PD + FLU p -value = 0.0015; PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.0012), as seen in the Fig. 5c and 5d.

3.5. Metformin alone or associated with fluoxetine attenuated the increasing of phospho-NF-κB, IL-1β and iNOS levels in hippocampus and prefrontal cortex rotenone-induced animals

As seen in Fig. 6a and 6b the phospho-NF-κB (p-NF-κB) levels were increased after the rotenone administration both in the hippocampus and in the prefrontal cortex (CONTROL Vs PD hippocampus p -value =

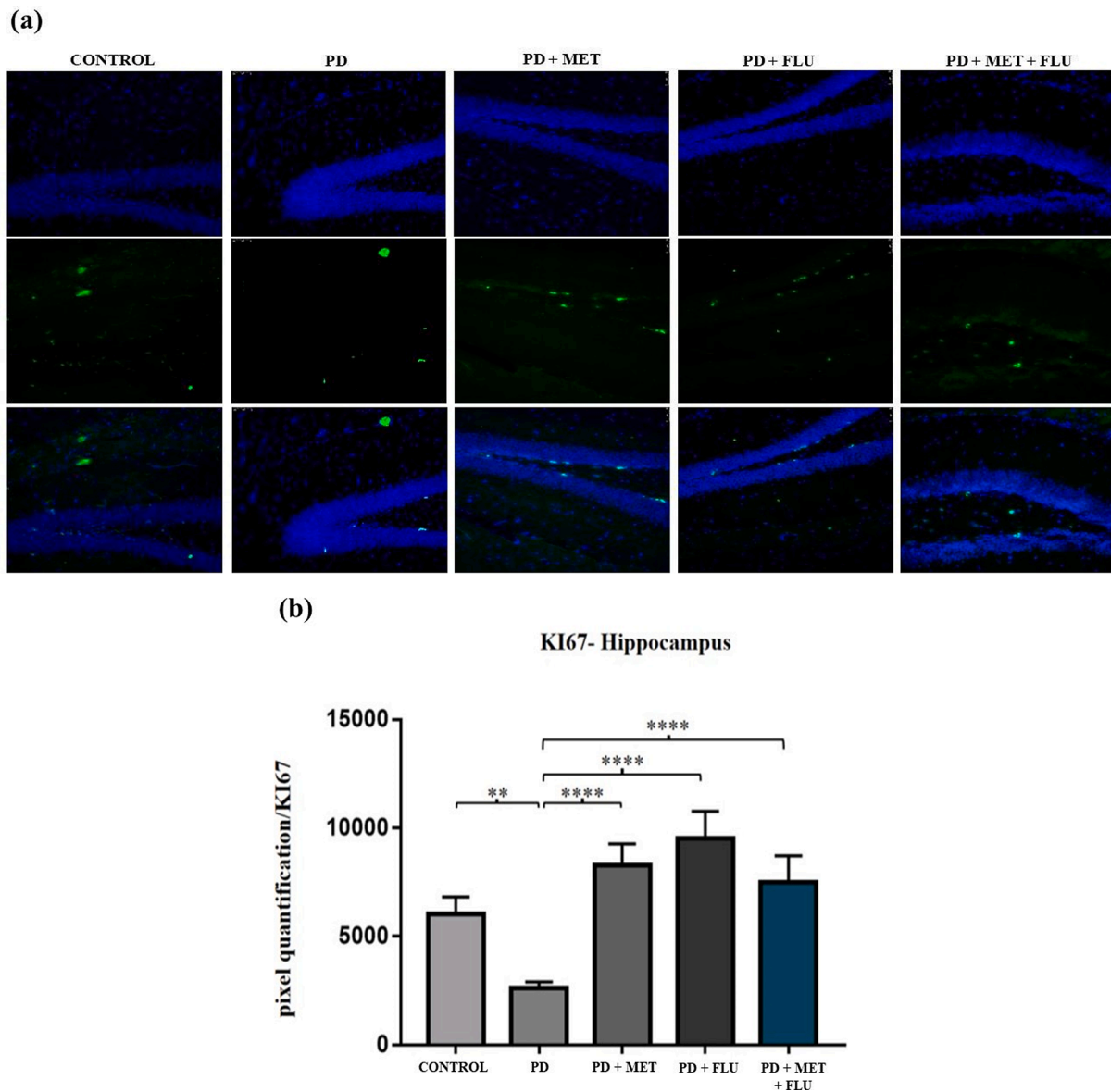


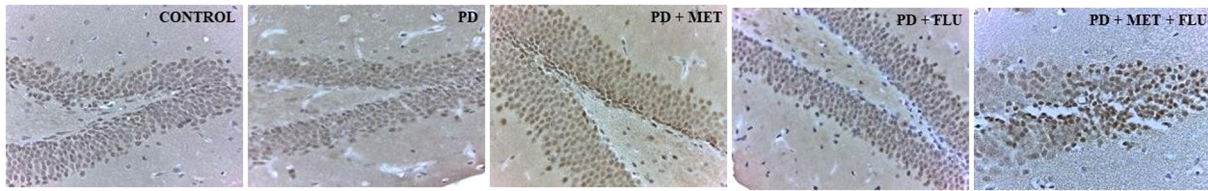
Fig. 7. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on the expression of KI67 hippocampal in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean $\pm$ SD): (a) Representative images of KI67 (green). Cell nucleus labeled with DAPI (blue), with the superimposed images (MERGE) in the hippocampus, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; (b) Graphical representation of KI67 optical density, obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. **: $p = 0.0013$; ****: $p < 0.0001$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

0.01; CONTROL Vs PD prefrontal cortex p -value < 0.0001). In the hippocampus, only the combined treatment of metformin and fluoxetine was able to attenuate this increase in p-NF-kB (PD Vs PD + MET + FLU hippocampus p -value = 0.02), while in the prefrontal cortex metformin and fluoxetine separately and in association were able to inhibit this expression (PD Vs PD + MET prefrontal cortex p -value < 0.0001 ; PD Vs PD + FLU prefrontal cortex p -value = 0.01; PD Vs PD + MET + FLU prefrontal cortex p -value < 0.0001).

The rotenone-induced animals also had increased IL-1 β protein levels in the hippocampus and prefrontal cortex (CONTROL Vs PD hippocampus p -value = 0.0005; CONTROL Vs PD prefrontal cortex p -value < 0.0001). This effect was significantly prevented by both metformin and fluoxetine separately and in association in the prefrontal cortex (PD Vs PD + MET p -value < 0.0001 ; PD Vs PD + FLU p -value < 0.0001 ; PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.0006). However, in the hippocampus, only metformin alone or in combination with fluoxetine, attenuated the increase in IL-1 β (PD Vs PD + MET p -value = 0.04; PD Vs PD + FLU p -value = 0.1; PD Vs PD

+ MET + FLU p -value = 0.03) (Fig. 6c and 6d). There was also an increase in the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) both in the hippocampus and in the prefrontal cortex in animals that received rotenone compared to the control group (CONTROL Vs PD hippocampus p -value < 0.0001 ; CONTROL Vs PD prefrontal cortex p -value = 0.02). In the hippocampus, metformin and fluoxetine separately or in association, were able to prevent iNOS increase (PD Vs PD + MET p -value < 0.0001 ; PD Vs PD + FLU p -value < 0.0001 ; PD Vs PD + MET + FLU p -value < 0.0001). In the prefrontal cortex, the administration of fluoxetine separately or in association attenuated the iNOS expression, however, the group that received the fluoxetine and metformin in association had greater statistical significance (PD Vs PD + MET p -value = 0.13; PD Vs PD + FLU p -value = 0.02; PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.006) (Fig. 6e and 6f).

(a) NeuN



(b)

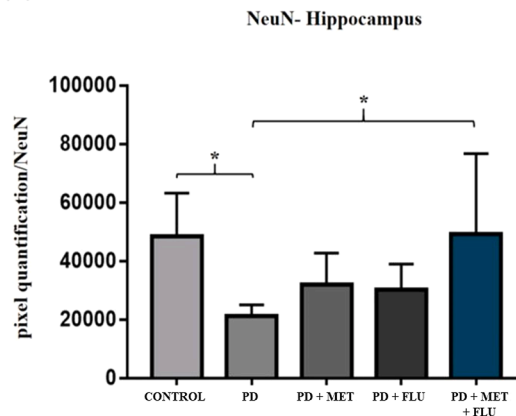


Fig. 8. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on NeuN expression for the detection of mature hippocampal neurons in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean $\pm$ SD). Positive immunoreactivity is indicated by dark brown color: (a) Representative images of immunohistochemistry for NeuN, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; (b) Graphical representation of the NeuN optical density obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. *: $p = 0.019$ (CONT Vs PD); *: $p = 0.04$ (SD Vs PD + MET + FLU).

3.6. Metformin and fluoxetine induced neurogenesis in rotenone-induced animals

Rotenone-induced animals showed fewer positive KI67 cells compared to the control group (CONTROL Vs PD p -value = 0.0013). However, this effect was reversed by treatment with metformin (PD Vs PD + MET p -value < 0.0001) and fluoxetine (PD Vs PD + FLU p -value < 0.0001) alone and in combination (PD Vs PD + MET + FLU p -value < 0.0001) (Fig. 7a and 7b).

3.7. The combination of metformin and fluoxetine promoted an increase in mature neurons in the hippocampus

The administration of rotenone caused degeneration of hippocampal neurons revealed by reducing NeuN protein immunoreactive cells (CONTROL Vs PD p -value = 0.019). However, treatment with the combination of metformin and fluoxetine prevented neuronal loss (PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.04) (Fig. 8a and 8b).

3.8. Fluoxetine and metformin attenuated hippocampal cell death

Rotenone-induced animals showed significantly increased levels of the nuclear enzyme Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) expression (CONTROL Vs PD p -value = 0.002), which reflects the intensity of cell death caused by this toxin. However, fluoxetine significantly reduced the hippocampal PARP-1 expression (PD Vs PD + FLU p -value = 0.001), thus attenuating the level of cell death. In turn, the administration of rotenone increased the expression of caspase-3 in the hippocampus of rotenone-induced animals in relation to the control group (CONTROL Vs PD p -value = 0.007). In contrast, treatment with fluoxetine separately (PD Vs PD + FLU p -value = 0.0002) and associated with metformin (PD Vs PD + MET + FLU p -value = 0.004) significantly reduced the PARP-1 expression (Fig. 9a and 9b).

3.9. Fluoxetine and metformin induce hippocampal synaptic plasticity

Rotenone reduced the expression of cAMP response element-binding protein (p-CREB) in relation to the control (CONTROL Vs PD p -value = 0.0004), however, fluoxetine significantly counteracted this effect (PD Vs PD + FLU p -value = 0.01) (Fig. 10a and 10b). Likewise, the expression of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) was also reduced by the administration of rotenone compared to the control (CONTROL Vs PD p -value = 0.01), however, BDNF levels was increased by fluoxetine (PD Vs PD + FLU p -value = 0.006) and potentiated by combined treatment (PD Vs PD + MET + FLU p -value < 0.0001), suggesting an enhancing effect of metformin when associated with fluoxetine (Fig. 10c and 10d).

3.10. Treatment with metformin and fluoxetine attenuated the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra

The administration of rotenone caused a significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the animals PD in comparison to the control (p -value = 0.0046), while metformin alone (p -value < 0.0001) or associated with fluoxetine (p -value = 0.003) was able to attenuate this loss, whereas fluoxetine alone had no significant effect on tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons (p -value = 0.06) (Fig. 11a-b).

4. Discussion

Some studies have demonstrated paradigms used in experimental research on depression, which reproduce depressive-like behaviors. In the Sucrose Preference Test (TPS), the "anhedonic-like" endophenotype is evaluated, measured by the reduction of sucrose consumption by the animal compared to baseline levels. Anhedonic rodents show a reduced preference for sucrose solution due to a reduced sense of reward from the sweet taste; similarly, the antidepressant efficacy of drugs is measured by the greater preference for sugar water [29,30]. By its turn, the tail suspension test (TSC), evaluates the "despair-like"

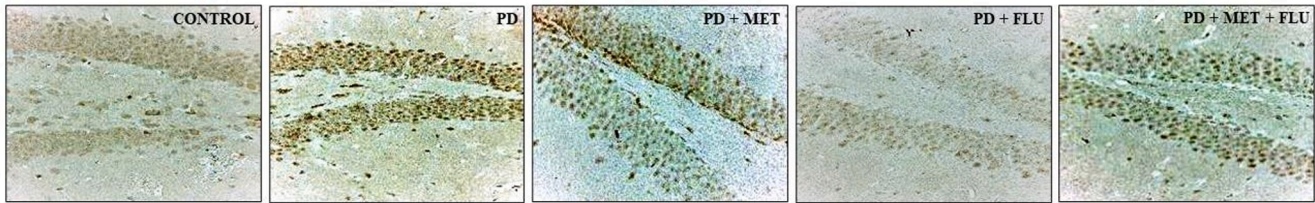
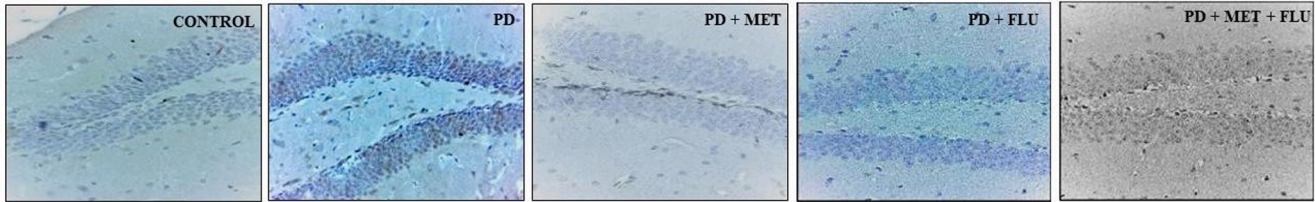
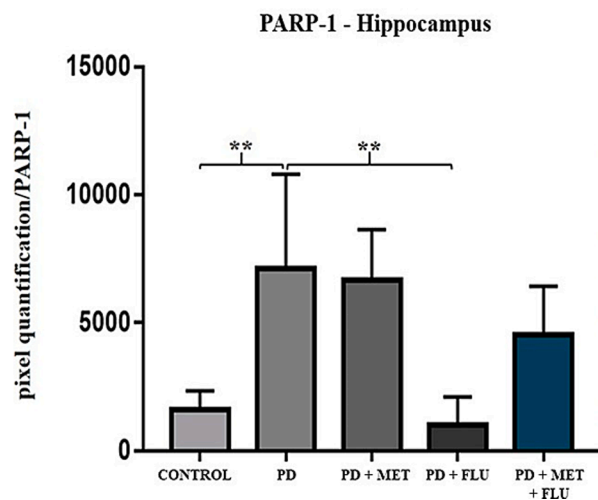
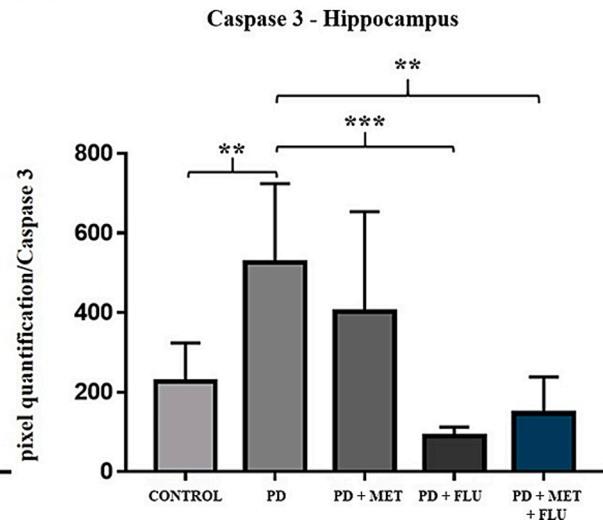
(a) PARP-1**(b) CASPASE 3****(c)****(d)**

Fig. 9. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on the expression of PARP-1 e Caspase-3 hippocampal in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean $\pm$ SD). Positive immunoreactivity is indicated by dark brown color: **(a)** Representative images of immunohistochemistry for PARP-1, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; **(b)** Representative images of immunohistochemistry for Caspase-3, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; **(c)** Graphical representation of the optical density of PARP-1 obtained by statistical tests of variance ANOVA one way ($p < 0.05$). Tukey's post-hoc test. **: $p = 0.002$ **(d)** Graphical representation of the optical density of Caspase-3 obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. **: $p = 0.007$; ***: $p = 0.0002$.

endophenotype, which is proportional to the immobility time [29,31].

As seen in Fig. 3, rotenone caused anhedonic behavior in animals compared to the control group, and this result corroborates recent studies using 6-Hydroxydopamine (OHDA)- induced PD models that proved the development of anhedonic and despair-like behavior or depressive-like behavior [32,33]. Metformin has been reported to have antidepressant effects in experimental depression studies [34]. Poginni et al. (2019) demonstrated in a depression model induced by unpredictable chronic stress that the combined treatment of fluoxetine and metformin was more effective than fluoxetine alone in improving the depressive phenotype after one week of treatment. This result was associated with increased IGF2 mRNA expression and an increase in long-term potentiation, specifically in the hippocampus [22]. In the PD model used in the present study, metformin and fluoxetine produced an antidepressant-like activity. In TPS, metformin or fluoxetine alone had

similar efficacy compared to combined treatment with fluoxetine, however in TST, only the drugs association showed an antidepressant effect. We then admit that the combined treatment has a broader effect on the different endophenotypes associated with depressive behavior, since just under this combined treatment, both the despair-like and the anhedonic-like behavior were improved. In addition, for the first time, we showed that metformin potentiates the fluoxetine antidepressant effect in a PD model.

Metformin exhibits a neuroprotective effect in many neurological disorders and has been investigated in several models of PD. Recently, in an experimental PD model in *C. elegans* induced by 6-OHDA, metformin reduced dopaminergic neurodegeneration and aggregation of α -synuclein, showing a neuroprotective effect [35]. Ryu et al (2020) showed that in a murine model of PD also induced by 6-OHDA, treatment with metformin effectively improved motor symptoms but did not affect TH

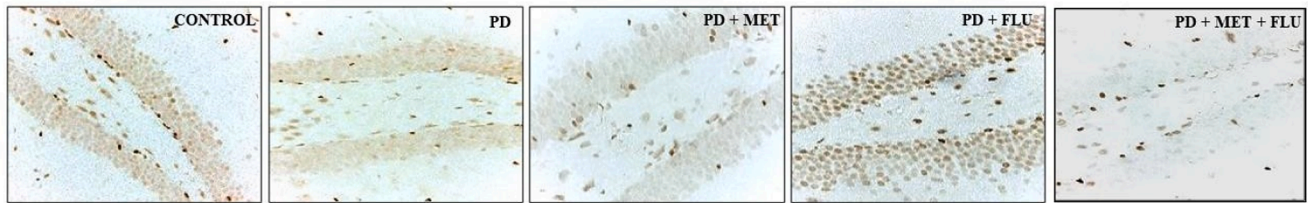
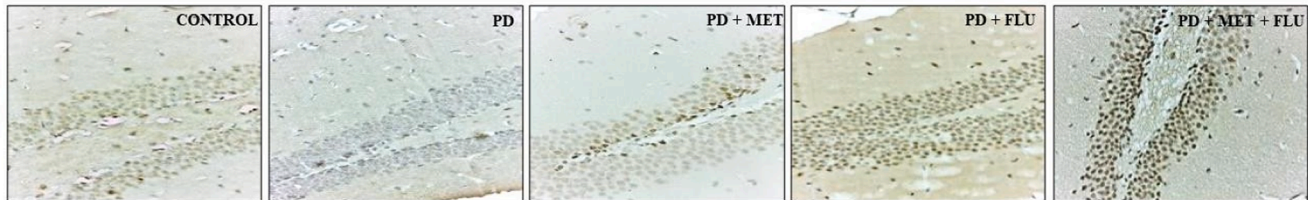
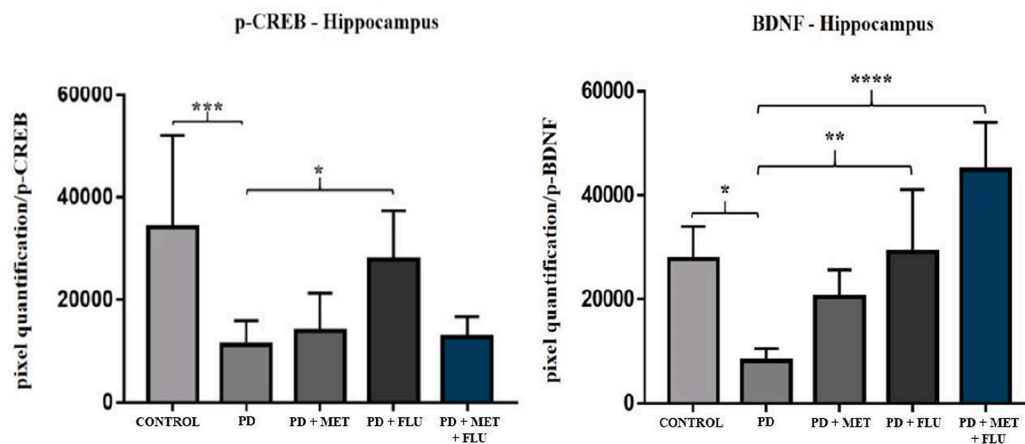
(a) p-CREB**(b) BDNF****(c)****(d)**

Fig. 10. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on the expression of BDNF and p-CREB hippocampal in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean $\pm$ SD). Positive immunoreactivity is indicated by dark brown color: **(a)** Representative images of the immunohistochemistry for p-CREB, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; **(b)** Representative images of immunohistochemistry for BDNF, analyzed in 400x magnification, scale bar = 50 μ m; **(c)** Graphical representation of the optical density of p-CREB obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. *: $p = 0.01$; ***: $p = 0.0004$; **(d)** Graphical representation of the optical density of BDNF obtained by statistical tests of variance ANOVA one way ($p < 0.05$), Tukey's post-hoc test. *: $p = 0.01$; **: $p = 0.006$; ****: $p < 0.0001$.

positive neurons [36]. On the contrary, the present study demonstrated that metformin prevented motor deficit of PD animals but was the most effective treatment for increasing TH positive cells in the substantia nigra, thus reducing neurodegeneration. In addition, fluoxetine also improved the motor deficit assessed by the rotarod test and reduced neurodegeneration when combined with metformin.

Microglia seems to contribute intensely to the neuronal degeneration in PD pathophysiological processes; however, the proinflammatory astrocyte profile can also be significantly harmful to dopaminergic neurons [37,38]. In studies with 6-OHDA PD model, astrocytic reactivity was observed in the striatum and SNpc in parallel with the increase in immunoreactivity for iNOS [39,40]. Silva et al. (2016) found increased microglial activation in SNpc, striatum, and hippocampus in a PD model induced by 6-OHDA in rats. In addition, Tansey and Goldberg (2010) concluded that reactive microglia could contribute to the death of dopaminergic neurons, leading to a reduction in striatal dopamine levels. The present study showed that rotenone significantly increased microglia and astrocytes in the hippocampus of PD animals [41,42]. Unlike 6-OHDA in the studies mentioned above, in which 6-OHDA was

administered locally in the central nervous system, rotenone was administered systemically by subcutaneous pathway in the present study. Together, these data indicate that the increase in astrocytes and microglia contribute to depressive behavior, as well as to motor deficits. In our study, metformin and fluoxetine, separately or in combination, significantly reduced microglial and astrocytic cells in the hippocampus of animals with PD, this effect was similar among treated groups. These results complement data from a previous study in which metformin improves cognitive deficits through the alternative activation of M2 phenotype microglia coupled with a decrease in inflammatory cytokines and reducing astrocyte hypertrophy [43]. Moreover, in a brain injury model, fluoxetine reduced the number of IBA-1 positive microglia/macrophages, neutrophil infiltration, and cell death, in addition to reducing the levels of proinflammatory cytokines [44].

The release of cytokines in the brain can directly induce changes in neurotransmitter and neuroendocrine systems, including monoaminergic systems and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [45]. Besides, neurodegeneration can be mediated by inflammatory and neurotoxic mediators such as IL-1 β , reactive oxygen species (ROS),

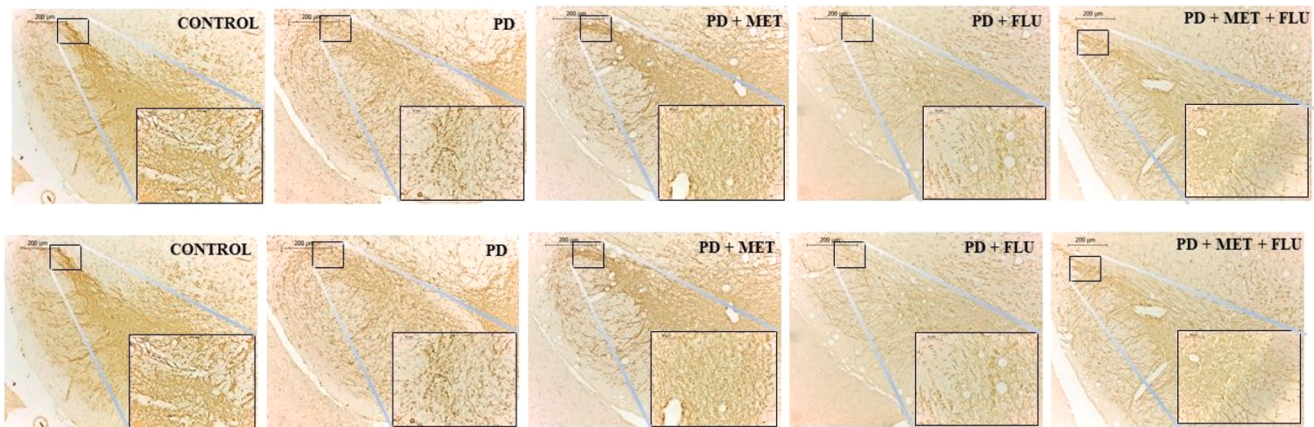
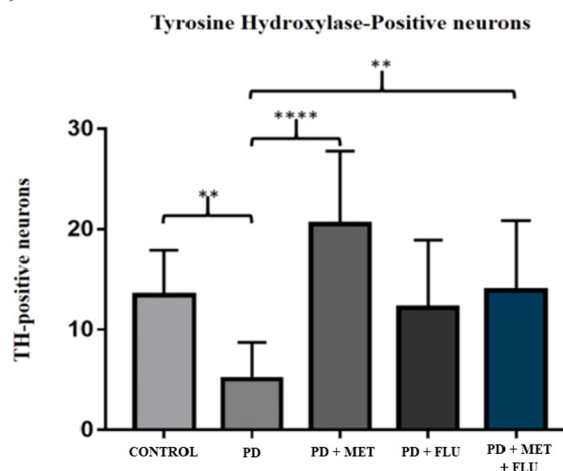
(a) TYROSINE HYDROXYLASE**(b)**

Fig. 11. Effect of metformin, fluoxetine and association of both drugs on the number of neurons positive for Tyrosine Hydroxylase (TH) in the SNpc of animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU; PD + MET + FLU (mean ± SD). Positive immunoreactivity is indicated by dark brown color: **(a)** Representative images of immunohistochemistry for TH in SNpc. Images obtained in 10x magnification, cells were counted in 40x magnification (small square) **(b)** Graphical representation obtained by one-way ANOVA statistical tests ($p < 0.05$), post-test Tukey's hoc. **: $p = 0.04$; ****: $p < 0.0001$.

activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and transcription factors such as NF- κ B. The release of these inflammatory mediators by activated microglia and astrocytes viciously lead neuroinflammation and neurodegeneration [46]. In this study, we found increased levels of p-NF- κ B, IL-1 β , and iNOS in the hippocampus and the prefrontal cortex, indicating neuroinflammation and oxidative stress, which may be related to the depressive-like behavior observed in these animals. We also found that only when combined with fluoxetine, metformin attenuates the increase in p-NF- κ B in the hippocampus, whereas, in the prefrontal cortex, metformin and fluoxetine alone or in combination can attenuate p-NF- κ B. However, metformin showed a more evident effect than fluoxetine alone. Metformin alone or combined with fluoxetine also reduced IL-1 β levels in the hippocampus and prefrontal cortex, whereas fluoxetine significantly reduced IL-1 β only in the prefrontal cortex. Regarding the increased iNOS levels observed in the PD group, metformin and fluoxetine alone or combined counteract this effect in the hippocampus. In the prefrontal cortex, metformin seems to potentiate the fluoxetine reducing the effect of iNOS levels.

The data show that an increase in glial cells with a pro-inflammatory profile plays an important role in the degenerative process of experimental PD in regions related to emotional behavior such as the hippocampus and prefrontal cortex. We also found that metformin, alone or in association with fluoxetine, has an anti-inflammatory effect, which can

be enhanced by the fluoxetine.

Neurotrophic factors are closely linked to neurogenesis and neuroplasticity in adults, which may be impaired during some neuropsychiatric and/or neurodegenerative diseases [47]. In our experimental model, rotenone significantly reduced the proliferation of neuronal precursors in the hippocampus of sick animals by decreasing the KI67 protein and reducing the population of mature neurons (NeuN positive cells). In contrast, treatment with metformin and fluoxetine separately or in association induced an increase in protein KI67 expression, while only the combination of fluoxetine and metformin promoted a significant increase in mature neurons. Our results show that metformin and fluoxetine, separately or in combination, similarly promoted neurogenesis, but only when associated with fluoxetine was there an increase in hippocampal neuronal survival compared to the PD group. These results complement data shown in the literature about fluoxetine regulating the birth of new neurons (neurogenesis) and the survival of these cells [48,49]. Rotenone increased neuronal apoptosis in the hippocampus, while fluoxetine associated with metformin reduced neuronal death by apoptosis evidenced by lower immunoreactivity of caspase-3 positive cells. To reinforce hippocampal degeneration in the present study, we also show an increase in PARP-1 levels in rotenone-induced animals, whereas fluoxetine reversed this effect. Detection of caspase-3 in tissues is an essential method for assessing apoptosis induced by a wide variety

of apoptotic signs. In turn, PARP-1 is an enzyme involved in cell repair in oxidative stress situations and indicates cell death [50,51]. Other PD models have also reproduced neuronal death in the hippocampus [52,53]. Fluoxetine also reduced hippocampal neuronal death assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) technique in dexamethasone-induced depression model [54]. Our results reinforce the inhibitory effect of fluoxetine on the neuronal death in the hippocampus [55].

The fluoxetine antidepressant effect is also due to the increase in factors related to neuroplasticity, such as CREB and BDNF. Bilateral microinjection of CREB into the hippocampus of rats with induced depression produced an antidepressant effect and suggested that CREB may serve as a potential molecular target for new therapeutic agents [56]. Metformin also induces an increase in neurotrophic factors, according to some studies. Recently, Fang et al. (2020) showed that metformin significantly increased BDNF expression, increasing histone acetylation along with the BDNF promoter, which was attributed to the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and CREB. In this same study, metformin improved the depressive behavior of rats when administered alone and potentiated the effect of fluoxetine when administered in combination [57]. We showed in this study that the PD model induced by rotenone caused a reduction in p-CREB and BDNF, indicating a reduction in hippocampal neuroplasticity. However, fluoxetine significantly increases the p-CREB, and potentiates the effect of metformin on BDNF expression when administered in combination. Therefore, our results agree with the literature regarding the neuroplasticity-inducing effects of metformin and fluoxetine. In addition, we also show the potentiating effect of metformin when combined with fluoxetine on the increase in BDNF face to the experimental PD model.

It is already well-known that fluoxetine, an SSRI antidepressant, has broad neurobiological functions and neuroprotective effects in the central nervous system, but its role in PD is little known. However, in a PD model induced by rotenone, it has been demonstrated that pre-treatment with fluoxetine significantly improved symptomatic catalepsy and increased locomotor activity. In addition, fluoxetine inhibited striatal dopaminergic neurodegeneration through caspase-3-mediated neuronal apoptosis [58]. Similarly, our results showed that fluoxetine reduced hippocampal PARP-1 and caspase-3. However, although fluoxetine improved locomotor activity, there was no significant effect of this drug concerning the dopaminergic neuronal loss, indicating that other mechanisms could be involved such as improvement dopamine release and dopamine transporter (DAT) expression.

Finally, it is noteworthy that the pathophysiology mechanisms underlying both Parkinson's disease and depression are result from cellular and molecular processes that occur before the onset of symptoms. The present study demonstrated that metformin associated with fluoxetine prevented the motor and depressive symptoms of PD by modulating the nigral and extra-nigral signaling pathways.

5. Conclusion

The present study concludes that metformin, alone or combined with fluoxetine, exerts antidepressant-like effects, however, the combined treatment has a broader effect on the depressive endophenotypes associated with experimental PD. Furthermore, at the hippocampal molecular level, metformin by itself has anti-inflammatory and neurogenesis-inducing effects, which are related to neuroplasticity and neuroprotective pathways. The results obtained so far are promising, therefore the beneficial effects of isolated and combined treatments should be explored at different times of disease progression. Finally, the results indicate a potential pharmacological strategy that may be applied to depressive and motor symptoms of PD and tested polypharmacologically.

Role of funding source

The funding sources had no involvement in the study design; in the

collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; in the preparation of the article; nor in the decision to submit the article for publication.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the Research Excellence Program - Instituto Aggeu Magalhães (IAM-PROEP#400208/2019-9), the Knowledge Generation Program of the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; #VPPCB-007-FIO-18-2-17), the Institute of Science and Technology of Neuroimmunomodulation (INCT-NIM; # 465489/2014-1) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; #301777/2012-8). This study was partially funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-Brazil (CAPES) Financial Code 001. All authors contributed to the preparation of the manuscript and approved its final version. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] P. Surathi, K. Jhunjhunwala, R. Yadav, P. Pal, Research in Parkinson's disease in India: A review, *Ann. Indian Acad. Neurol.* 19 (2016) 9–20, <https://doi.org/10.4103/0972-2327.167713>.
- [2] D. Aarsland, K. Laake, J. Larsen, C. Janvin, Donepezil for cognitive impairment in Parkinson's disease: a randomised controlled study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72 (2002) 708–712, <https://doi.org/10.1136/JNPP.72.6.708>.
- [3] S. Bhattacharjee, N. Vadieli, L. Goldstone, Z. Alrabiah, S.J. Sherman, Patterns and predictors of depression treatment among older adults with Parkinson's disease and depression in ambulatory care settings in the United States, *Parkinsons. Dis.* 2018 (2018) 1–6, <https://doi.org/10.1155/2018/3402983>.
- [4] A.D. Van Laar, J. Samay, Non-motor symptoms of Parkinson disease: Update on the diagnosis and treatment, *Neurologist* 10 (2004) 185–194.
- [5] J. Detka, A. Kurek, A. Basta-Kaim, M. Kubera, W. Lason, B. Budziszewska, Neuroendocrine link between stress, depression and diabetes, *Pharmacol. Rep.* 65 (6) (2013) 1591–1600, [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71520-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71520-2).
- [6] N. Gassen, T. Rein, Is there a role of autophagy in depression and antidepressant action? *Front. Psychiatry* 10 (2019) <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00337>.
- [7] Y. Cho, H.J. Son, E.-M. Kim, J.H. Choi, S.T. Kim, I.J. Ji, D.H. Choi, T.H. Joh, Y. S. Kim, O. Hwang, Doxycycline is neuroprotective against nigral dopaminergic degeneration by a dual mechanism involving MMP-3, *Neurotox. Res.* 16 (4) (2009) 361–371, <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9078-1>.
- [8] S. Lorenzl, D.S. Albers, S. Narr, J. Chirichigno, M.F. Beal, Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 178 (1) (2002) 13–20, <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8019>.
- [9] R.K. McNamara, F.E. Lotrich, Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: a new therapeutic target? *Expert Rev. Neurother.* 12 (9) (2012) 1143–1161, <https://doi.org/10.1586/ern.12.98>.
- [10] A.H. Miller, V. Maletic, C.L. Raison, Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression, *Biol. Psychiatry* 65 (9) (2009) 732–741, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.029>.
- [11] J. Rosenblatt, D. Cha, R. Mansur, R. McIntyre, Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 53 (2014) 23–34, <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2014.01.013>.
- [12] X.-M. Wang, Y.-G. Zhang, A.-L. Li, Z.-H. Long, D. Wang, X.-X. Li, J.-H. Xia, S.-Y. Luo, Y.-H. Shan, S. Yan-Hua, Relationship between levels of inflammatory cytokines in the peripheral blood and the severity of depression and anxiety in patients with Parkinson's disease, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20 (2016) 3853–3856.
- [13] J. Yan, A. Liu, H. Fan, L. Qiao, J. Wu, M. Shen, X. Lai, J. Huang, Simvastatin improves behavioral disorders and hippocampal inflammatory reaction by NMDA-mediated anti-inflammatory function in MPTP-treated mice, *Cell. Mol. Neurobiol.* 40 (7) (2020) 1155–1164, <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00804-7>.
- [14] S. Ahmed, Z. Mahmood, A. Javed, S.N. Hashmi, I. Zerr, S. Zafar, S. Zahid, Effect of metformin on adult hippocampal neurogenesis: comparison with donepezil and links to cognition, *J. Mol. Neurosci.* 62 (1) (2017) 88–98, <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0915-z>.
- [15] W. Oliveira, A. Nunes, M. França, L. Santos, D. Lós, S. Rocha, K. Barbosa, G. Rodrigues, C. Peixoto, Effects of metformin on inflammation and short-term

- memory in streptozotocin-induced diabetic mice, *Brain Res.* 1644 (2016) 149–160, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.05.013>.
- [16] C. Peixoto, W. Oliveira, S. Araújo, A. Nunes, AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration, *Exp. Neurol.* 298 (2017) 31–41, <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.08.013>.
- [17] R.D. Airan, L.A. Meltzer, M. Roy, Y. Gong, H. Chen, K. Deisseroth, High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression, *Science* 317 (5839) (2007) 819–823, <https://doi.org/10.1126/science.1144400>.
- [18] L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, René Hen, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science* 301 (5634) (2003) 805–809, <https://doi.org/10.1126/science.1083328>.
- [19] A. Surget, M. Saxe, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, S. Chalon, G. Griebel, R. Hen, C. Belzung, Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal, *Biol. Psychiatry*. 64 (4) (2008) 293–301, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.022>.
- [20] J.-W. Wang, D.J. David, J.E. Monckton, F. Battaglia, R. Hen, Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells, *J. Neurosci.* 28 (6) (2008) 1374–1384, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008>.
- [21] S.A. Khedr, A.A. Elmegly, O.A. El-Kharashi, H.A. Abd-Alkhalik, M.L. Louka, H. A. Sallam, S. Aboul-Fotouh, Metformin potentiates cognitive and antidepressant effects of fluoxetine in rats exposed to chronic restraint stress and high fat diet: potential involvement of hippocampal c-Jun repression, *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 391 (4) (2018) 407–422, <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1466-8>.
- [22] S. Poggini, M.T. Golia, S. Alboni, G. Milior, L.P. Sciarria, A. Viglione, G. Matte Bon, N. Brunello, S. Puglisi-Allegra, C. Limatola, L. Maggi, I. Branchi, Combined fluoxetine and metformin treatment potentiates antidepressant efficacy increasing IGF2 expression in the dorsal hippocampus, *Neural Plast.* 2019 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1155/2019/4651031>.
- [23] P.G. Frisina, V. Haroutunian, L.S. Libow, The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease, *Park. Relat. Disord.* 15 (2) (2009) 144–148, <https://doi.org/10.1016/j.parkrel.2008.04.038>.
- [24] S. Reagan-Shaw, M. Nihal, N. Ahmad, Dose translation from animal to human studies revisited, *FASEB J.* 22 (3) (2008) 659–661, <https://doi.org/10.1096/fjb.2.v22.310.1096/fjb.07-9574LSF>.
- [25] W.H. Oliveira, C.F. Braga, D.B. Lós, S.M.R. Araújo, M.R. França, E. Duarte-Silva, G. B. Rodrigues, S.W.S. Rocha, C.A. Peixoto, Metformin prevents p-tau and amyloid plaque deposition and memory impairment in diabetic mice, *Exp. Brain Res.* 239 (9) (2021) 2821–2839, <https://doi.org/10.1007/s00221-021-06176-8>.
- [26] L.M. Gorton, M.G. Vuckovic, N. Vertelkina, G.M. Petzinger, M.W. Jakowec, R. I. Wood, Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse, *Behav Brain Res.* 213 (2) (2010) 253–262, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.009>.
- [27] A. Can, D. Dao, C. Terrillon, S. Piantadosi, S. Bhat, T. Gould, The tail suspension test, *J. Vis. Exp.* (2012), <https://doi.org/10.3791/3769>.
- [28] R. Deacon, Measuring motor coordination in mice, *J. Vis. Exp.* (2013), <https://doi.org/10.3791/2609>.
- [29] N. Schintu, X. Zhang, P. Svenningsson, Studies of depression-related states in animal models of Parkinsonism, *J. Parkinsons. Dis.* 2 (2012) 87–106, <https://doi.org/10.3233/JPD-2012-12076>.
- [30] S.H. Wang, Anhedonia and activity de fi cits in rats : impact of post-stroke depression, *J. Psychopharmacol.* 23 (2009) 295–304, <https://doi.org/10.1177/0269881108089814>.
- [31] S.H. Yoon, B.-H. Kim, S.-K. Ye, M.-H. Kim, Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice, Korean, *J. Physiol Pharmacol.* 18 (2014) 263–268, <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.3.263>.
- [32] J. Bonato, T. Bassani, H. Milani, M. Vital, R. de Oliveira, Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats, *Exp. Neurol.* 300 (2018) 188–200, <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.11.009>.
- [33] D. Vecchia, L. Kanazawa, E. Wendler, P. Hocayen, M. Vital, R. Takahashi, C. Da Cunha, E. Miyoshi, R. Andreolini, Ketamine reversed short-term memory impairment and depressive-like behavior in animal model of Parkinson's disease, *Brain Res. Bull.* 168 (2021) 63–73, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.12.011>.
- [34] N. Shivavedi, M. Kumar, G. Tej, P. Nayak, Metformin and ascorbic acid combination therapy ameliorates type 2 diabetes mellitus and comorbid depression in rats, *Brain Res.* 1674 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2017.08.019>.
- [35] N. Saewanee, T. Praputpittaya, N. Malaiwong, P. Chalorak, K. Meemon, Neuroprotective effect of metformin on dopaminergic neurodegeneration and α -synuclein aggregation in C. elegans model of Parkinson's disease, *Neurosci. Res.* 162 (2021) 13–21, <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2019.12.017>.
- [36] Y.-K. Ryu, J. Go, H.-Y. Park, Y.-K. Choi, Y.J. Seo, J.H. Choi, M. Rhee, T.G. Lee, C.-H. Lee, K.-S. Kim, Metformin regulates astrocyte reactivity in Parkinson's disease and normal aging, *Neuropharmacology* 175 (2020) 108173, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108173>.
- [37] H. Hu, Reward and aversion, *Annu. Rev. Neurosci.* 39 (1) (2016) 297–324, <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-014106>.
- [38] R. Pal, P.C. Tiwari, R. Nath, K.K. Pant, Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease, *Neurol. Res.* 38 (12) (2016) 1111–1122, <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1249997>.
- [39] K. Kuter, L. Olech, U. Glowacka, Prolonged dysfunction of astrocytes and activation of microglia accelerate degeneration of dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and block compensation of early motor dysfunction induced by 6-OHDA, *Mol. Neurobiol.* 55 (4) (2018) 3049–3066, <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0529-z>.
- [40] M.A. Mori, A.M. Delattre, B. Carabelli, C. Pudell, M. Bortolanza, P.V. Staziaki, J. V. Visentainer, P.F. Montanher, E.A. Del Bel, A.C. Ferraz, Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase, *Nutr. Neurosci.* 21 (5) (2018) 341–351, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1290928>.
- [41] T. Silva, A. Poli, D. Hara, R. Takahashi, Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats, *Neurosci. Lett.* 622 (2016) 83–87, <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2016.04.049>.
- [42] M.G. Tansey, M.S. Goldberg, Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention, *Neurobiol. Dis.* 37 (3) (2010) 510–518, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.004>.
- [43] M. Kodali, S. Attaluri, L.N. Madhu, B. Shuai, R. Upadhy, J.J. Gonzalez, X. Rao, A. K. Shetty, Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus, *Aging Cell* 20 (2) (2021), <https://doi.org/10.1111/accel.v20.210.1111/accel.13277>.
- [44] F.-y. Liu, J. Cai, C. Wang, W.u. Ruan, G.-P. Guan, H.-Z. Pan, J.-r. Li, C. Qian, J.-S. Chen, L. Wang, G. Chen, Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway, *J. Neuroinflammation*. 15 (1) (2018), <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1388-x>.
- [45] I. Goshen, R. Yirmiya, The role of pro-infl ammatory cytokines in memory processes and neural plasticity, *Psychoneuroimmunology* (2007) 337–377, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-088576-3.50021-6>.
- [46] D. Kempuraj, R. Thangavel, P. Natteru, G. Selvakumar, D. Saeed, H. Zahoor, S. Zaheer, S. Iyer, A. Zaheer, Neuroinflammation Induces Neurodegeneration, *J. Neurol. Neurosurg. Spine*. 1 (2016) (accessed August 19, 2021), <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28127589/>.
- [47] E. Horgusluoglu, K. Nudelman, K. Nho, A. Saykin, Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective, *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 174 (2017) 93–112, <https://doi.org/10.1002/AJMG.B.32429>.
- [48] S. Hitoshi, N. Maruta, M. Higashi, A. Kumar, N. Kato, K. Ikenaka, Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress, *J. Neurosci. Res.* 85 (16) (2007) 3574–3585, [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1097-454710.1002/jnr.v85.1610.1002/jnr.21455](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1097-454710.1002/jnr.v85.1610.1002/jnr.21455).
- [49] L. Micheli, M. Ceccarelli, G. D'Andrea, F. Tirone, Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise, *Brain Res. Bull.* 143 (2018) 181–193, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2018.09.002>.
- [50] G. Choudhary, S. Al-Harbi, A. Almasan, Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis, *Methods Mol. Biol.* 1219 (2015), https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_1.
- [51] M. Keuss, R. Hjerpe, O. Hsia, R. Gourlay, R. Burchmore, M. Trost, T. Kurz, Unanchored tri-NEDD8 inhibits PARP-1 to protect from oxidative stress-induced cell death, *EMBO J.* 38 (2019), <https://doi.org/10.1525/EMBJ.2018100024>.
- [52] M. Kim, K. Cho, M. Shin, J. Lee, H. Cho, C. Kim, D. Shin, H. Yang, Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease, *Int. J. Mol. Med.* 33 (2014) 870–878, <https://doi.org/10.3892/IJMM.2014.1656>.
- [53] T. Li, L.i. Tu, R. Gu, X.-L. Yang, X.-J. Liu, G.-P. Zhang, Q. Wang, Y.-P. Ren, B.-J. Wang, J.-Y. Tian, Neuroprotection of GLP-1/GIP receptor agonist via inhibition of mitochondrial stress by AKT/JNK pathway in a Parkinson's disease model, *Life Sci.* 256 (2020) 117824, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117824>.
- [54] L.E. Haynes, D. Barber, I.J. Mitchell, Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum, *Brain Res.* 1026 (2) (2004) 157–167, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.117>.
- [55] J. Lee, H. Lee, S. Kang, H. Choi, J. Ryu, T. Yune, Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption, *Neuropharmacology* 79 (2014) 161–171, <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2013.11.011>.
- [56] A.-H. Chen, Y. Shirayama, K.-H. Shin, R.L. Neve, R.S. Duman, Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect, *Biol. Psychiatry*. 49 (9) (2001) 753–762, [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01114-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01114-8).
- [57] W. Fang, J. Zhang, L. Hong, W. Huang, X. Dai, Q. Ye, X. Chen, Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation, *J. Affect. Disord.* 260 (2020) 302–313, <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2019.09.013>.
- [58] T. Peng, X. Liu, J. Wang, Y. Liu, Z. Fu, X. Ma, J. Li, G. Sun, Y. Ji, J. Lu, W. Wan, H. Lu, Fluoxetine-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effects of Parkinson's disease, *Aging (Albany. NY)*. 10 (2018) 4188–4196, <https://doi.org/10.18632/AGING.101716>.



Metformin improves depressive-like behavior in experimental Parkinson's disease by inducing autophagy in the substantia nigra and hippocampus

Ingrid Prata Mendonça^{1,2} · Igor Henrique Rodrigues de Paiva^{1,2} · Eduardo Pereira Duarte-Silva^{1,3} · Michel Gomes de Melo^{1,2} · Rodrigo S. da Silva^{1,2} · Maria Isabelly Xavier do Nascimento¹ · Christina Alves Peixoto^{1,4} 

Received: 30 June 2022 / Accepted: 16 July 2022 / Published online: 6 August 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Parkinson's disease (PD) remains a disease of little known etiology. In addition to the motor symptoms, depression is present in about 40% of patients, contributing to the loss of quality of life. Recently, the involvement of the autophagy mechanism in the pathogenesis of depression has been studied, in addition to its involvement in PD as well. In this study, we tested the effects of metformin, an antidiabetic drug also with antidepressant effects, on depressive-like behavior in a rotenone-induced PD model and on the autophagy process. Mice 8-week-old male C57BL/6 were induced with rotenone for 20 consecutive days (2.5 mg/kg/day) and treated with metformin (200 mg/kg/day) from the 5th day of induction. All the animals were submitted to rotarod, sucrose preference and tail suspension tests. After euthanasia, the substantia nigra and hippocampus were removed for analysis by western blotting or fixed and analyzed by immunofluorescence. The results show that there was an impairment of autophagy in animals induced by rotenone both in nigral and extranigral regions as well as a depressive-like behavior. Metformin was able to inhibit depressive-like behavior and increase signaling pathway proteins, transcription factors and autophagosome-forming proteins, thus inducing autophagy in both the hippocampus and the substantia nigra. In conclusion, we show that metformin has an antidepressant effect in a rotenone-induced PD model, which may result, at least in part, from the induction of the autophagy process.

Keywords Parkinson's disease · Rotenone · Depression · Autophagy · Metformin

Introduction

Parkinson's disease was first reported in 1817 by the physician James Parkinson, who initially called it “agitating palsy”, with the main symptoms being classic motor deficits such as bradykinesia, resting tremor and muscle rigidity (Goedert and Compston 2018). The PD etiology is considered multifactorial, being influenced by genetic factors such as mutations in genes related to mitochondrial function and proteolysis, and environmental factors such as exposure to neurotoxic agents and metabolic disorders (Kalia and Lang 2015; Kim and Alcalay 2017). The main neuropathological factor underlying motor deficits is the progressive death of dopamine-producing neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Other mechanisms such as oxidative stress, neuroinflammation and formation of insoluble protein aggregates are related to triggering neurodegeneration (Dickson 2018; Rocha et al. 2018). The presence of protein clusters, mainly α -synuclein, forming the so-called “Lewy

✉ Ingrid Prata Mendonça
ingridpratamendoca@gmail.com

✉ Christina Alves Peixoto
peixoto.christina@gmail.com

¹ Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

² Postgraduate Program in Biological Sciences (PPGCB), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

³ Postgraduate Program in Biosciences and Biotechnology for Health (PPGBBS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-PE)/Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil

⁴ National Institute of Science and Technology On Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

bodies” is a pathognomonic characteristic of PD and is also reported in the early stages of the disease in extranigral regions, thus being an extremely important finding in the pathological progression of PD (Atik et al. 2016).

Depression represents a comorbidity in PD and is present in about 40% of patients (Mendonça et al. 2020). Over the years, some hypotheses have been postulated about the cause of depression. Based on brain neurochemistry, the monoaminergic hypothesis postulates that depletion of monoaminergic neurotransmitters and their consequent impairment of synaptic transmission would cause depressive symptoms. Several antidepressant drugs were developed based on this hypothesis and are still used nowadays (Ferrari and Villa 2017). Another hypothesis suggests a dysfunction of glutamatergic transmission in which there is hyperfunction of NMDA receptors in subcortical regions (hippocampus, locus coeruleus and amygdala) associated with hypofunction of NMDA receptors in cortical regions (prefrontal, perirhinal and temporal cortex) (Hillhouse and Porter 2015). There is also the corticosteroid hypothesis, in which glucocorticoid receptor (GR) signaling is impaired in some brain regions, resulting in increased production and secretion of corticotropin-releasing hormone (CRH) and consequently altering corticotropin secretion (ACTH) and cortisol (Holsboer 2000). Neuroinflammation has also been associated with GR desensitization and depressive symptoms, since chronic inflammation and stress constantly stimulate the HPA axis and production of glucocorticoids. The excess glucocorticoids would result in a desensitization of the hippocampal GR, which is necessary for the hypothalamic control of the HPA axis (Kim et al. 2016). Furthermore, studies have reported that elevated glucocorticoid levels are associated with hippocampal inflammatory processes (Dinkel et al. 2003; Sorrells et al. 2014).

Recently, another hypothesis of an intracellular mechanism that participates not only in the neuropathology of depression but also in PD has emerged considered the “autophagic hypothesis.” Studies suggest that the formation of lewy bodies in Parkinson’s disease is due to mutations in the gene encoding alpha-synuclein and also to defects in the autophagy mechanism (Lu et al. 2020). The hypothesis regarding involvement of autophagy in depression has been explored more recently by Ali et al. (2020), who demonstrated that LPS-induced depressive-like behavior in mice induces autophagy damage by a deregulated expression of the ATG and FOXO3a genes. In addition, there was a significant increase in cytokine levels (TNF α , IL-1 β , IL-6), NF-kB phosphorylation, activation of glial cells (astrocytes and microglia), oxidative stress related genes (Nrf2, SOD2 and HO-1) and free radicals (ROS/TBARs) (Ali et al. 2020).

Several pharmacological and non-pharmacological agents have been studied as inducers of autophagy in different cell types (Zhang et al. 2015; Yang et al. 2017; Chang et al.

2018). Metformin, a common drug used in the treatment of type II diabetes mellitus, has been associated with several effects beyond glucose metabolism, such as antioxidant (Śmieszek et al. 2017), anti-inflammatory (Zhang et al. 2020a), antidepressant effects (Chen et al. 2020) and also inducer of autophagy (Lu et al. 2021). In the present study, we analyzed the effects of metformin on depressive-like behavior and motor impairment in a rotenone-induced PD model, as well as on autophagic signaling pathways in the substantia nigra and hippocampus, two regions involved in the pathology of PD.

Methodology

Animals

Male 8-weeks-old C57BL/6 mice were obtained from the Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fundação Oswaldo Cruz–PE, Brazil). The animals were placed in microisolators, kept at a temperature of 18–22 °C and a light/dark photoperiod of 12 h, with access to autoclaved water and food ad libitum. All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEUA 140/2019) and carried out in accordance with the standards and guidelines established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Experimental design

Forty animals were subdivided into 4 experimental groups ($n = 10/\text{group}$) as shown in Fig. 6: (1) CONTROL—animals received vehicle solution subcutaneously and water orally; (2) PD—animals received rotenone (2.5 mg/Kg/day) subcutaneously and water orally; (3) PD + metformin—animals received rotenone (2.5 mg/Kg/day) subcutaneously and metformin orally; (4) PD + fluoxetine—animals received rotenone (2.5 mg/Kg/day) subcutaneously and fluoxetine orally. The rotenone was administered for 20 consecutive days. Fluoxetine was used here as a pattern of antidepressant action. The drugs metformin and fluoxetine were administered for 15 consecutive days at a dose of 200 mg/Kg/day and 10 mg/Kg/day, respectively, starting at the 5th day of induction with rotenone (as described previously, Mendonça et al. 2022). All groups were submitted to sucrose preference, tail suspension and rotarod tests.

Sucrose preference test

The sucrose preference test (SPT) was performed on the 18th day. The mice were given access for 24 h to two bottles containing either water alone or 2% sucrose in water

positioned on opposite sides of the cage. After this habituation period, the animals were separated into individual cages and then replenished for 24 h more with two bottles previously weighed; during this period the bottles were changed on one side once to avoid the tendency of the animal for one of the bottles. After 24 h, the bottles were removed and weighed again to determine relative water/sucrose intake and sucrose preference, sucrose consumption $\times$ 100/total liquid intake (Gorton et al. 2010).

Tail suspension test

The tail suspension test (TST) consists of evaluating “despair-like behavior” which represents an endophenotype of the depression induced in animals. In this test, the animals were suspended by the tail attached to adhesive tape, in a position that cannot escape or holding close surfaces; the lack of behavior related to escape was considered immobility (Can et al. 2012). We adapted the protocol by Can and collaborators (2012), in which the animals were individually suspended by their tails and accustomed to that position for the first minute; then, for the next five minutes, the immobility time was registered by an observer at 1 m of distance. After total period of 6 min, the animals were returned to their respective cages.

Rotarod

The rotary bar test or rotarod represents one of the main and oldest approaches to characterize motor dysfunctions in animal models, and it is a test that assesses the motor coordination and balance of the animal by its ability to remain on the cylindrical rod, which moves rotationally at a constant or accelerated speed for some time (Deacon 2013). The apparatus used consists of four dividers for four animals and the cylindrical bar. The animals were initially adapted to the rotating bar for 5 min two days before the test (on day 18th) at a constant speed of 5 rpm. On the 20th day, the animals were accustomed in the test room for 30 min, and then, they were placed on the rotating rod, under a speed of 5 to 37 rpm. The animals remained on the rod for a maximum period of 300 s; during this period, latency time to fall was used as an indicator of motor deficit.

Immunofluorescence

To assess the hippocampal autophagy process, sections paraffin-embedded were treated with a blocking buffer (1 $\times$ TBS-T + 5% bovine serum albumin) for 1 h and then incubated overnight with the primary anti-p-mTOR (Abcam 15,580 at a 1:300 dilution). Substantia nigra sections were incubated with anti-tyrosine hydroxylase (AB152-Merk, at 1:500 dilution) e anti- α -synuclein antibody (Santa Cruz

53,955, at 1:500 dilution). The sections were then incubated with a secondary fluorescent Alexa fluor 488 anti-rabbit (Vector Laboratories at a 1: 100 dilution) antibody to p-mTOR and tyrosine hydroxylase detection and Alexa fluor 488 anti-mouse (Vector Laboratories at a 1: 100 dilution) to α -synuclein detection, for 2 h. Subsequently, the sections were incubated with 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen at a dilution of 1:200) for nuclear labeling for 5 min, in the dark. The images were captured by the fluorescence microscope (Zeiss Micro Imaging GmbH) equipped with a camera (Zeiss Axio Cam MRM). Three slides from 3 different animals were used to obtain 8 images per group ($n=8$), and the optical density was quantified using the program GIMP version 2.6.11 (GNU Image Manipulation Program software, CNET Networks, Inc., Australia).

Western blotting

The hippocampus and substantia nigra were homogenized in a tube containing extraction cocktail (10 mM/l EDTA, 2 mM/l phenylmethane sulfonyl fluoride, 100 mM/l sodium fluoride, sodium 10 mM/l, 10 mM/l sodium orthovanadate, 10 μ m aprotinin and 100 mM/l Tris-aminomethane-pH 7.4) using a manual macerator for tissue breakdown and protein release. Thereafter, the homogenate was centrifuged and the supernatant extracted, obtaining a pool of samples of each group. In an electrophoresis gel, 20 μ g of total protein per group was applied. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (BioRad 162–0115), blocked for 1 h with 5% bovine serum albumin (BSA, fraction V) (Miles, Naperville, IL, USA) diluted in TBS-T and incubated overnight at 4 °C with primary antibody anti-p-JNK (sc6254 Santa cruz at 1:1000 dilution), anti-p-c-jun (ab30620 abcam at 1:1000 dilution), anti-FOXO3A (MA514932 invitrogen at 1:250 dilution), anti-ATG-5 (ab228668 abcam at 1:1000 dilution) and anti-LC3 (AHP2167 Bio Rad at 1:1000 dilution). The technique was performed in duplicate for confirmation of results, and β -actin was used as a control by ratio of protein/ β -actin in each group. The bands were detected by a chemiluminescent reagent (Immobilon Forte Western HRP substrate WBLUF0500) and visualized by iBright CL1500 Imaging Systems (ThermoFisher Scientific). ImageJ software version 1.50i was used to quantify the pixels density of bands. Three independent experiments were performed for each protein analyzed.

Statistical analysis

The GraphPad Prism (version 7.0) was used for the statistical analyses. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Parametric data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post

hoc comparisons. Probability values lower than 0.05 were considered significant.

Results

Metformin prevents depressive-like behavior and motor deficits in rotenone-induced animals

The rotenone-induced animals showed less preference for sucrose evaluated by the SPT compared to the control (CONTROL Vs PD p value < 0.0001). However, both treatments, metformin (PD Vs PD + MET p value < 0.0001) and fluoxetine (PD Vs PD + FLU p value < 0.0001) similarly improved the sucrose preference, demonstrating antidepressant action (Fig. 1a). The same pattern was observed in the TST, in which the immobility time is proportional to depressive-like behavior. In TST, rotenone-induced animals had a longer immobility time compared to the control (CONTROL Vs PD p value $= 0.0043$), whereas metformin (PD Vs PD + MET p value $= 0.0077$) was more effective in decreasing this parameter than fluoxetine (PD Vs PD + FLU p value $= 0.045$), thus suggesting a greater antidepressant effect than fluoxetine, as shown in Fig. 1b. ROTENONE group showed a 48% decrease in latency time

to fall compared to the control group in the rotarod test on the 20th day (CONTROL Vs PD p value < 0.0001), whereas metformin (PD Vs PD + MET p value < 0.0001) attenuated the motor deficit similar to fluoxetine (PD Vs PD + FLU p value < 0.0001), as shown in Fig. 1c.

Metformin inhibited both dopaminergic neurodegeneration and the increase in α -synuclein in neurons of the substantia nigra caused by the rotenone

Through double-marking immunofluorescence (TH/ α -synuclein), it was observed that rotenone caused a degeneration of dopaminergic neurons, evidenced by decreased positive neurons for the enzyme tyrosine hydroxylase in SNpc (CONTROL vs PD P value $= 0.0312$). In addition, rotenone also induced a significantly α -synuclein increase in the SNpc of the PD group (CONTROL vs PD p value $= 0.0114$). However, metformin was able to prevent loss of dopaminergic neurons (PD vs PD + MET p value < 0.0001) and also inhibit the increase in α -synuclein (PD vs PD + MET p value < 0.0001). Fluoxetine, in turn, was also able to prevent the death of dopaminergic neurons (PD vs PD + FLU p value $= 0.0348$) as well as inhibited the

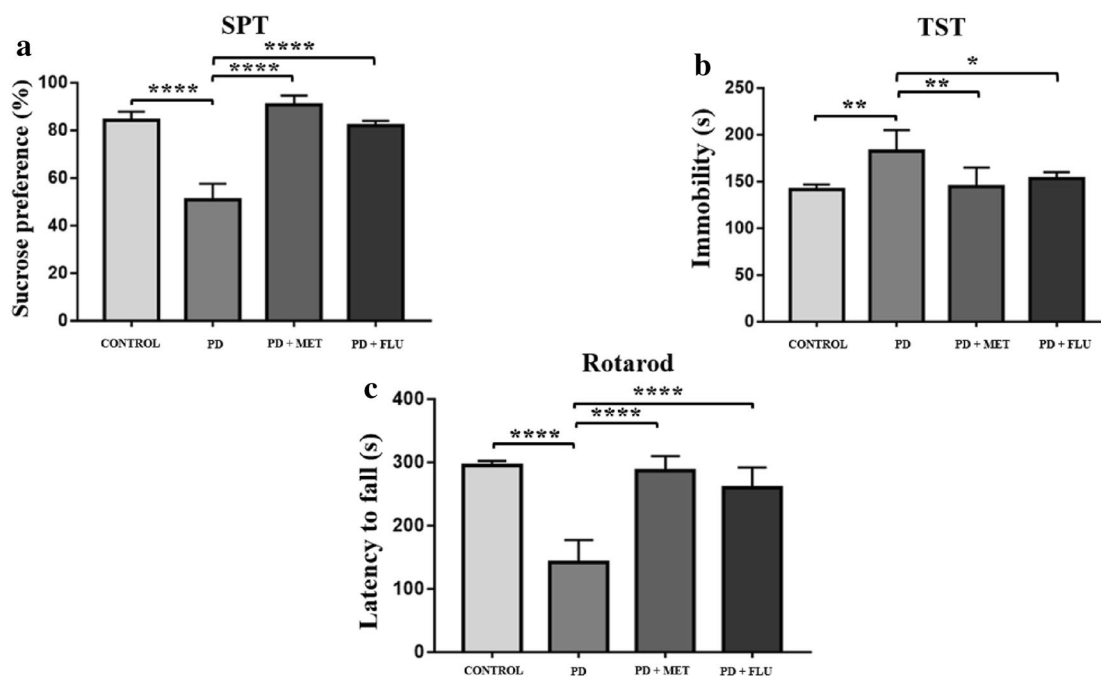


Fig. 1 Effect of metformin and fluoxetine on antidepressive behavior and motor control in the following groups CONTROL; PD; PD+MET; PD+FLU (mean $\pm$ SD). **a** Effect of drugs on sucrose preference test, analyzed by one-way ANOVA statistical tests of variance (< 0.05) and Tukey's post hoc test, data shown as a percentage (%); **(b)** Effect of drugs on immobility time by tail suspension test pre-

sented in seconds (s), analyzed by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0.05$) and Tukey's post hoc test. **c** Effect of drugs on rotarod test, analyzed by one-way ANOVA statistical tests of variance (< 0.05) and Tukey's post hoc test, data shown in seconds. ****: $p < 0.0001$; ** (CONTROL Vs PD TST): $p = 0.0043$; ** (PD Vs PD + MET TST): $p = 0.0077$; *: $p = 0.045$

increase in α -synuclein (PD vs PD + FLU p value < 0.0001), as shown in Figs. 2a, d.

Metformin inhibits activation of hippocampal mTOR

The animals induced with rotenone showed increased phosphorylation and activation of mTOR (mammalian target of rapamycin) mainly in the dentate gyrus and CA1 areas of the hippocampus (CONTROL Vs PD p value < 0.0001). Metformin, in turn, significantly reduced p-mTOR levels (PD Vs PD + MET p value < 0.0001) as well as fluoxetine (PD Vs PD + FLU p value < 0.0001). Both metformin and fluoxetine showed no statistically difference when compared with the control group, as shown in Fig. 3a, b.

Metformin alters levels of markers of the p-JNK and c-jun signaling pathway and transcription factor FOXO3A in the hippocampus and substantia nigra

In the hippocampus, rotenone did not cause a significant change in p-JNK levels; however, there was an increase in c-jun expression when compared to the control group (CONTROL Vs PD p value = 0.0017). Treatment with metformin as well as fluoxetine caused a significant increase in the expression of p-JNK and c-jun: metformin (p-JNK: PD Vs PD + MET p value = 0.0021; c-jun: PD Vs PD + MET p value < 0.0001), fluoxetine (p-JNK: PD Vs PD + FLU p value = 0.0002; c-jun: PD Vs PD + FLU p value < 0.0001). FOXO3A levels in the hippocampus did not change significantly between the CONTROL, PD and PD + MET groups; only the fluoxetine-treated group showed increased FOXO3A protein levels (PD Vs PD + FLU p -value < 0.0001), as shown in Fig. 4a, b, c, d.

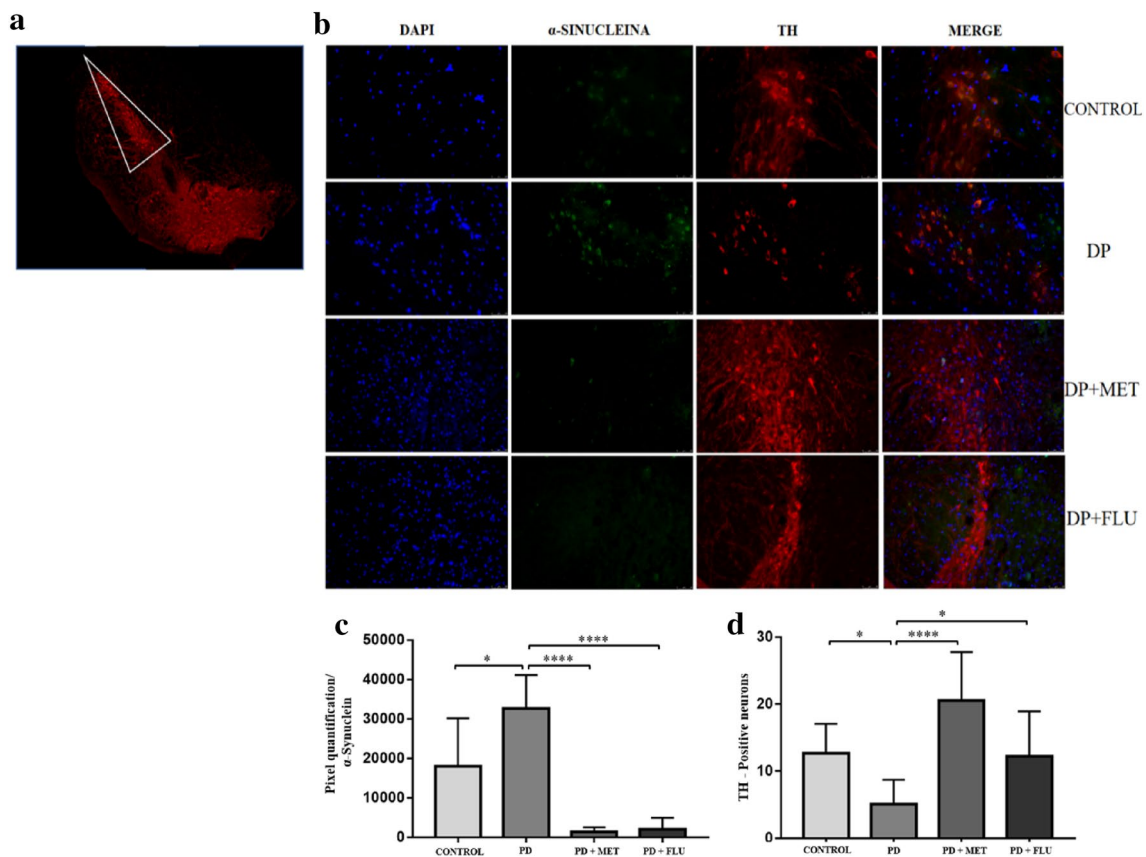


Fig. 2 Effect of metformin and fluoxetine on the expression of α -synuclein hippocampal in the animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU (mean $\pm$ SD). **a** Area delimitation analyzed corresponding to SNpc region; **b** Representative images of double-marking immunofluorescence to α -synuclein (green) and TH-positive neurons (red) in the SNpc. Cell nucleus labeled with DAPI (blue), with the superimposed images (MERGE) in the SNpc, analyzed in

400 $\times$ magnification, scale bar = 50 μ m. **c** Graphical representation of α -synuclein optical density, obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0,05$) and tukey's post hoc test. **d** Graphical representation of TH-positive neurons, obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0,05$) and tukey's post hoc test. ****: $p < 0,0001$; * (CONTROL Vs PD α -synuclein): $p = 0,0114$; * (CONTROL Vs PD TH): $p = 0,0312$; * (PD Vs PD + FLU): $p = 0,0348$

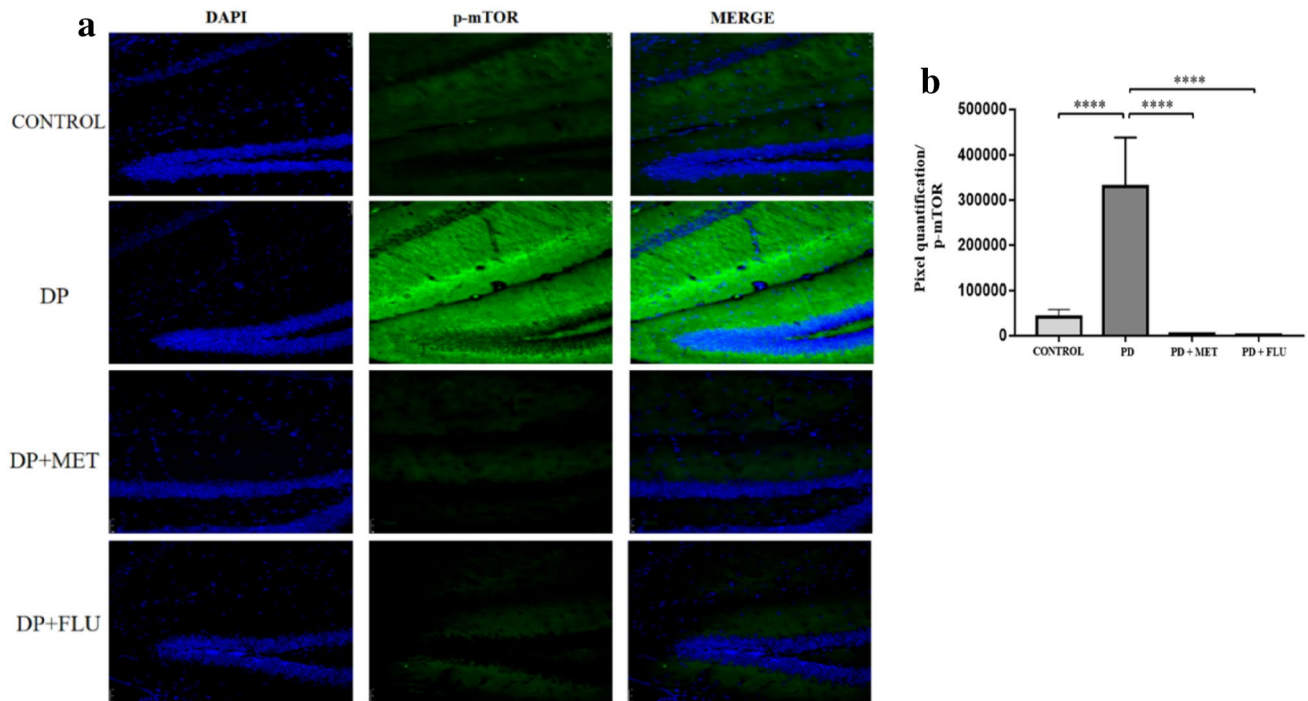


Fig. 3 Effect of metformin and fluoxetine on the expression of p-mTOR hippocampal in the animal groups CONTROL; PD; PD+MET; PD+FLU (mean $\pm$ SD). **a** Representative images of immunofluorescence to p-mTOR (green) and cell nucleus labeled with DAPI (blue), with the superimposed images (MERGE), ana-

lyzed in 400 $\times$ magnification, scale bar=50 μ m. **b** Graphical representation of p-mTOR optical density, obtained by one-way ANOVA statistical tests of variance ($p < 0,05$) and tukey's post hoc test. ****: $p < 0.0001$

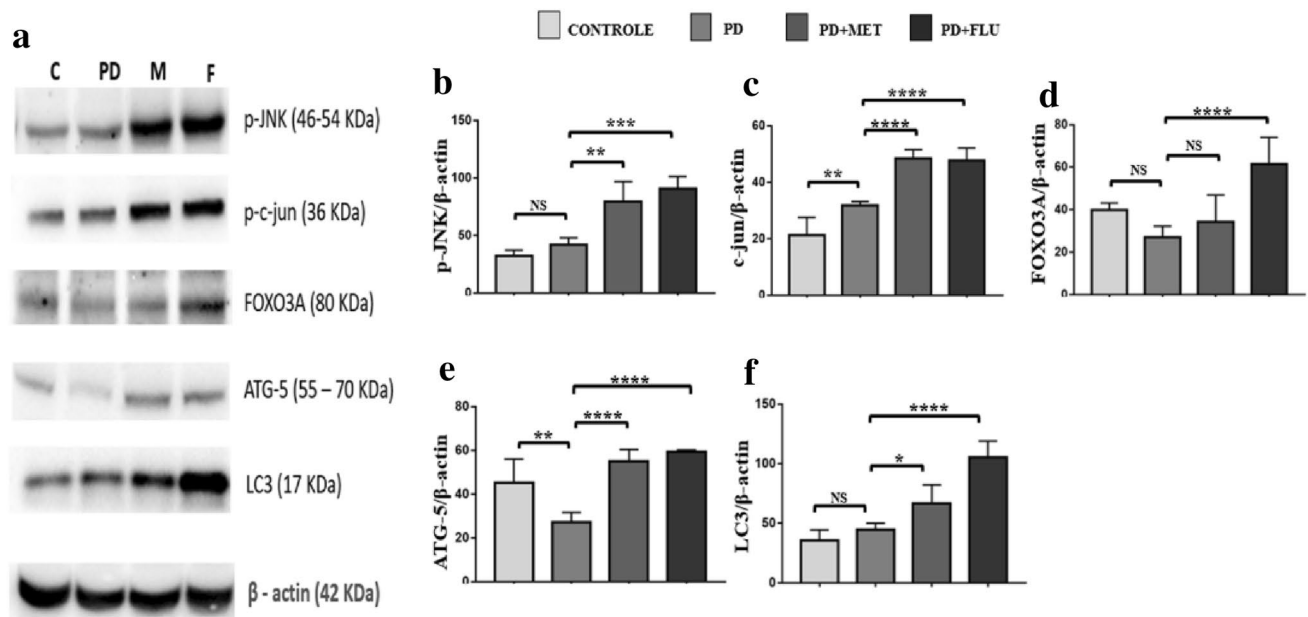


Fig. 4 Proteins expression in the hippocampus of animal groups CONTROL; PD; PD+MET; PD+FLU (mean $\pm$ SD). **a** Representative images of protein levels in the hippocampus. **b** Graphical representation of p-JNK levels. **c** Graphical representation of p-c-jun levels. **d** Graphical representation of FOXO3A levels. **e** Graphical representation of ATG-5 levels. **f** Graphical representation of

LC3 levels. Quantification by pixel density of bands by ImageJ. Bands were analyzed by one-way ANOVA—statistical tests of variance ($p < 0,05$) and tukey's post hoc test. NS: non-significant; *: $p = 0,0191$; ** (CONTROL Vs PD p-c-jun): $p = 0,0017$; ** (PD Vs PD+MET p-JNK): $p = 0,0021$; ** (CONTROL Vs PD ATG): $p = 0,0012$; ***: $p = 0,0002$; ****: $p < 0.0001$

In the substantia nigra, rotenone significantly decreased the expression of p-JNK (CONTROL Vs PD p value = 0.0203) and c-jun (CONTROL Vs PD p value = 0.0239). In contrast, metformin increased significantly the expression of p-JNK (PD Vs PD + MET p value = 0.0182) and c-jun (PD Vs PD + MET p value < 0.0001). Treatment with fluoxetine induced p-JNK expression similar to the PD group; however, it induced elevated levels of c-jun (PD Vs PD + FLU p value = 0.0013). FOXO3A levels in the substantia nigra were not altered by rotenone; however, they were significantly increased by treatments with metformin (PD Vs PD + MET p value = 0.0092) and fluoxetine (PD Vs PD + FLU p value < 0.0001), as shown in Fig. 5b, c, d.

Metformin increases levels of components of the autophagosome formation pathway ATG-5 and LC3 in the hippocampus and substantia nigra

ATG-5 expression was significantly decreased in the hippocampus by rotenone (CONTROL Vs PD p value = 0.0012); however, LC3 levels in this region were not altered. Metformin was able to increase the expression of ATG-5 (PD Vs PD + MET p value < 0.0001) and LC3 (PD Vs PD + MET p value = 0.0191), and fluoxetine also increased both autophagy markers, ATG-5 (PD Vs

PD + FLU p value < 0.0001) and LC3 (PD Vs PD + FLU p value < 0.0001), shown in Fig. 4e, f.

In the substantia nigra, rotenone decreased both markers, ATG-5 (CONTROL Vs PD p value = 0.0002) and LC3 (CONTROL Vs PD p value < 0.0001). Metformin treatment increased expression of ATG-5 (PD Vs PD + MET p value = 0.0003) and LC3 (PD Vs PD + MET p value < 0.0001). Treatment with fluoxetine showed no difference of the ATG levels when compared to the PD group and reduced the expression of LC3 (PD Vs PD + FLU p value = 0.0103), as shown in Fig. 5e, f.

Discussion

Depressive-like behavior has been demonstrated in different models of PD, induced by environmental neurotoxins or genetic models (Taylor et al. 2009; Vecchia et al. 2021; Zhao et al. 2021). Neuroinflammation (Mendonça et al. 2022), oxidative stress (Subramaniam and Chesselet 2013; Liu et al. 2015), cell death (Zhang et al. 2020b; Peng et al. 2020) and autophagy impairment (Ali et al. 2020) are common to both disorders.

In the present study, rotenone-induced depressive-like behavior by decreasing sucrose preference assessed by SPT and increasing immobility time, assessed by TST, as

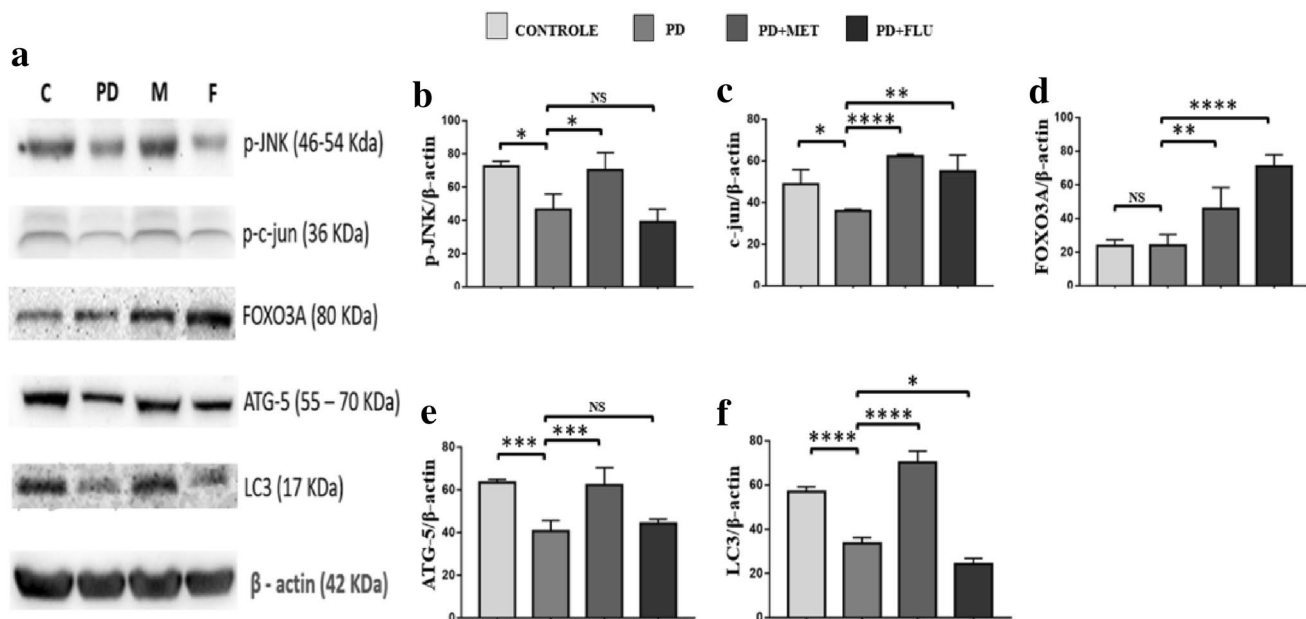


Fig. 5 Proteins expression in the substantia nigra of animal groups CONTROL; PD; PD + MET; PD + FLU (mean ± SD). **a** Representative images of protein levels in the hippocampus. **b** Graphical representation of p-JNK levels. **c** Graphical representation of p-c-jun levels. **d** Graphical representation of FOXO3A levels. **e** Graphical representation of ATG-5 levels. **f** Graphical representation of LC3 levels. Quantification by pixel density of bands by ImageJ. Bands

were analyzed by one-way ANOVA—statistical tests of variance ($p < 0,05$) AND tukey's post hoc test. NS: non-significant; * (CONTROL Vs PD p-JNK): $p = 0,0203$; * (CONTROL Vs PD p-c-jun): $p = 0,0239$; * (PD Vs PD + MET p-JNK): $p = 0,0182$; ** (PD Vs PD + FLU p-c-jun): $p = 0,0013$; ** (PD Vs PD + MET FOXO3A): $p = 0,0092$; *** (CONTROL Vs PD ATG): $p = 0,0002$; *** (PD Vs PD + MET ATG): $p = 0,0003$; ****: $p < 0.0001$

described in a previous study (Madiha and Haider 2019). These tests assess anhedonia and despair, respectively, which are endophenotypes of depressive behavior in animal models (Schintu et al. 2012; Yoon et al. 2014). In addition, rotenone also caused motor deficits by decreasing the latency to fall assessed by the rotarod test, as previously observed by (Günaydin et al. 2019). Metformin, in turn, produced antidepressant effects by increasing sucrose preference and decreasing immobility time in animals, in addition to decreasing motor impairment demonstrated by increased rotarod test latency.

Metformin has been reported as an antidepressant agent in a recent experimental study using LPS-induced depression and chronic stress models (Poggini et al. 2019; Yang et al. 2020) and in a review of the clinical literature (Woo et al. 2020). In our previous study using the experimental model of rotenone-induced PD, we also found that metformin alone or plus fluoxetine exerts significant antidepressant effects associated with improved neuroinflammation, induction of neurogenesis and neuroplasticity (Mendonça et al. 2022).

In the present study, we evaluated the effect of metformin on autophagy signaling pathways in depressive-like behavior in a rotenone-induced PD model. Autophagy is considered an evolutionarily well-conserved intracellular process that facilitates energy homeostasis of the cell, through the lysosomal degradation of macromolecules such as proteins and damaged organelles (Parzych and Klionsky 2014). Although basal-level autophagy occurs in all cell types, it is intensified under situations such as stress, food deprivation or proteotoxic conditions. Failures in autophagy signaling pathways are part of the pathophysiological mechanisms of Parkinson's disease and other synucleinopathies. Recently, autophagy disturbances have also been recently reported in patients and mouse models of depression (Rein 2019; Du et al. 2021). Moreover, several studies have described the effects of compounds with antidepressant action on autophagy (Gassen and Rein 2019; Ali et al. 2020; Fleming and Rubinsztein 2020; Yan et al. 2020).

The mammalian target rapamycin kinase (mTOR) is an important negative regulator of the autophagic process and is regulated by hunger, growth factors and cellular stressors (Heras-Sandoval et al. 2014). Phosphorylation of mTOR inhibits the activity of unc-51 autophagy activating kinase 1 (ULK1), which is essential for inducing autophagy. In our study, rotenone increased mTOR activation in the hippocampus, a region also affected in PD and depression. Metformin, on the other hand, significantly reduced the levels of hippocampal p-mTOR, suggesting inhibition of autophagy. Metformin has been shown in experimental studies as an agent that improves cognitive functions in aged mice due to anti-inflammatory and autophagy-inducing mechanisms, including reduced levels of mTOR in the hippocampus (Kodali et al. 2021). Xu et al. (2021) recently also

indicated the autophagic role of metformin in the degradation of β -amyloid proteins and amyloid precursor protein, in an animal model of Alzheimer's disease, in addition to improving memory and learning assessed by the Morris water maze test (Xu et al. 2021). The present results show that the increase in autophagy occurs in parallel with the depressive-like behavioral improvement in the animal model of PD.

Furthermore, in the hippocampus, rotenone caused a slight increase in c-jun levels, whereas in the SN there was a significant decrease in both JNK and p-c-jun in the PD group. The NH2 terminal kinase (JNK)/c-Jun signal transduction pathway functions to induce defense mechanisms that protect organisms against acute oxidative and xenobiotic insults (Zhou et al. 2015). This pathway has also been repeatedly associated with the molecular events involved in the regulation of autophagy. Sun et al (2011) showed that the JNK/c-jun signaling pathway increased autophagy in nasopharyngeal carcinoma cells (Sun et al. 2011). Recently, Li et al. (2019) observed similar results in hepatocellular carcinoma (Li et al. 2020). Interestingly, treatment of rotenone-induced PD mice with metformin increased the expression of both JNK and p-c-jun in the hippocampus and SN.

The metformin-treated group showed a significant increased levels of FOXO3A levels (autophagy transcription factor), ATG5 and LC3 (components of the autophagosome formation), both in the hippocampus and in the SN. These results corroborate the results of Ali et al. (2020), where they found a decrease in the protein levels of FOXO3A, ATG-5 and LC3 in animals submitted to an experimental model of depression by injection of LPS. In addition, these authors also showed that the improvement in depressive behavior, assessed by SPT and TST tests, is dependent on the recovery of autophagy through the use of autophagy inhibitors (Ali et al. 2020).

We also showed in the present study that metformin significantly reduced the amount of α -synuclein in the SN, a protein involved in the neuropathology of PD and significantly increased by rotenone. α -synuclein can acquire an abnormal function and form lewy bodies, which constitute a neuropathological factor in PD and other neuropsychiatric diseases. Proteins with abnormal function such as α -synuclein form insoluble aggregates within the neuron that must be removed by processes such as autophagy, which 'cleans' these toxic proteins aggregates (Zhang et al. 2019). Our data are also in agreement with the study by Katila et al (2017), in which metformin also reduced α -synuclein levels in the SN (Katila et al. 2017). Therefore, these results suggest that metformin decreases α -synuclein aggregation by inducing autophagy.

In addition to antidepressant and autophagy-inducing effects, metformin acts as a neuroprotective agent in neurodegeneration processes related to PD pathology. In our study,

metformin significantly inhibited rotarod-induced motor deficits. Similarly, work by Lu and colleagues in 2016 showed that metformin improved MPTP-induced motor impairment in animals, and this effect was associated with the increase in LC3 observed in dopaminergic cells also treated with MPTP (Lu et al. 2016). Our results corroborate to the knowledge that autophagy is also implicated in the dysfunction of the nigrostriatal system, responsible for motor control.

Furthermore, in the present study, metformin proved to be effective in inhibiting the loss of dopaminergic neurons in the SN of the animals, evidenced by the double labeling for α -synuclein/TH, corroborating with the data previously published by Lu et al (2016) that demonstrated that metformin significantly improved the degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra, increased striatal dopaminergic levels and improved motor impairment (Lu et al. 2016). Similar results were also found in other studies in different organisms, such as in *C. elegans*, in which metformin significantly decreased neurodegeneration in 6-hydroxydopamine-induced worms and recovered their motor behavior. Interestingly, these authors also showed that metformin also inhibited α -synuclein aggregation (Saewanee et al. 2021).

Given the therapeutic potential of metformin seen in this study, the question arises of metformin's ability to penetrate through the blood brain barrier (BBB). Although we have not quantified cerebral metformin in our study, according to previous experimental studies, orally administered metformin has good absorption across the BBB (Łabuzek et al. 2010; Jin et al. 2016). In one of these studies, plasma and brain concentrations of metformin administered orally in rats were analyzed. Maximum brain concentration of metformin was reached 6 h after administration (13.5 ± 2.3 nmol/g). In addition, the brain-to-plasma ratio was calculated as an indicator of metformin's ability to cross the BBB. Six hours after administration, metformin had a brain-to-plasma ratio of about 0.99. In other words, plasma and brain concentrations

were almost equal, indicating that metformin easily crosses the BBB (Łabuzek et al. 2010).

Several review studies have discussed the potential therapeutic effect of metformin in treating PD in humans (Demaré et al. 2021; Agostini et al. 2021; Masato et al. 2021; Du et al. 2022). However, clinical studies have focused only on the correlation between metformin use in diabetic patients and the risk of developing PD. Although restricted to specific populations, these studies showed that long-term use of metformin protects diabetic patients against PD (Wahlqvist et al. 2012; Shi et al. 2019). Therefore, to date, there are no clinical data on how metformin influences brain biochemistry as well as clinical outcomes in humans, so there is still no way to know the dose needed to achieve similar results. Nonetheless, the dose of metformin used in our study corresponds to a human translational dose of 1000 mg/day (Reagan-Shaw et al. 2008), thus being an approximate average of the recommended doses of 500 and 2000 mg per day as previously described (Oliveira et al. 2021), attesting to the clinical safety of the possible therapeutic use in modulation of the autophagy process.

Conclusion

Taken together, the results obtained suggest that metformin exerts antidepressant and antiparkinsonian effects through the induction of autophagic signaling pathways in both the hippocampus and the substantia nigra, indicating a therapeutic potential for both motor and non-motor symptoms present in PD. Interestingly, metformin exerts an inhibitory effect on α -synuclein aggregation and acts as an inducer of pro-autophagy transcription factors and autophagosome formation (Fig. 6). This study also presents metformin as one of the possible therapeutic approaches, as it is a safe and accessible drug. Although it needs more experimental studies, including clinical trials, this strategy has advantages over the currently available treatment for Parkinson's disease, which is only symptomatic, both for motor symptoms and for non-motor symptoms such as depression.

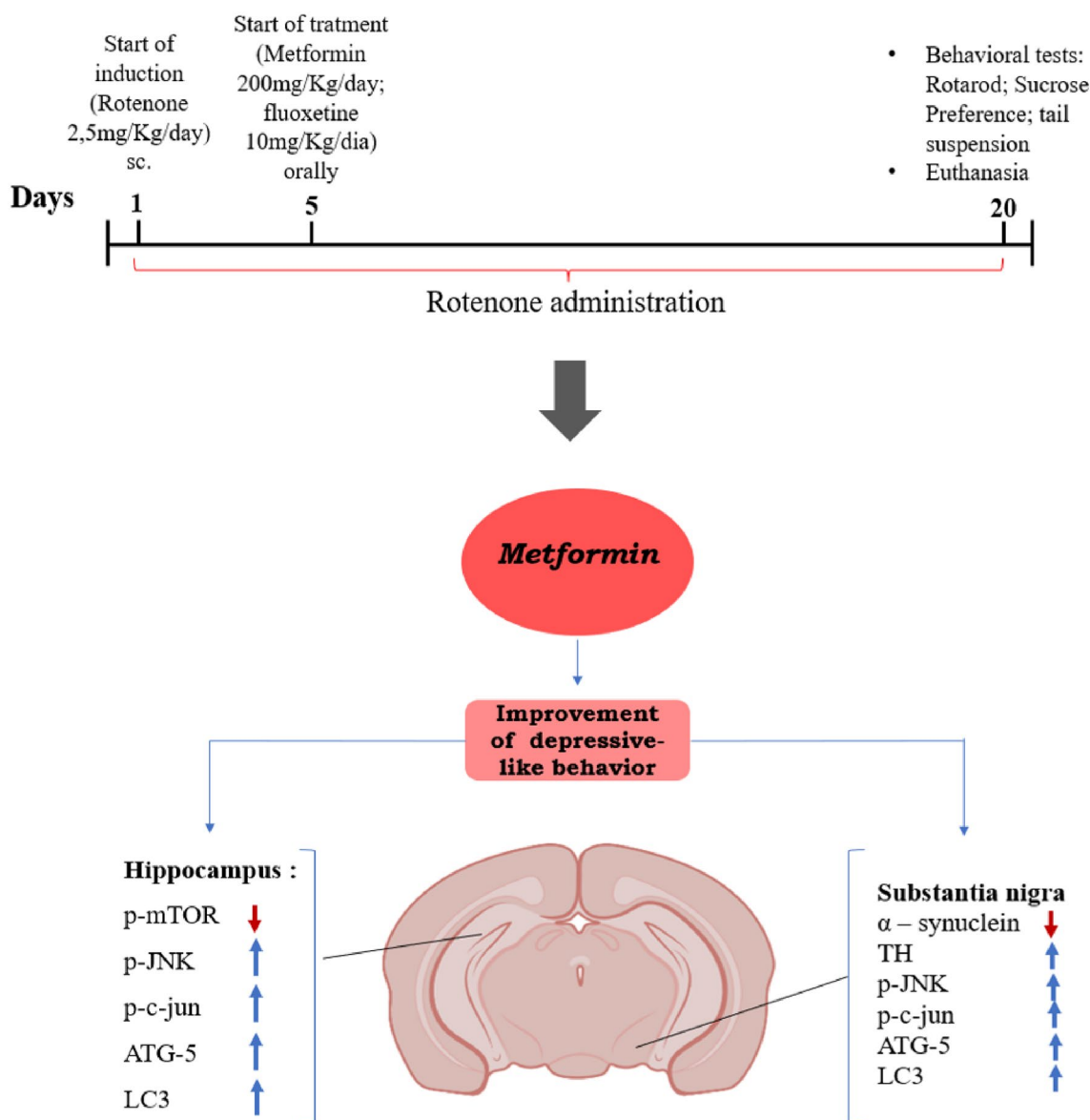


Fig. 6 Experimental model of PD induced by subcutaneous rotenone for 20 consecutive days caused motor deficit, neurodegeneration and impairment of autophagy in the hippocampus and substantia nigra.

Metformin treatment for 15 consecutive days reversed motor impairment and depressive-like behavior led to autophagy in hippocampus and substantia nigra. Red arrows = decrease; blue arrows = increase

Acknowledgements The authors would like to express their gratitude to the Research Excellence Program—Instituto Aggeu Magalhães (IAM PROEP # 400208 / 2019-9), the Knowledge Generation Program—Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; # VPPCB-007-FIO-18 -2-17), the Institute of Science and Technology of Neuroimmunomodulation (INCT-NIM; # 465489 / 2014-1) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; # 301777 / 2012- 8). This study was partially funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—Brazil (CAPES)—Financial Code 001.

Funding The funding sources had no involvement in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; in the preparation of the article; nor in the decision to submit the article for publication.

Data availability Enquiries about data availability should be directed to the authors.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This piece of work was done in compliance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CON-CEA). All protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEUA 140/2019).

References

- Agostini F, Masato A, Bubacco L, Bisaglia M (2021) Metformin repurposing for Parkinson disease therapy: opportunities and challenges. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010398>
- Ali T, Rahman SU, Hao Q et al (2020) Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation. *J Pineal Res*. <https://doi.org/10.1111/JPI.12667>
- Atik A, Stewart T, Zhang J (2016) Alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease. *Brain Pathol* 26:410–418. <https://doi.org/10.1111/BPA.12370>
- Can A, Dao D, Terrillion C et al (2012) The tail suspension test. *J vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/3769>
- Chang CC, Huang TY, Chen HY et al (2018) Protective effect of melatonin against oxidative stress-induced apoptosis and enhanced autophagy in human retinal pigment epithelium cells. *Oxid Med Cell Longev*. <https://doi.org/10.1155/2018/9015765>
- Chen J, Zhou T, Guo AM et al (2020) Metformin ameliorates lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors and abnormal glutamatergic transmission. *Biology (Basel)* 9:1–14. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9110359>
- Deacon R (2013) Measuring motor coordination in mice. *J vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/2609>
- Demaré S, Kothari A, Calcutt NA, Fernyhough P (2021) Metformin as a potential therapeutic for neurological disease: mobilizing AMPK to repair the nervous system. *Expert Rev Neurother* 21:45–63. <https://doi.org/10.1080/14737175.2021.1847645>
- Dickson DW (2018) Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 46(Suppl 1):S30–S33. <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2017.07.033>
- Dinkel K, MacPherson A, Sapolsky RM (2003) Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J Neurochem* 84:705–716. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2003.01604.X>
- Du MR, Gao QY, Liu CL et al (2022) Exploring the pharmacological potential of metformin for neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.838173>
- Du T, Li G, Luo H et al (2021) Hippocampal alpha-synuclein mediates depressive-like behaviors. *Brain Behav Immun* 95:226–237. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.03.020>
- Ferrari F, Villa RF (2017) The neurobiology of depression: an integrated overview from biological theories to clinical evidence. *Mol Neurobiol* 54:4847–4865. <https://doi.org/10.1007/S12035-016-0032-Y>
- Fleming A, Rubinsztein DC (2020) Autophagy in neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 43:767–779. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.07.003>
- Gassen N, Rein T (2019) Is There a role of autophagy in depression and antidepressant action? *Front Psychiatry*. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2019.00337>
- Goedert M, Compston A (2018) Parkinson's disease—the story of an eponym. *Nat Rev Neurol* 14:57–63. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2017.165>
- Gorton LM, Vuckovic MG, Vertelkina N et al (2010) Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the mptp-lesioned mouse. *Behav Brain Res* 213:253–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.009>
- Günaydin C, Avcı B, Bozkurt A et al (2019) Effects of agomelatine in rotenone-induced Parkinson's disease in rats. *Neurosci Lett* 699:71–76. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.01.057>
- Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J (2014) The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cell Signal* 26:2694–2701. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2014.08.019>
- Hillhouse TM, Porter JH (2015) A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol* 23:1–21. <https://doi.org/10.1037/A0038550>
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477–501. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7)
- Jin J, Gu H, Anders NM et al (2016) Metformin protects cells from mutant huntingtin toxicity through activation of AMPK and modulation of mitochondrial dynamics. *Neuromolecular Med* 18:581. <https://doi.org/10.1007/S12017-016-8412-Z>
- Kalia LV, Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet (London, England)* 386:896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Katila N, Bhurtel S, Shadfar S et al (2017) Metformin lowers α -synuclein phosphorylation and upregulates neurotrophic factor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 125:396–407. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.08.015>
- Kim CY, Alcalay RN (2017) Genetic forms of Parkinson's disease. *Semin Neurol* 37:135–146. <https://doi.org/10.1055/S-0037-1601567>
- Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE (2016) The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64:277–284. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2015.06.008>
- Kodali M, Attaluri S, Madhu L et al (2021) Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus. *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/ACEL.13277>
- Łabuzek K, Suchy D, Gabryel B et al (2010) Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep* 62:956–965. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70357-1](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70357-1)
- Li Z, Zhang L, Gao M et al (2020) Retraction note: endoplasmic reticulum stress triggers xanthoangelol-induced protective autophagy via activation of JNK/c-Jun axis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1186/S13046-020-01668-X>
- Liu T, Zhong S, Liao X et al (2015) A Meta-analysis of oxidative stress markers in depression. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138904>
- Lu G, Wu Z, Shang J et al (2021) The effects of metformin on autophagy. *Biomed Pharmacother*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111286>
- Lu J, Wu M, Yue Z (2020) Autophagy and Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* 1207:21–51. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4272-5_2
- Lu M, Su C, Qiao C et al (2016) Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance. *Int J Neuropsychopharmacol* 19:1–11. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYW047>
- Madiha S, Haider S (2019) Curcumin restores rotenone induced depressive-like symptoms in animal model of neurotoxicity: assessment by social interaction test and sucrose preference test. *Metab Brain Dis* 34:297–308. <https://doi.org/10.1007/S11011-018-0352-X>
- Masato A, Sandre M, Antonini A, Bubacco L (2021) Patients stratification strategies to optimize the effectiveness of scavenging biogenic aldehydes: towards a neuroprotective approach for Parkinson's disease. *Curr Neuropharmacol* 19:1618. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210203162617>
- Mendonça IP, Duarte-Silva E, Chaves-Filho AJM et al (2020) Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: a review. *Int Immunopharmacol*. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2020.106434>

- Mendonça IP, de Paiva IHR, Duarte-Silva EP et al (2022) Metformin and fluoxetine improve depressive-like behavior in a murine model of Parkinson's disease through the modulation of neuroinflammation, neurogenesis and neuroplasticity. *Int Immunopharmacol*. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.108415>
- Oliveira W, Braga C, Lós D et al (2021) Metformin prevents p-tau and amyloid plaque deposition and memory impairment in diabetic mice. *Brain Res* 239(9):2821–2839. <https://doi.org/10.1007/s00221-021-06176-8> (Accessed 23 Oct 2021)
- Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20:460–473. <https://doi.org/10.1089/ARS.2013.5371>
- Peng Z, Zhang C, Yan L et al (2020) EPA is More effective than DHA to improve depression-like behavior, glia cell dysfunction and hippocampal apoptosis signaling in a chronic stress-induced rat model of depression. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/IJMS21051769>
- Poggini S, Golia MT, Alboni S et al (2019) Combined fluoxetine and metformin treatment potentiates antidepressant efficacy increasing IGF2 expression in the dorsal hippocampus. *Neural Plast* 2019:4651031. <https://doi.org/10.1155/2019/4651031>
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574lsf>
- Rein T (2019) Is Autophagy Involved in the diverse effects of antidepressants? *Cells*. <https://doi.org/10.3390/CELLS8010044>
- Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH (2018) Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 109:249–257. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.04.004>
- Saewane N, Praputpittaya T, Malaiwong N et al (2021) Neuroprotective effect of metformin on dopaminergic neurodegeneration and α -synuclein aggregation in *C. elegans* model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 162:13–21. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2019.12.017>
- Schintu N, Zhang X, Svenningsson P (2012) Studies of depression-related states in animal models of Parkinsonism. *J Parkinsons Dis* 2:87–106. <https://doi.org/10.3233/JPD-2012-12076>
- Shi Q, Liu S, Fonseca VA et al (2019) Effect of metformin on neurodegenerative disease among elderly adult US veterans with type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open*. <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2018-024954>
- Śmieszek A, Stręk Z, Kornicka K et al (2017) Antioxidant and anti-senescence effect of metformin on mouse olfactory ensheathing cells (mOECs) may be associated with increased brain-derived neurotrophic factor levels—an ex vivo study. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/IJMS18040872>
- Sorrells SF, Munhoz CD, Manley NC et al (2014) Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats. *Neuroendocrinology* 100:129–140. <https://doi.org/10.1159/000367849>
- Subramaniam SR, Chesselet MF (2013) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 106:17–32. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.04.004>
- Sun T, Li DD, Wang LL et al (2011) c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. *J Transl Med*. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-161>
- Taylor TN, Caudle WM, Shepherd KR et al (2009) Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. *J Neurosci* 29:8103–8113. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1495-09.2009>
- Vecchia D, Kanazawa L, Wendler E et al (2021) Ketamine reversed short-term memory impairment and depressive-like behavior in animal model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 168:63–73. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.12.011>
- Wahlqvist ML, Lee MS, Hsu CC et al (2012) Metformin-inclusive sulfonylurea therapy reduces the risk of Parkinson's disease occurring with type 2 diabetes in a Taiwanese population cohort. *Parkinsonism Relat Disord* 18:753–758. <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2012.03.010>
- Woo YS, Lim HK, Wang SM, Bahk WM (2020) Clinical evidence of antidepressant effects of insulin and anti-hyperglycemic agents and implications for the pathophysiology of depression—a literature review. *Int J Mol Sci* 21:1–33. <https://doi.org/10.3390/IJMS21186969>
- Xu X, Sun Y, Cen X et al (2021) Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. *Protein Cell* 12:769–787. <https://doi.org/10.1007/S13238-021-00858-3>
- Yan J, Liu A, Fan H et al (2020) Simvastatin improves behavioral disorders and hippocampal inflammatory reaction by NMDA-mediated anti-inflammatory function in MPTP-treated mice. *Cell Mol Neurobiol* 40:1155–1164. <https://doi.org/10.1007/S10571-020-00804-7>
- Yang C, Ma X, Wang Z et al (2017) Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Des Devel Ther* 11:431–439. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S126964>
- Yang S, Chen X, Xu Y et al (2020) Effects of metformin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice and its mechanisms. *NeuroReport* 31:305–310. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001401>
- Yoon SH, Kim BH, Ye SK, Kim MH (2014) Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. *Korean J Physiol Pharmacol* 18:263–268. <https://doi.org/10.4196/KJPP.2014.18.3.263>
- Zhang J, Huang L, Shi X et al (2020a) Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway. *Aging (Albany NY)*. 12:24270–24287
- Zhang M, He Q, Chen G, Andy Li P (2020b) Suppression of NLRP3 inflammasome, pyroptosis, and cell death by NIM811 in rotenone-exposed cells as an in vitro model of Parkinson's Disease. *Neurodegener Dis* 20:73–83. <https://doi.org/10.1159/000511207>
- Zhang SF, Wang XY, Fu ZQ et al (2015) TXNDC17 promotes paclitaxel resistance via inducing autophagy in ovarian cancer. *Autophagy* 11:225–238. <https://doi.org/10.1080/15548627.2014.998931>
- Zhang Y, Wu Q, Zhang L et al (2019) Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy in vitro and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Res*. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2019.104538>
- Zhao X, Kong D, Zhou Q et al (2021) Baicalein alleviates depression-like behavior in rotenone-induced Parkinson's disease model in mice through activating the BDNF/TrkB/CREB pathway. *Biomed Pharmacother*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111556>
- Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF (2015) MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep* 35:1–10. <https://doi.org/10.1042/BSR20140141>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.