



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



INGRID PRATA MENDONÇA

**EFEITOS DA METFORMINA E FLUOXETINA
SOBRE NEUROINFLAMAÇÃO, AUTOFAGIA,
NEUROGÊNESE E PLASTICIDADE SINÁPTICA
HIPOCAMPAL EM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON**

Recife
2021

INGRID PRATA MENDONÇA

**EFEITOS DA METFORMINA E
FLUOXETINA SOBRE
NEUROINFLAMAÇÃO, AUTOFAGIA,
NEUROGÊNESE E PLASTICIDADE
SINÁPTICA HIPOCAMPAL EM MODELO
DE DOENÇA DE PARKINSON.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências biológicas.

Área de concentração: biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Christina Alves Peixoto

Coorientadora: Profa. Dra. Belmira Lara da S. Andrade da
Costa

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Medonça, Ingrid Prata.

Efeitos da metformina e fluoxetina sobre neuroinflamação, autofagia, neurogênese e plasticidade sináptica hipocampal em modelo de doença de parkinson. / Ingrid Prata Medonças. – 2021.

88 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Christina Alves Peixoto.

Coorientadora: Belmira Lara da S. Andrade da Costa.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

Inclui referências.

1. Depressão. 2. Doença de Parkinson. 3. Fluoxetina. 4. Hipocampo. 5. Metformina. I. Peixoto, Christina Alves (Orient.). II. Costa, Belmira Lara da S. Andrade da (Coorient.). III. Título.

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-169

INGRID PRATA MENDONÇA

**EFEITOS DA METFORMINA E
FLUOXETINA SOBRE
NEUROINFLAMAÇÃO, AUTOFAGIA,
NEUROGÊNESE E PLASTICIDADE
SINÁPTICA HIPOCAMPAL EM MODELO
DE DOENÇA DE PARKINSON.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências biológicas.

Área de concentração: biotecnologia.

Aprovada em: 24/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto (Orientadora – Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco (UPE)

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional;

Aos amigos Crislayne, Leandro, Débora e Deniele, pelas boas vibrações e pelo afeto.

Aos colegas do laboratório de Ultraestrutura Eduardo, Rodrigo, Michel, Igor e Wilma, por toda a ajuda e por ter tornado tudo mais leve.

A Rodrigo Lima, por todo apoio e pela companhia encorajadora que tem sido;

A minha orientadora Christina Peixoto, por ter me aceito como aluna e por toda instrução concedida, a qual me enriqueceu como pessoa e profissional.

A minha coorientadora Belmira Lara, pelo ser humano incrível que é e pela bagagem científica compartilhada.

Agradeço imensamente aos professores que compuseram a banca de avaliação Dr. Filipe Silveira Duarte e Dra. Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha.

Ao professor Reginaldo, pelo café e pela amizade de sempre.

Ao INCT-NIM pelo financiamento desse projeto.

A FACEPE, pelo apoio financeiro pessoal.

Ao biotério de criação e experimentação, bem como ao seu pessoal.

Ao Instituto Aggeu Magalhaes pela infraestrutura e apoio que tornaram possível a realização de todas as etapas desse trabalho.

E a todos os demais que de formas diversas e indiretas contribuíram para esta chegada.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo que afeta cerca de 1% da população mundial acima de 65 anos de idade. Cerca de 30-40% dos pacientes com DP tem depressão contribuindo para o agravamento da perda da qualidade de vida desses pacientes. Dentre os pacientes parkinsonianos que tratam a depressão, cerca de 50% não apresentam melhora significativa, devido à eficácia limitada do tratamento. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da metformina, associada ou não, à fluoxetina, sobre alterações moleculares hipocâmpais em modelo da doença de Parkinson. 50 camundongos C57BL6 machos (8-12 semanas) foram previamente divididos em 5 grupos (n = 10); (1) CONTROLE, (2) DP, (3) DP + MET, (4) DP + FLU, (5) DP + MET + FLU. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEUA 140/2019). Os animais foram induzidos à DP com dose de 2,5 mg/Kg/dia durante 20 dias, e tratados com metformina na dose de 200mg/Kg/dia e fluoxetina na dose de 10 mg/Kg/dia a partir do 5º dia de indução em diante. Ao fim do experimento, os animais foram submetidos à teste do Rotarod, Teste de Preferência à sacarose (TPS) e Teste de Suspensão da Cauda (TSC). O cérebro foi retirado e o hipocampo foi dissecado para análises moleculares. Através de Imunohistoquímica e Imunofluorescência, demonstramos que metformina e fluoxetina melhoraram o déficit motor causado pela rotenona no teste do rotarod, como também preveniram comportamento tipo-depressivo induzido pela rotenona avaliados nos testes TPS e TSC. Além disso, o tratamento com metformina e fluoxetina reduziram ativação de micróglia e astrócitos pela menor reação à IBA1 e GFAP que foram aumentados pela rotenona. Análise de autofagia mostrou que a rotenona induziu aumento de mTOR, prejudicando a autofagia, enquanto a metformina e fluoxetina inibiram os níveis de mTOR, induzindo autofagia que foi comprovada pelo aumento de ATG5. Os fármacos também aumentaram neurogênese e a sobrevivência neuronal evidenciado através do aumento de KI67 e Neu N, respectivamente, e reduziram a morte celular pela diminuição de caspase 3 e PARP1. Metformina potencializou o efeito da fluoxetina sobre a neuroplasticidade através do aumento de CREB-p e

BDNF. O presente estudo concluiu que a metformina e a fluoxetina apresentam efeitos antiparkinsonianos e anti-depressivos através de alterações hipocâmpais em modelo experimental de doença de Parkinson.

Palavras-chave: depressão; doença de Parkinson; fluoxetina. hipocampo. metformina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is considered the second most prevalent neurodegenerative disease in the world, affecting about 1% of the world population over 65 years of age. About 30-40% of PD patients have depression, contributing to the worse quality of life. Among parkinsonian patients who treat depression, about 50% show no improvement, due to the limited effectiveness of the treatment. The present study aimed to evaluate the effects of metformin, associated or not, with fluoxetine, over hippocampal molecular changes in the Parkinson's disease model. 50 male C57BL6 mice (8-12 weeks) were previously divided into 5 groups (n = 10); (1) CONTROLE, (2) DP, (3) DP + MET, (4) DP + FLU, (5) DP + MET + FLU. All the protocols were approved by the Animal Use Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Research Institute (CEUA 140/2019). The animals were induced to PD with a dose of 2.5 mg/kg/day for 20 days, and treated with metformin at a dose of 200mg / kg / day and fluoxetine at a dose of 10 mg / kg / day from the 5th induction day onwards. At the end of the experiment, the animals were submitted to Rotarod test, Sucrose Preference Test (SPT) and Tail Suspension Test (TST). The brain was removed and the hippocampus was dissected for molecular analysis. Through immunohistochemistry and immunofluorescence, we demonstrate that metformin and fluoxetine improved the motor deficit induced by rotenone in the rotarod test, as well as preventing type-depressive behavior induced by rotenone in the SPT and TST. In addition, treatment with metformin and fluoxetine reduced the activation of microglia and astrocytes evidenced by IBA1 and GFAP decrease, which were increased by rotenone. Autophagy analysis showed that rotenone induced increase in mTOR levels, impairing autophagy, while metformin and fluoxetine reduced mTOR levels, inducing autophagy, besides to increase ATG5. Metformin and fluoxetine also increased neurogenesis and neuronal survival evidenced by increasing KI67 and Neu N, respectively, and reduced cell death evidenced by decreasing caspase 3 and PARP1. Metformin potentiated the fluoxetine effect on neuroplasticity evidenced by CREB-p and BDNF increasing. The present study concluded that metformin and fluoxetine feature antiparkinsonian and antidepressant effects through hippocampal

changes in the experimental model of Parkinson's disease.

Keywords: depression; Parkinson's disease; fluoxetine; hippocampus; mertormin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aferências córtex Núcleos da base.	20
Figura 2 - Eferências Núcleos da base córtex	20
Figura 3 - Corte transversal do cérebro evidenciando a substância negra (SN)	22
Figura 4 - Via Direta dos núcleos da base	22
Figura 5 - Via indireta dos núcleos da base	23
Figura 6 - Circuito alterado na DP	24
Figura 7 - Principais mecanismos de ação da metformina	31
Figura 8 - Delineamento experimental do estudo.	38
Figura 9 - Teste do Rotarod	43
Figura 10 - (a) Teste da Preferência de Sacarose e (b) Teste da Suspensão da cauda	44
Figura 11 - (a e b) Imunohistoquímica para TH na Substância Negra.....	45
Figura 12 - (a, b e c) Imunofluorescência para TH e α -sinucleína na Substância Negra.	46
Figura 13 - (a e b) Imunohistoquímica para GFAP no hipocampo; (c e d) Imunohistoquímica para IBA-1 no hipocampo.	48
Figura 14 - (a e b) Imunofluorescência para mTOR no hipocampo; (c e d) Imunofluorescência para ATG5 no hipocampo	49
Figura 15 - (a e b) Imunofluorescência para KI67 no hipocampo	51
Figura 16 - (a e b) Imunohistoquímica para NeuN no hipocampo	52
Figura 17 - (a e b) Imunohistoquímica para PARP1 no hipocampo.....	53
Figura 18 - (a e b) Imunohistoquímica para CREB-p no hipocampo; (c e d) Imunohistoquímica para BDNF no hipocampo	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5 – HIAA** – 5- Ácido Hidroxiindolacético
- 6 -OHDA** – 6-Hidroxidopamina
- ADA** – American Diabetes Association
- AMPK** – Adenosine monophosphate-activated protein kinase
- BDNF** – Brain-derived neurotrophic factor
- BHE** – Barreira hemato-encefálica
- COX-2** – CICLO-OXIGENASE 2
- DMII** – Diabetes tipo 2
- DP** – Doença de Parkinson
- EASD** – European Association for the Study of Diabetes
- GABA** – Gamma-AminoButyric acid
- GDNF** – Glia-Derived Neurotrophic Factor
- IL1-β** – Interleucina 1 β
- IL-6** – Interleucina 6
- iNOS** – Inducible nitric oxide synthase
- LPS** – Lipopolisacarídeo
- MMP+** - 1-metil-4-fenil-1236-tetrahidropiridina
- MRI** – Magnetic Resonance Imaging
- mTOR** – Mammalian target of rapamycin
- NE** – Norepinefrina
- NEMs** – Neurônios Espinhosos Médio
- NFKB** – Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
- PET** – Tomografia por Emissão de Póstron
- ROS** – Reative oxygen species
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- SNE** – Sistema Nervoso Entérico
- SNP** – Sistema Nervoso Periférico
- SN_{pc}** – Substância negra *pars compacta*
- SN_{pr}** – Substância negra *pars reticulada*
- SSRI** – Seletive Serotonin Reuptake inhibitors
- TNF-α** – Fator de Necrose Tumoral α
- UKPDS** – UK Prospective Diabetes Study
- WHO** – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 DOENÇA DE PARKINSON: ETIOLOGIA E SINTOMAS.....	18
3.2 CONTROLE CEREBRAL DOS MOVIMENTOS ESQUELÉTICOS VOLUNTÁRIOS: NÚCLEOS DA BASE	19
3.3 O ENVOLVIMENTO DO HIPOCAMPO NA DOENÇA DE PARKINSON	24
3.4 NEUROBIOLOGIA DA DEPRESSÃO NA DOENÇA DE PARKINSON.....	26
3.5 MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON: ROTENONA	28
3.6 METFORMINA E DOENÇA DE PARKINSON – BASES PRÉ-CLÍNICAS PARA ESTA ASSOCIAÇÃO	29
3.7 FLUOXETINA E DOENÇA DE PARKINSON – BASES PRÉ-CLÍNICAS PARA ESTA ASSOCIAÇÃO	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1 ARTIGO 1.....	34
4.2 ARTIGO 2.....	69
5. CONCLUSÃO	81
6. SÚMULA CURRICULAR	82
7. REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada pelo desbalanceamento entre atividade colinérgica e dopaminérgica no estriado e regiões corticais, devido à morte progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) (SURATHI et al., 2016). No processo da DP, aglomerados citoplasmáticos de α -sinucleína, aumento de estresse oxidativo e maior reatividade glial levam à neuroinflamação com ativação do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NFkB) e consequente expressão de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral (Do inglês, *Tumor Necrosis Factor* ou TNF- α), IL1- β (Interleucina 1 β) e IL-6 (Interleucina 6) (CHO et al., 2009; GUAN, 2017; LORENZL et al., 2002).

Os sintomas motores clássicos da DP são tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e alterações na postura e no equilíbrio, enquanto que a depressão é o principal sintoma não motor (AARSLAND et al., 2002; BHATTACHARJEE et al., 2018; FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009; VAN LAAR; SAMAY, 2004).

Cerca de 30-40% dos pacientes com DP tem depressão contribuindo para o agravamento da perda da qualidade de vida desses pacientes. Dentre os poucos que tratam a depressão, metade continuam depressivos, sugerindo ineficácia do tratamento (BHATTACHARJEE et al., 2018; FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009). Portanto, é necessário investigar alternativas terapêuticas em modelos animais para tratar a depressão em pacientes parkinsonianos.

Atualmente 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 (ROS) (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 , hsCRP e sIL-2R (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). Camundongos C57BL/6 com DP induzida por 1-metil-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) apresentam comportamento depressivo, prejuízos no desempenho da memória recente e aumento dos marcadores de inflamação COX-2 (Ciclo-oxigenase 2) e iNOS (do inglês, *Inducible nitric oxide synthase*) no estriado, além dos sintomas motores clássicos da DP (SAMPAIO, 2018).

Os déficits cognitivos são comuns na DP e podem progredir para demência em 15% a 20% dos pacientes (SCHRAG, 2006). O hipocampo é a estrutura cerebral que participa dos processos de aprendizagem e memória, bem como do humor e emoções. Deficiências na neurogênese do hipocampo têm sido sugeridas como o possível mecanismo fisiopatológico subjacente aos sintomas depressivos da DP, e tem atraído um crescente interesse na pesquisa sobre o papel do hipocampo nos comportamentos de medo e cognição (CAMPOS et al., 2013). Em cérebros post-mortem de pacientes com DP foram encontradas diminuição da proliferação neuronal na zona subventricular e zona subgranular do hipocampo (HÖGLINGER et al., 2004).

A metformina, um hipoglicemiante utilizado no tratamento da diabetes mellitus, atualmente distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, ativa a Proteína Kinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK). Diversos estudos demonstram que a metformina possui atividade anti-inflamatória por inibir o NFkB e atividade neurogênica, sugerindo que a metformina pode ter implicações em doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias (PEIXOTO et al., 2017). Estudos *in vivo* e *in vitro* de DP induzidos por Rotenona e MPTP, ambos inibidores do complexo mitocondrial I, mostraram que metformina inibiu neuroinflamação, reduzindo reatividade microglial, induziu autofagia atenuando o dano neuronal causado por aglomerados de α -sinucleína, e reduziu os níveis de ROS (LU et al., 2016).

Por sua vez, o tratamento crônico com metformina produziu efeitos antidepressivos em pacientes e em modelos animais (GUO et al., 2014; SHIVAVEDI et al., 2017). KHEDR et al. (2018) também concluíram que a metformina potencializou os efeitos da fluoxetina em ratos que foram submetidos

à estresse crônico e dieta rica em lipídios. A inibição do mTOR, um componente catalítico de sinalização celular envolvido na autofagia, que é inibido pela AMPK, melhorou significativamente o comportamento depressivo em modelo de DP com 6-OHDA (KHEDR et al., 2018; PEIXOTO et al., 2017).

A elevada taxa de depressão em pacientes com a doença de Parkinson e a pouca eficácia do tratamento da depressão requer mais investigação e proposição de fármacos alternativos aos fármacos atualmente empregados para o tratamento do sintoma depressivo na DP. Existe ainda uma lacuna sobre o papel do hipocampo e estriado sobre o comportamento depressivo e demência na DP, portanto, o presente projeto visa avaliar as vias de sinalização celular da neuroinflamação, cognição e depressão após tratamento com metformina, associado ou não à fluoxetina, em modelos experimentais de DP induzido por rotenona. Além disso, uma vez que a metformina e fluoxetina são fármacos amplamente utilizados, a contribuição da avaliação dos efeitos em conjunto desses fármacos sobre a Doença de Parkinson pode ser uma estratégia terapêutica benéfica de reposicionamento desses fármacos no tratamento de sintomas motores, cognitivos e depressivos da DP.

Portanto, a ativação de AMPK pela metformina pode promover a autofagia pela inibição do mTOR no modelo da DP com características depressivas, além de reduzir a inflamação, o déficit cognitivo e os sintomas motores no modelo da Doença de Parkinson.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da metformina, associada ou não, ao inibidor seletivo da recaptação de serotonina, fluoxetina, sobre as vias de sinalização da autofagia, neuroinflamação e sintomas depressivos e motores em modelo da doença de Parkinson.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ação da metformina, associada ou não à fluoxetina, sobre:

- o comportamento depressivo em camundongos com DP;
- os sintomas motores em modelo de DP;
- a ativação de astrócitos e micróglia no hipocampo de camundongos com DP;
- a morte de neurônios e a neurogênese no hipocampo em modelo de DP;
- expressão das proteínas mTOR e ATG5 (marcador de autofagia) no hipocampo de camundongos com DP

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DOENÇA DE PARKINSON: ETIOLOGIA E SINTOMAS

A Doença de Parkinson (DP) é uma patologia crônica do sistema nervoso central (SNC) que afeta cerca de 1% da população mundial acima de 65 anos de idade e é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, no Brasil estima-se que cerca de 200 mil pessoas sofram com essa patologia (Ministério da Saúde, 2014). A DP é também conhecida como *paralisia agitante*, e decorre principalmente da destruição progressiva dos 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; STORSTEIN, 2017). A etiologia da DP tem sido objeto de intensa investigação e há muito tempo permanece obscura, atualmente a literatura sugere que, além de fatores genéticos, a exposição a toxinas ambientais e condições como a Diabetes mellitus e obesidade podem aumentar o risco de desenvolver a DP que, devido à resistência à insulina cerebral, pode comprometer a via de sinalização da dopamina (BRUDEK, 2019; FIORY et al., 2019).

Além do Sistema Nervoso Central (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. Um dos principais achados neuropatológicos de DP são os agregados de α -sinucleína, formando os “corpos de Lewy” na SNpc, que podem também ser encontrados no intestino como resultado de processos inflamatórios, e que por sua vez, podem alcançar o cérebro. Desta forma, a composição da microbiota intestinal também pode influenciar no desenvolvimento da DP (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; KESSEL, S. P. V., EL AIDY, 2019). Além dos neurônios dopaminérgicos, os corpos de Lewy também podem ser encontrados em várias partes do cérebro como hipotálamo, tronco cerebral e hipocampo (EMAMZADEH, 2017).

Clinicamente, a DP caracteriza-se por: (1) sintomas motores como rigidez de grande parte da musculatura do corpo, dificuldade intensa de iniciar movimentos conhecido por *acinesia*, instabilidade postural, levando ao desequilíbrio e quedas frequentes, e tremor nas extremidades, mesmo quando a pessoa está em repouso; e (2) sintomas não-motores como disfunção gastrointestinal, distúrbios do

sono, déficit cognitivo e depressão (GUYTON e HALL, 2011).

3.2 CONTROLE CEREBRAL DOS MOVIMENTOS ESQUELÉTICOS VOLUNTÁRIOS: NÚCLEOS DA BASE

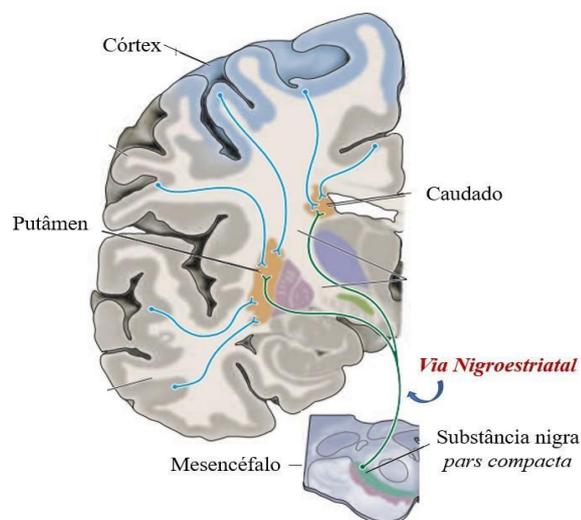
O controle motor dos músculos esqueléticos é comandado por diferentes regiões do SNC, as quais se comunicam hierarquicamente entre si, são elas: córtex pré-motor e córtex motor primário, os núcleos da base, o cerebelo e a medula espinhal (PURVES et al., 2008). Os núcleos da base estão envolvidos em funções motoras, cognitivas e mnemônicas e têm função integrada às áreas motoras do córtex e ao cerebelo sobre o controle motor. Mais especificamente os núcleos da base auxiliam no planejamento e controle de padrões complexos de movimentos musculares, controlando as intensidades relativas dos movimentos distintos, direção e sequência de múltiplos movimentos sucessivos e paralelos como caminhar, dirigir e escovar os dentes, além de controlar funções e habilidades cognitivas referentes a ações como atenção, controle de interferências, alternância de conceitos, tomada de decisões e memória operacional (GUYTON e HALL, 2011).

O circuito dos núcleos da base é composto pelo estriado, formado pelos núcleos caudado e putâmen, o segmento externo ou lateral do globo pálido, segmento interno ou medial do globo pálido, substância negra (*pars compacta* e *pars reticulada*) e núcleo subtalâmico (**Figuras 1 e 2**). A principal caracterização molecular da Doença de Parkinson é a depleção de dopamina (DA) estriatal resultante da morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc). Esta perda celular leva a uma neurotransmissão anormal nos núcleos da base (PARENT; HAZRATI, 1995).

A depressão é o principal sintoma neuropsiquiátrico associado à DP, afetando cerca de 7–76% dos pacientes parkinsonianos e é considerado um sintoma inicial da DP, dado que de acordo com alguns estudos os sintomas depressivos surgem cerca de 10 anos antes do aparecimento dos sintomas motores e, portanto, do diagnóstico clínico (CARRARINI et al., 2019; LEENTJENS et al., 2003; SHIBA et al., 2000; VEAZEY et al., 2005). Alterações estruturais e funcionais do cérebro associadas à depressão podem ser identificadas utilizando-

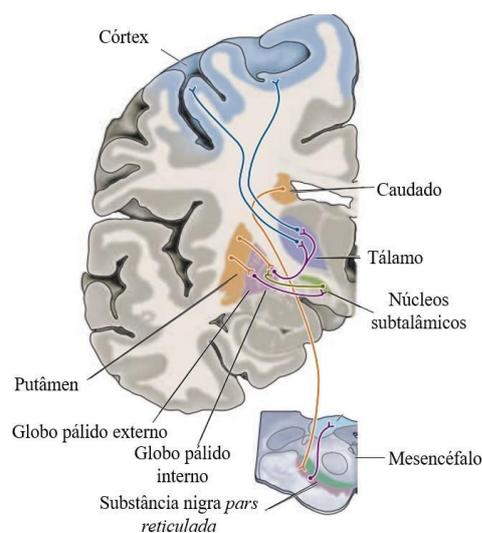
se exames por Imagens de Ressonância Magnética (MRI) e Tomografia por Emissão de Póstron (PET) utilizando o 18F-fluorodeoxiglicose. O estudo utilizando PET demonstrou que a atividade metabólica no núcleo caudado e na região orbital inferior do lobo frontal foi significativamente menor nos pacientes com depressão e DP em comparação com os pacientes com DP que não tinham depressão. Esta diminuição do metabolismo e, portanto, da atividade nessas regiões, foi diretamente proporcional ao escore de depressão (MAYBARG et al, 1990).

Figura 1 - Aferências córtex Núcleos da base.



Fonte: Purves et al (2012) - Adaptado por Mendonça (2021).

Figura 2 - Eferências Núcleos da base córtex



Fonte: Purves et al (2012) - Adaptado por Mendonça (2021).

Existem duas vias de funcionamento desse circuito que controlam o movimento: a via direta (que permite o movimento) e a via indireta (que inibe o movimento) (**Figuras 4 e 5**). A dopamina (DA) sintetizada na SN_{pc} 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 SN_{pr}, essas duas estruturas que também são gabaérgicas, são então inibidas, desinibindo assim os neurônios glutamatérgicos talâmicos, que projetam neurônios excitatórios para o córtex (**Figura 4**).

O resultado dessa sequência de ativação inibição ativação, é a realização do movimento. **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 de ativação inibição ativação inibição é a não realização do movimento (**figura 5**) (PURVES et al., 2008). Finalmente, os núcleos da base estabelecem o padrão para a facilitação de movimentos voluntários e inibição simultânea de movimentos concorrentes ou interferentes (SIMONYAN, 2019).

Dois componentes cruciais para a circuitaria dos núcleos da base são: a SN_{pc} e o neurotransmissor sintetizado por ela, a dopamina. A SN é também um núcleo, está localizado no mesencéfalo posterior às fibras *crus cerebri* do pedúnculo cerebral, e pode ser funcional e morfológicamente dividida em duas regiões, a *pars compacta* (SN_{pc}), contendo neurônios dopaminérgicos, e a *pars reticulata* (SN_{pr}), cujos neurônios produzem o ácido gama- amino- butírico (GABA), chamados então de neurônios gabaérgicos. A SN_{pc}, como o próprio nome sugere, é uma região densamente compactada. Em dissecções anatômicas macroscópicas, o SN_{pc} aparece na cor escura devido ao alto conteúdo de neuromelanina que se forma a partir do precursor L-DOPA na síntese da. Essa característica é a origem do nome da região que significa "substância escura" (**Figura 3**).

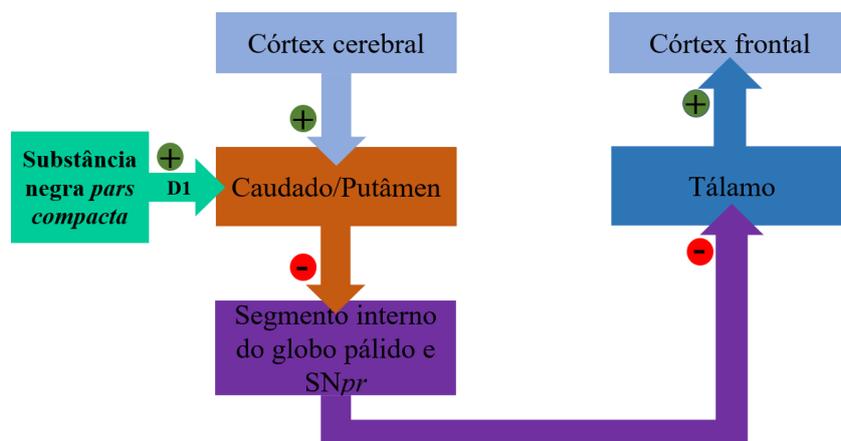
Figura 3 - Corte transversal do cérebro evidenciando a substância negra (SN)



Fonte: Centro de estudo de Medicamentos da UFMG (CEMED) <https://cemedmg.wordpress.com>

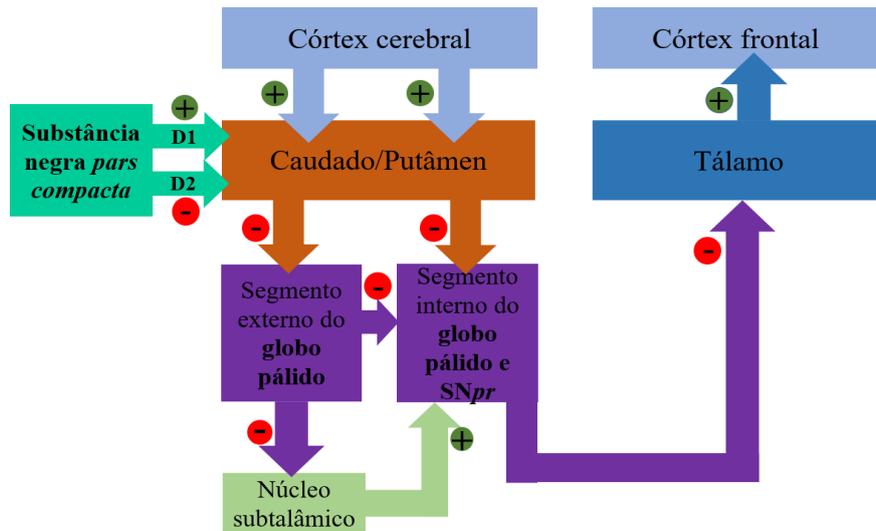
A SN_{pc} possui projeções dopaminérgicas para o estriado, onde realizam sinapses em duas populações distintas de receptores dopaminérgicos, receptores da família D1 (ativam a via direta do movimento) e neurônios receptores da família D2 (ativam a via indireta do movimento), sendo assim, as projeções dopaminérgicas da SN_{pc} para o estriado, formando a “via nigroestriatal”, regulam o fluxo de informações dos núcleos basais referentes aos movimentos voluntários (**Figuras 4 e 5**).

Figura 4 - Via Direta dos núcleos da base



Fonte: Purves et al, 2012.

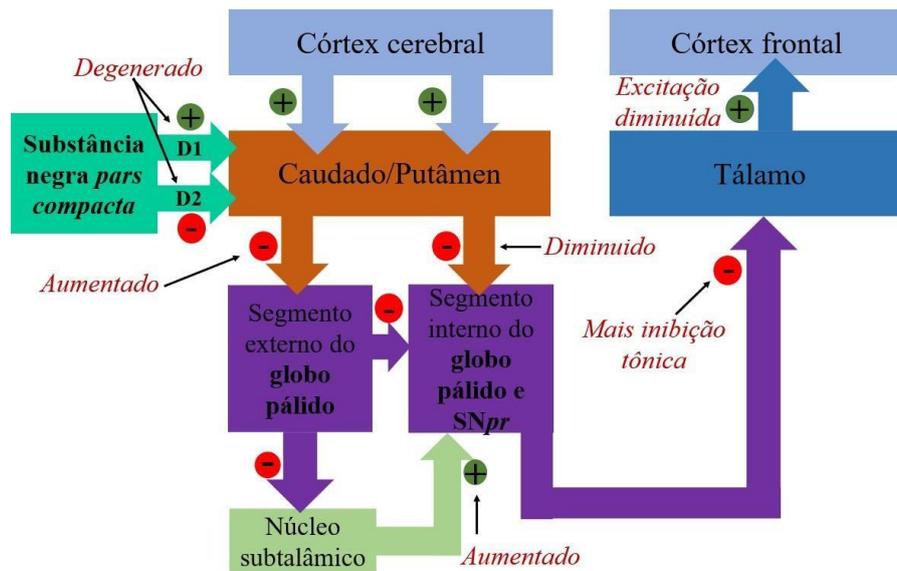
Figura 5 - Via indireta dos núcleos da base



Fonte: Purves et al (2012)

As influências dopaminérgicas sobre os neurônios espinhosos são complexas, mas no geral, neurônios nigrais fornecem estímulos excitatórios no estriado mediados por receptores dopaminérgicos do tipo D1 e entradas inibitórias mediadas por receptores do tipo D2. Como as ações das vias diretas e indiretas na saída dos gânglios da base são antagônicas, essas diferentes influências das conexões nigroestriatais produzem o mesmo efeito, ou seja, uma diminuição no fluxo inibitório dos gânglios da base. Fisiologicamente, ambos os efeitos dopaminérgicos servem para diminuir o fluxo inibitório dos gânglios da base e, assim, aumentar a excitabilidade dos neurônios motores superiores (**Figura 6**). Com a morte dos neurônios da SNpc, o que ocorre na doença de Parkinson, o fluxo inibitório dos gânglios basais é anormalmente alto, e a ativação talâmica da parte superior de neurônios motores no córtex motor são, portanto, menos prováveis de ocorrer, o que resulta na acinesia característica da DP, ou seja a dificuldade de realizar o movimento, por isso a DP é conhecida também como um distúrbio do movimento hipocinético (PURVES et al., 2008).

Figura 6 - Circuito alterado na DP



Fonte: Purves et al (2012)

3.3 O ENVOLVIMENTO DO HIPOCAMPO NA DOENÇA DE PARKINSON

O hipocampo é a estrutura cerebral que participa dos processos de aprendizagem e memória, bem como do humor e emoções. Os sintomas depressivos na DP parecem estar relacionados a processos degenerativos e inflamatórios também no hipocampo. Resultados experimentais e em cérebros de pacientes parkinsonianos mostraram que o hipocampo é uma das estruturas fora do sistema nigroestriatal que são afetadas na DP (BONATO et al., 2018). Em cérebros post-mortem de pacientes com DP foram encontradas diminuição da proliferação neuronal na zona subventricular e zona subgranular do hipocampo. Achados semelhantes têm sido observados em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP.

O hipocampo tem sido alvo de pesquisas relacionadas à DP, principalmente pelo seu envolvimento em sintomas neuropsiquiátricos. Anatomicamente, o hipocampo é subdividido em regiões ventral e dorsal de acordo com suas funções. A região ventral do hipocampo de roedor, que corresponde a porção anterior do hipocampo primata está principalmente relacionada à resposta ao estresse e comportamento emotivo, enquanto a região dorsal do roedor, que corresponde à porção posterior do hipocampo primata, é mais relacionada a processos cognitivos (FANSELOW; DONG, 2010; WALKER; NILSSON; JONES, 2013).

Em um modelo animal de DP induzido por 6-hidroxidopamina, a inibição da Potenciação de Longo Prazo (LTP) em neurônios da região CA1 do hipocampo foi associada a uma concentração reduzida de dopamina no hipocampo e com comprometimento da aprendizagem dependente da dopamina. Esses mesmos efeitos hipocámpais foram recapitulados em um modelo genético de Doença de Parkinson induzido por mutação na alfa-sinucleína (COSTA et al, 2012; TOFARIS et al, 2006). Em ambos os modelos, uma alteração na transmissão glutamatérgica foi observada, o que pode ter causado esse defeito sobre a LTP no hipocampo (CALABRESE et al., 2014).

Alterações serotoninérgicas nos gânglios da base e estruturas límbicas foram relacionadas com fadiga, outro sintoma não motor do DP. Da mesma forma, além da dopamina, a depressão parece estar relacionada também à disfunção serotoninérgica hipocámpal, como retrata o estudo de Ballanger e colaboradores (2012), que constataram, através de um estudo de PET, que há menor tônus serotoninérgico no hipocampo de pacientes parkinsonianos depressivos em relação aos não depressivos (BALLANGER et al, 2012).

O hipocampo se torna particularmente importante para os sintomas cognitivos e psiquiátricos da DP, um importante nicho de neurogênese no cérebro (EISCH e PETRIK, 2012). Um estudo experimental utilizando um modelo animal transgênico da doença de Parkinson mostrou que a expressão da alfa-sinucleína mutante em neurônios do giro denteado prejudicou gravemente a neurogênese (KOHL et al, 2012). Portanto, a ativação de células-tronco hipocámpais no cérebro adulto pode ser uma estratégia para tratar tais sintomas. E neste sentido, fatores neurotróficos como o Fator Neurotrófico Derivado do cérebro (BDNF) e o Fator Neurotrófico Derivado de Glia (GDNF) são importantes para estimular a neurogênese. Além disso, o BDNF é um importante regulador da transmissão sináptica e da potenciação de longo prazo no hipocampo e em outras regiões do cérebro e pode contribuir para a formação de alguns tipos de memória. O GDNF é um fator de sobrevivência neuronal que exerce ações neuroprotetoras em regiões CA1 / CA3 do hipocampo que são expostas a excitotoxicidade mediada por NMDA (LEAL, COMPRIDO e DUARTE, 2013; BOSCIA et al, 2009).

Em modelos animais de DP, o hipocampo também é local de inflamação. O hipocampo é rico em microglia e é uma região que se interconecta com várias outras estruturas cerebrais. Um aumento de microglia reativa foi encontrado nas

regiões hipocampais CA1, CA3 e Hilus de ratos 23 dias após a infusão aguda de 6-OHDA, o que foi acompanhado por comportamento semelhante à depressão (BONATO et al., 2018).

3.4 NEUROBIOLOGIA DA DEPRESSÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

A DP e a depressão compartilham alterações moleculares, tais como a disfunção monoaminérgica, a neuroinflamação e o estresse oxidativo.

Disfunção monoaminérgica: A neurotransmissão dopaminérgica também tem sido implicada no surgimento de sintomas depressivos. Considerando que os sintomas motores só aparecem clinicamente quando cerca de 70% dos neurônios dopaminérgicos na SNpc foram destruídos, os sintomas depressivos parecem ser mais sensíveis à degeneração dopaminérgica precoce. Foi relatado que os sintomas ansiosos e 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, a perda neuronal dopaminérgica na SNpc foi cerca de sete vezes maior em pacientes com DP deprimidos em comparação com os não deprimidos (FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009), corroborando que a depressão do DP evolui com uma neurodegeneração dopaminérgica.

Além da dopamina, 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 de PET, utilizando um ligante transportador de dopamina e noradrenalina, mostrou perda significativa em estruturas límbicas, como estriado ventral e amígdala de pacientes com DP, o que foi associado à depressão (REMY et al., 2005). Já a disfunção serotoninérgica, bem descrita na depressão, foi também apontada como um importante fator mediador para a 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.

Neuroinflamação: 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 (ANDERSON; MAES, 2014; BERNAL-PACHECO et al., 2012; 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 , IL1- 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 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).

Estresse oxidativo: 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.

3.5 MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON: ROTENONA

Sabe-se que a lesão dos neurônios dopaminérgicos pode ser induzida através da administração de neurotoxinas, como 6-hydroxydopamine (6-OHDA) e 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Além disso, foi relatado que produtos químicos agrícolas têm efeitos prejudiciais para os neurônios e que, associados à predisposição genética, aumentam o risco de PD. Essas descobertas permitiram que grupos de pesquisa desenvolvem-se diferentes modelos de DP usando neurotoxinas (CHIA, TAN E CHAO, 2020).

Estudos epidemiológicos e análise histopatológica *post-mortem* em cérebros humanos têm mostrado que a exposição a pesticidas está associada a um maior risco para o desenvolvimento desta doença, e essa influência ambiental tem despertado bastante interesse da comunidade científica, nas últimas décadas (KANTHASAMY *et al*, 2005; DINIS-OLIVEIRA *et al*, 2006; NISTICO *et al*, 2011). A rotenona é um composto natural encontrado em plantas que têm sido utilizada como inseticida, apresenta alta lipossolubilidade podendo penetrar facilmente a barreira hematoencefálica. Devido à sua ação inibitória sobre o complexo mitocondrial I da cadeia respiratória, a rotenona aumenta os níveis de ROS (BISBAL e SANCHEZ, 2019).

Em animais tratados com rotenona, características relacionadas à DP foram observadas, como déficits motores, depleção de catecolaminas e perda de células dopaminérgicas nigrais, além de inclusões de α -sinucleína formando os corpos de Lewy foram observadas nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes

(INDEN et al, 2011). Com a capacidade para re- produzir as principais características patológicas da DP humana, a rotenona constitui uma ferramenta valiosa como modelo experimental na pesquisa de base e aplicada.

As principais vantagens da rotenona em relação às outras neurotoxinas é, primeiramente, a ação direta sobre a inibição da respiração celular nos neurônios, sem necessidade de metabolização por astrócitos como é o caso do MPTP, além de atravessar facilmente a BHE como já citado, sendo possível sua administração de forma sistêmica, o que não ocorre com a 6-OHDA, que não é lipossolúvel, sendo necessário sua inoculação diretamente na região cerebral (SAUER e OERTEL, 1994). Sendo assim, dentre as toxinas mais utilizadas para este fim, a rotenona representa a forma de neurodegeneração mais próxima da DP humana.

3.6 METFORMINA E DOENÇA DE PARKINSON – BASES PRÉ-CLÍNICAS PARA ESTA ASSOCIAÇÃO

A metformina (N, N-dimetilbiguanida), é originalmente derivada da galegina (iso- amileno guanidina), um derivado da guanidina encontrado na planta *Galega officinalis* também conhecida como “Lilás francês” (FORETZ et al, 2014). Nomeada comercialmente como Glifage®, Dimefor®, Gluformin® entre outras marcas, ou como medicamento genérico, a metformina é um medicamento anti-hiperglicemiante oral da classe das biguanidas (contendo dois anéis de guanidina ligados), amplamente utilizado para o tratamento da Diabetes Mellitus tipo II (DM-II), para a qual é recomendada como medicamento de primeira linha em diretrizes recentes de tratamento da American Diabetes Association (ADA) e European Association for the Study of Diabetes (EASD) (ANVISA - Bulário Eletrônico, 2018; Inzucchi et al, 2015). É também um dos antidiabéticos orais que constam na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde (WHO), e no Brasil, faz parte do programa Farmácia Popular do Ministério da Saúde . Além da sua eficácia no tratamento da DM-II, a metformina apresenta poucos efeitos colaterais e de baixa gravidade, e é um dos poucos antidiabéticos menos passíveis de causar hipoglicemia, além de reduzir o risco de comorbidades relacionadas ao DM-II, como doenças cardiovasculares e reduzir a mortalidade entre pacientes diabéticos como mostrou o estudo feito pelo grupo *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS), tais características fazem da metformina uma droga eficaz e segura.

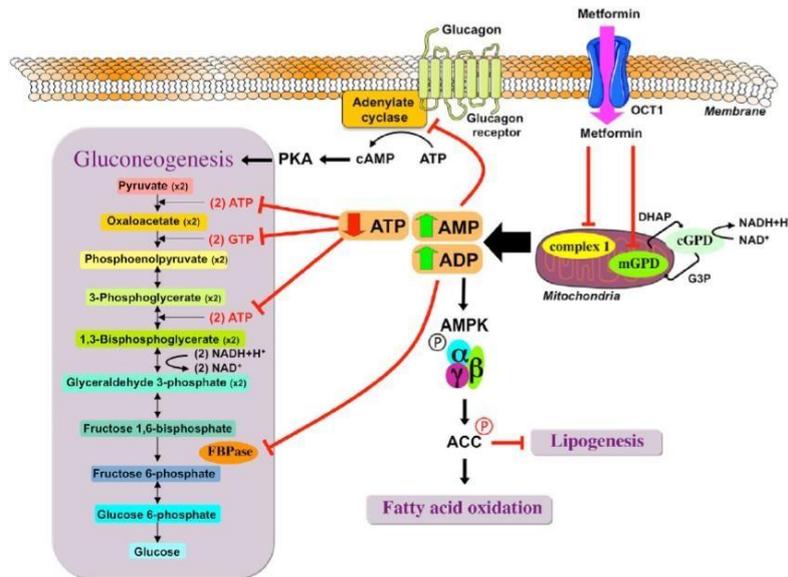
Apesar de sua longa história de uso clínico no tratamento da DM-II, o mecanismo de ação da metformina permanece relativamente desconhecido. Na literatura, é geralmente aceito que a ação modulatória mitocondrial induzida por metformina é responsável pela maioria dos seus efeitos pleiotrópicos (FORETZ et al, 2014). No ano de 2000, dois artigos relataram que a metformina diminui a respiração celular pela inibição leve e específica do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, não afetando outras etapas da maquinaria mitocondrial (EL-MIR et al., 2000).

Essa inibição resulta em uma queda de energia celular, reduzindo ATP e consequentemente aumentando a proporção AMP/ATP. O aumento do AMP ativa a Proteína Kinase ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK), um sensor crítico da homeostase de energia celular que integra múltiplas vias de sinalização para coordenar uma ampla gama de mecanismos compensatórios, protetores, e respostas poupadoras de energia (VIOLLET et al, 2012). No contexto da DM-II, a ativação da AMPK atua reduzindo a concentração sanguínea de glicose, hemoglobina glicada, triacilglicerol e colesterol (FUJITA E INAGAKI, 2017).

Estudos in vivo e in vitro de DP induzidos por Rotenona e MPTP, ambos inibidores do complexo mitocondrial I, mostraram que metformina inibiu neuroinflamação reduzindo reatividade microglial, induziu autofagia atenuando o dano neuronal causado por aglomerados de α -sinucleína, e reduziu os níveis de ROS (LU et al., 2016b). CHOI e colaboradores mostraram que MPTP induziu morte celular paralelamente à ativação de AMPK em neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, porém quando a AMPK foi superexpressa a morte celular foi atenuada, sugerindo que maior atividade da AMPK poderia ser um mecanismo de resiliência celular (CHOI et al, 2010).

É válido mencionar que a inibição da atividade do complexo 1 pela metformina é significativamente leve quando comparado à rotenona, um inibidor de referência desse mesmo complexo (EL-MIR et al., 2000). Além disso, de acordo com o trabalho de Batandier e colaboradores (2006), a metformina reduziu a produção de ROS mitocondrial por inibição seletiva do fluxo reverso de elétrons através do complexo I da cadeia respiratória, enquanto a rotenona desencadeia a produção de EROS por aumento do fluxo de elétrons para fora (BATANDIER et al, 2006).

Figura 7 - Principais mecanismos de ação da metformina



Fonte: Foretz et al (2014)

Alguns estudos também mostraram que o tratamento crônico com metformina produziu efeitos antidepressivos em pacientes e em modelos animais, sem contudo, haver uma proposição de mecanismos ou vias de neurotransmissores (GUO et al., 2014; SHIVAVEDI et al., 2017). KHEDR et al, também concluíram que a metformina potencializou os efeitos da fluoxetina (antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina- ISRS) em ratos que foram submetidos à estresse crônico e dieta rica em lipídios. Além disso, foi observado também que inibição do mTOR, um componente catalítico de sinalização celular envolvido na autofagia, que é inibido pela AMPK, melhorou significativamente o comportamento depressivo em modelo de DP com 6-OHDA (KHEDR et al., 2018; PEIXOTO et al., 2017). Possivelmente, as características depressivas da DP podem ser reduzidas através da ativação de AMPK pela metformina por promover a autofagia pela inibição do mTOR.

3.7 FLUOXETINA E DOENÇA DE PARKINSON – BASES PRÉ-CLÍNICAS PARA ESTA ASSOCIAÇÃO

A fluoxetina é o principal medicamento da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (do inglês, selective serotonin reuptake inhibitors ou SSRI) com eficácia clínica e perfil de segurança reconhecida no tratamento da depressão. O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos consiste em atuar no neurônio pré-sináptico inibindo especificamente a recaptação do neurotransmissor serotonina, aumento da disponibilidade sináptica de serotonina. Desde sua descoberta, outras moléculas que mimetizam seu mecanismo de ação foram desenvolvidas, dando início a uma nova era no tratamento da depressão. A fluoxetina também demonstrou utilidade no tratamento de outros distúrbios para os quais sua prescrição já foi aprovada (PEREZ-CABALLERO et al, 2014).

Efeitos neuroprotetores da fluoxetina também tem sido relatados em estudos pré-clínicos de DP. A administração sistêmica de Lipopolisacarídeo (LPS) é descrita como indutora de alterações semelhantes às que ocorrem na DP. CHUNG et al (2010) demonstraram que a fluoxetina reverteu degeneração de neurônios dopaminérgicos da SN, ativação microglial e estresse oxidativo causados pela administração de LPS em ratos. Os mesmos autores observaram os mesmos efeitos neuroprotetores em modelo de DP induzido por MPTP, neste modelo, a fluoxetina preveniu a degeneração induzida por MPTP de neurônios dopaminérgicos nigro-estriatais e aumentou os níveis de dopamina estriatal com a recuperação motora parcial. Isso foi acompanhado pela inibição da expressão transitória de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico sintase induzível e conseqüente dano oxidativo. Além dos efeitos *in vivo*, a fluoxetina também inibiu o dano neuronal dopaminérgico da neurotoxicidade de 1-metil-4-fenil-piridínio (MPP+) em co-culturas de neurônios mesencefálicos e micróglia (CHUNG et al, 2011). Em um modelo experimental induzido por rotenona, o pré-tratamento com Fluoxetina (10,0 mg / kg, i.p.) melhorou significativamente o sintoma de catalepsia e aumentou a atividade locomotora. Além de inibir a neurodegeneração mediada por rotenona por meio de apoptose neuronal mediada por caspase-3 (PENG et al., 2018). Por último, um tratamento combinado de fluoxetina com metformina foi mais eficaz do que a fluoxetina sozinha na melhora do comportamento depressivo de

ratos induzidos por estresse crônico, sugerindo que, a fluoxetina pode ter seus efeitos anti-depressivos potencializados por estratégias polifarmacológica (POGGINI et al., 2019).

Além desses estudos pré-clínicos, a fluoxetina também exerce efeitos benéficos em sintomas não-motores como depressão e déficit cognitivo em pacientes com DP, embora ainda apresente eficácia limitada (BOGGIO et al, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1

Efeitos da metformina e fluoxetina sobre neuroinflamação, autofagia, neurogênese e neuroplasticidade hipocampal em modelo de Doença de Parkinson induzido pela rotenona

Ingrid Prata Mendonça^{1,2}, Eduardo Duarte-Silva¹, Rodrigo Soares e Silva¹, Igor Henrique Rodrigues de Paiva^{1,2}, Alice Chevrollier Oriá^{1, 3}, Michel Gomes de Melo^{1,2}, Wilma Helena Oliveira¹, Christina Alves Peixoto^{1,4}.

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.

³Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para Saúde (PPGBBS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-PE) / Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Recife, PE, Brasil.

⁴Instituto de Ciência e Tecnologia de Neuroimunomodulação (INCT-NIM), Brasil.

*Endereço correspondente: Christina Alves Peixoto, Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-420.

Tel number: (55) 81 21012557. E-mail: christina.peixoto@fiocruz.br

Abstract: Cerca de 30-40% dos pacientes com Doença de Parkinson tem depressão contribuindo para o agravamento da perda da qualidade de vida. Dentre os pacientes que tratam a depressão, cerca de 50% não apresentam melhora significativa, devido à eficácia limitada do tratamento. No presente estudo, avaliamos os efeitos da metformina, associada ou não, à fluoxetina, sobre alterações moleculares

hipocampais em modelo da doença de Parkinson. 50 camundongos C57BL6 machos (8-12 semanas) foram previamente divididos em 5 grupos (n=10); (1) CONTROLE, (2) DP, (3) DP + MET, (4) DP + FLU, (5) DP + MET + FLU. induzidos à DP com 2,5 mg/Kg/dia de rotenona durante 20 dias, e tratados com metformina (200mg/Kg/dia) e fluoxetina (10 mg/Kg/dia) a partir do 5º dia de indução em diante, por via oral. Os animais foram submetidos ao teste do Rotarod, Teste de Preferência à sacarose (TPS) e Teste de Suspensão da Cauda (TSC), em seguida o cérebro foi retirado e o hipocampo foi dissecado para análises moleculares. Através de Imunohistoquímica e Imunofluorescência, demonstramos que a rotenona induziu comportamento tipo-depressivo e alterações hipocampais deletérias. Metformina e fluoxetina não só melhoraram o déficit motor, como também preveniram comportamento tipo-depressivo nos testes TPS e TSC. Além disso, reduziram reativação glial evidenciados pela diminuição dos níveis de IBA1 e GFAP e inibiram níveis de mTOR, induzindo autofagia, além de aumentar os níveis de ATG5. Os fármacos também aumentaram neurogênese e a sobrevivência neuronal evidenciado através do aumento de KI67 e Neu N, respectivamente, e reduziram a morte celular evidenciada pela diminuição dos níveis de caspase 3 e PARP1. Além disso, Metformina potencializou o efeito da fluoxetina sobre a neuroplasticidade através do aumento dos níveis de CREB-p e BDNF. Concluímos que metformina e a fluoxetina apresentam efeitos antiparkinsonianos e antidepressivos em modelo experimental de doença de Parkinson.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Depressão. Fluoxetina. Hipocampo. Metformina.

Introdução

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pelo desbalanceamento entre atividade colinérgica e dopaminérgica no estriado e regiões corticais, devido à morte progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) (SURATHI et al., 2016). No processo da DP, aglomerados citoplasmáticos de α -sinucleína, aumento de estresse oxidativo, autofagia prejudicada e maior reatividade glial levam à neuroinflamação com ativação do Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF- κ B) e consequente expressão de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de

Necrose Tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor ou TNF- α) IL1- β e IL-6 (LORENZL et al., 2002; CHO et al., 2009; BEAR, CONNORS e PARADISO, 2017). Os sintomas motores clássicos da DP são tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e alterações na postura e no equilíbrio, enquanto que a depressão é o principal sintoma não motor (VAN LAAR e JAIN, 2004; AARSLAND et al, 2002; BHATTACHARJEE, 2018).

Cerca de 30-40% dos pacientes com DP tem depressão contribuindo para o agravamento da perda da qualidade de vida desses pacientes. A patogênese da depressão não se restringe a alterações da sinalização monoaminérgica, mas inclui distúrbios do sistema endócrino e imunológico, excitotoxicidade do glutamato, processo de autofagia anormal e ativação microglial com aumento de citocinas pró-inflamatórias (DETKA et al, 2013; Gassem e Rein, 2019). Estudos clínicos indicam que tanto a depressão pode induzir processos inflamatórios, como a inflamação pode induzir episódios depressivos (MCNAMARA and LOTRICH, 2012; MILLER et al., 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 , proteína C reativa de alta sensibilidade (do inglês, high-sensitivity C-reactive protein ou hsCRP) e Receptor de IL-2 solúvel (do inglês soluble IL-2 receptor ou sIL-2R) (Wang, 2016). Um estudo experimental utilizando camundongos C57BL/6 em um modelo de DP mostrou o comportamento depressivo dos animais, prejuízos no desempenho da memória recente e aumento dos marcadores de inflamação COX-2 e TNF- (Yan et al, 2020).

A metformina, um hipoglicemiante utilizado no tratamento da diabetes mellitus, apresenta atividade anti-inflamatória por inibir o NF- κ B além de induzir atividade neurogênica, sugerindo que a metformina pode ter ação terapêutica em doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias (OLIVEIRA WH et al, 2016; PEIXOTO et al., 2017; OAKHILL, ARNOLD et al., 2014; AHMED, et al., 2017). A fluoxetina é um fármaco pertencente à classe de inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) e também apresenta efeitos anti-inflamatório e neurogênico. Os ISRS são os medicamentos mais comumente prescritos para o tratamento da depressão e de vários transtornos de ansiedade. Embora ações dos ISRS a nível molecular e celular ainda permanecem pouco compreendidas, diversos trabalhos sugerem que os SSRI's exercem sua atividade comportamental em roedores por

meio de mudanças celulares e moleculares no hipocampo bem como em outras estruturas cerebrais (Santarelli et al., 2003; Airan et al., 2007; Surget et al., 2008, Wang et al., 2008). Além disso, estudos mostram que um tratamento combinado de metformina e fluoxetina foi mais eficaz do que a fluoxetina isolada na melhora do fenótipo depressivo em modelos animais de depressão induzidos por estresse crônico de contenção e dieta rica em lipídeos, através do aumento da expressão gênica de fatores tróficos e aumento da potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo (Poggini et al, 2019; Kedr et al, 2018).

Dentre os pacientes parkinsonianos que tratam a depressão, cerca de 50% não apresentam melhora significativa, devido à eficácia limitada do tratamento disponível (BHATTA-CHARJEE, 2018; FRISINA, 2009). Sendo assim, é necessário desenvolver alternativas terapêuticas para tratar a depressão em pacientes com DP. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da metformina, associada ou não, à fluoxetina, sobre alterações moleculares hipocâmpais em modelo da doença de Parkinson.

Metodologia

Animais

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 (8 semanas) foram obtidos do biotério de criação animal do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fundação Oswaldo Cruz–PE, Brasil). Os animais foram acondicionados em microisoladores, mantidos à temperatura de 18- 22°C e fotoperíodo claro/escuro de 12 horas, com acesso à água autoclavada e comida *ad libitum*. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEUA 140/2019) e realizados em concordância com as normas e diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

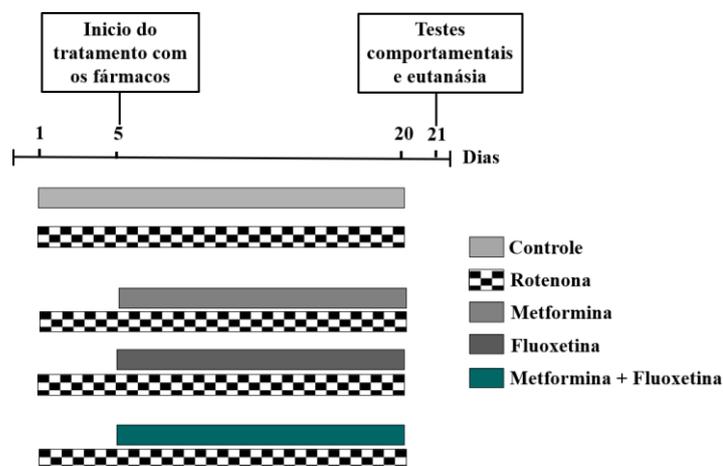
Delineamento experimental

Inicialmente, foi realizado um estudo para identificar com quantos dias de indução os animais desenvolveriam comportamento tipo-depressivo. O estudo piloto foi conduzido com dois grupos experimentais: *controle* (n=10) e *Rotenona*

($n=10$). O grupo controle foi tratado com solução veículo (90% de óleo de girassol + 10% de DMSO) diariamente; o grupo rotenona foi induzido com rotenona diluída em solução veículo na concentração de 2,5 mg/Kg/dia, a qual foi escolhida baseada em estudos anteriores de modelo experimental em roedores (Bassani et al, 2014; Morais et al, 2012; Zaminelli et al, 2014;). Os animais foram submetidos aos testes Rotarod, Suspensão da cauda e Preferência de sacarose no 5º, 10º, 15º e 20º dia de indução. Sendo, o comportamento depressivo observado nos animais no 20º dia de indução (resultados não mostrados).

Estabelecido o tempo de indução, 50 animais foram subdivididos em 5 grupos experimentais ($n = 10$ /grupo) conforme a **figura 8**: (1) *Controle* - animais submetidos à solução veículo por via subcutânea; (2) *Rotenona* - animais induzidos com Rotenona por via subcutânea; (3) *Rotenona + Metformina* - animais induzidos com rotenona por via subcutânea e metformina por via oral; (4) *Rotenona + Fluoxetina* - animais induzidos com rotenona por via subcutânea e fluoxetina por via oral; (5) *Rotenona + Metformina e Fluoxetina* – animais induzidos com rotenona por via subcutânea e metformina por via oral. Os fármacos metformina e fluoxetina foram administrados por 15 dias consecutivos por via oral na dose de 200 mg/Kg/dia e 10mg/Kg/dia, respectivamente, iniciando no 5º dia de indução com rotenona. Todos os grupos foram submetidos aos testes do Rotarod (avaliação decomportamento tipo-Parkinson), suspensão da cauda e preferência à sacarose (avaliação de comportamento tipo-depressivo).

Figura 8 - Delineamento experimental do estudo.



Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Rotarod

O teste da barra rotatória ou Rotarod representa uma das principais e mais antigas abordagens de caracterização de disfunções motoras em modelos animais, trata-se de um teste que avalia a coordenação motora e o equilíbrio do animal pela sua capacidade de se manter sobre a haste cilíndrica que se move de forma rotatória numa velocidade constante ou acelerada por um determinado período de tempo (Resende-Pinto e Mi-Ko, 2012). O protocolo utilizado nesse estudo foi baseado no trabalho de Liu e colaboradores (2015) com algumas adaptações. O aparato utilizado consiste em quatro divisórias para quatro animais e a barra cilíndrica. Os animais foram inicialmente habituados à barra giratória por 5 min no dia anterior ao teste em velocidade constante de 5 rpm. No 20º dia os animais foram habituados por 60 minutos na sala de testes, em seguida foram colocados na haste giratória, e o protocolo foi realizado no modo acelerado dos níveis de velocidade (5 a 37 rpm) do aparelho. Os animais permaneceram sobre a haste por um período máximo de 300s, nesse período foi registrada a latência para queda, a qual refletiu o nível de comprometimento motor do animal (Liu *et al*, 2015).

Teste de preferência de sacarose (fenótipo tipo-anedonia)

No décimo oitavo dia os animais foram apresentados a duas garrafas de água em lados opostos da gaiola, uma contendo apenas água e outra contendo uma solução de sacarose à 2%, por um período de habituação de 24 h. Após esse período, os animais foram separados individualmente e novamente abastecidos com duas garrafas previamente pesadas com a mesma distribuição por mais 24h, durante esse período as garrafas foram trocadas de lado uma vez para evitar tendência do animal por uma das garrafas, ao fim desse período as garrafas foram novamente pesadas e o consumo foi estabelecido como a diferença de pesos das garrafas entre antes e depois do período de 24h (antes – depois), o percentual de consumo de sacarose foi calculado 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 consumo de sacarose (NASCIMENTO *et al*, 2020).

Teste de Suspensão da cauda (fenótipo tipo-desespero)

O teste da suspensão da cauda consiste em avaliar o comportamento “tipo-

desespero" o qual representa um endofenótipo da depressão induzida em animais. Neste teste, os animais são suspensos por suas caudas com fita adesiva, em uma posição que não pode escapar ou segurar em superfícies próximas, a falta de comportamento relacionado à fuga é considerada imobilidade. (Gould et al, 2012). Adaptamos o protocolo de Gould e colaboradores (2012), no qual os animais foram individualmente suspensos por suas caudas e habituados aquela posição por um minuto, em seguida permaneceram na mesma por mais 5 minutos onde foi contabilizado o tempo de imobilidade por um observador a 1m de distância. Após esse período total de 6 minutos, os animais foram devolvidos para suas respectivas caixas.

Imunohistoquímica

Após a aplicação dos anestésicos, os animais (n=3) foram perfundidos transcárdialmente com 20 ml de solução salina seguida de paraformaldeído (PFA) 4% (40 ml) em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS), pH 7,2. Em seguida, os cérebros dos animais foram removidos e pós-fixados durante a noite em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) em pH 7 (heptahidratado monobásico e fosfato de sódio dibásico; Sigma - Aldrich). As amostras foram desidratadas em várias etapas de lavagem com etanol (Insofar Chemical Co., RJ, Brasil), purificadas em xilol e incluídas em parafina (Merck, EUA). As seções (5µm) foram cortadas coronalmente usando o micrótomo RM 2035 (Reichert S, Leica) e montadas em lâminas de vidro, reidratadas e tratadas com tampão citrato 20 mM (em pH 6,0) a 100 ° C por 30 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂), e os cortes foram bloqueados com albumina sérica bovina 3% (BSA, fração V) (Miles, Naperville, IL, EUA) por 1 h em temperatura ambiente.

Os anticorpos policlonais primários usados para avaliar morte e sobrevivência neuronal no hipocampo foram anti- NeuN (Novus Biologicals - NBP177686) na diluição de 1: 100, anti-caspase-3 (Abcam - AB4051) na diluição de 1: 100 e anti-PARP-1 (Abcam - AB6079) na diluição de 1: 100. Para avaliação da reatividade glial hipocampal os anticorpos foram: anti-GFAP (Novus Biological, número de catálogo NB300- 141) a uma diluição de 1: 1000; anti-IBA (Wako, número de catálogo 016-20001) na diluição de 1: 500. Para avaliação da

neuroplasticidade hipocampal foram utilizados os anticorpos anti-p-CREB (Cell Signaling, número de catálogo 9198) a uma diluição de 1: 500 e anti-BDNF (ANT-010 Alomone labs)) a uma diluição de 1: 500. Para avaliação do acúmulo de sinucleína na substância negra de Tirosina Hidroxilase (AB152-Merk), na diluição de 1:500.

Todos os anticorpos foram incubados em tecidos durante a noite a 4 ° C. As seções foram incubadas com um anticorpo secundário conjugado com biotina por 1 h após a lavagem (DakoCytomation, Biotinylated Link Universal HRP; K0690, CA, EUA). As marcações foram reveladas por incubação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, em contraste com a hematoxilina de Carrazi, e montado em Entellan (Merck, número de catálogo: 1079610100, EUA). As imagens foram capturadas pelo microscópio (Leica ICC50 HD). Foram obtidas 8 imagens por grupo (n=3), a densidade óptica foi realizada utilizando o programa GIMP versão 2.6.11 (software GNU Image Manipulation Program, CNET Networks, Inc. Australia) e a contagem de células positivas foi realizada utilizando o programa ImageJ versão 1.52

Imunofluorescência

Para a avaliação do acúmulo de α - sinucleína, marcadores celulares de autofagia e de neurogênese, os cortes de parafina da SNpc foram incubados com um tampão de bloqueio (1 x TBS-T + 5% Albumina de soro bovino) durante 1 h. Em seguida os cortes foram primeiramente incubados com o anticorpo primário anti-Tirosina Hidroxilase (TH) (AB152-Merk) na diluição de 1:500, produzido em coelho, e posteriormente foram incubados com o segundo anticorpo primário anti-sinucleína (Santa Cruz - 53955) na diluição de 1:50 no tampão de diluição de anticorpo (1 x TBS-T + 3% Albumina de soro bovino) a 4° C overnight, para dupla marcação TH/ -sinucleína. Para avaliação da autofagia hipocampal os cortes foram incubados com anticorpos primários para p-mTOR (Abcam AB109268) na diluição de 1:40, e ATG5 (Abcam 228668) na diluição de 1:100; e o anti-KI67 (Abcam 15580) na diluição de 1:300. Os cortes foram então incubados com um anticorpo secundário anti-mouse (SIGMA- A0168) e anti-rabbit (Vector Laboratories) fluorescentes durante 2 h. Posteriormente, os cortes foram incubados com 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Invitrogen), na diluição de 1:200. para marcação nuclear durante 5 minutos, no escuro. As imagens foram capturadas

pelo microscópio de fluorescência (Zeiss MicroImaging GmbH) equipado com uma câmera (Zeiss AxioCam MRM), a densidade óptica e foi realizada utilizando o programa GIMP versão 2.6.11 (software GNU Image Manipulation Program, CNET Networks, Inc. Australia).

Análises Estatísticas

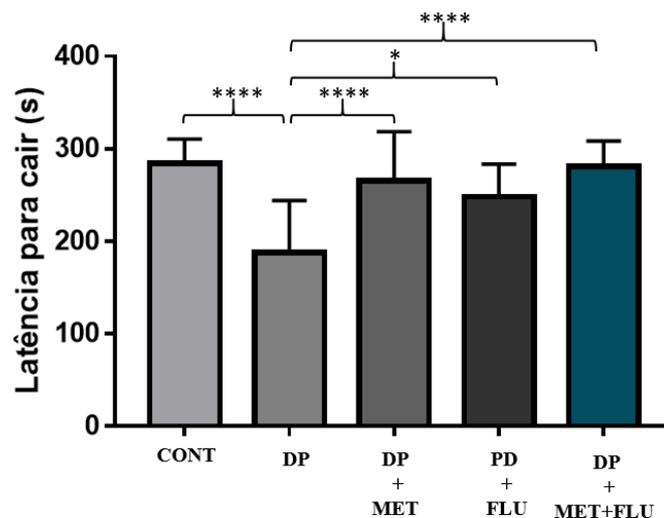
Os dados serão analisados através do ANOVA one-way, seguido de um teste a posteriori de Dunnett e Tukey usando o GraphPad Prismv.06.

Resultados

Tratamento com metformina e fluoxetina revertem os déficits motores produzidos pela administração de rotenona.

Como observado na **figura 9**, os animais induzidos à DP com rotenona apresentaram perda da coordenação motora avaliada pelo teste do rotarod (*Valor de $p < 0,0001$*). No entanto, os tratamentos com metformina isoladamente (*Valor de $p < 0,0001$*) ou em associação à fluoxetina (*Valor de $p < 0,0001$*), bem como a fluoxetina, em menor significância (*Valor de $p = 0,01$*), foram capazes de prevenir esse aspecto do comprometimento motor.

Figura 9 - Teste do Rotarod



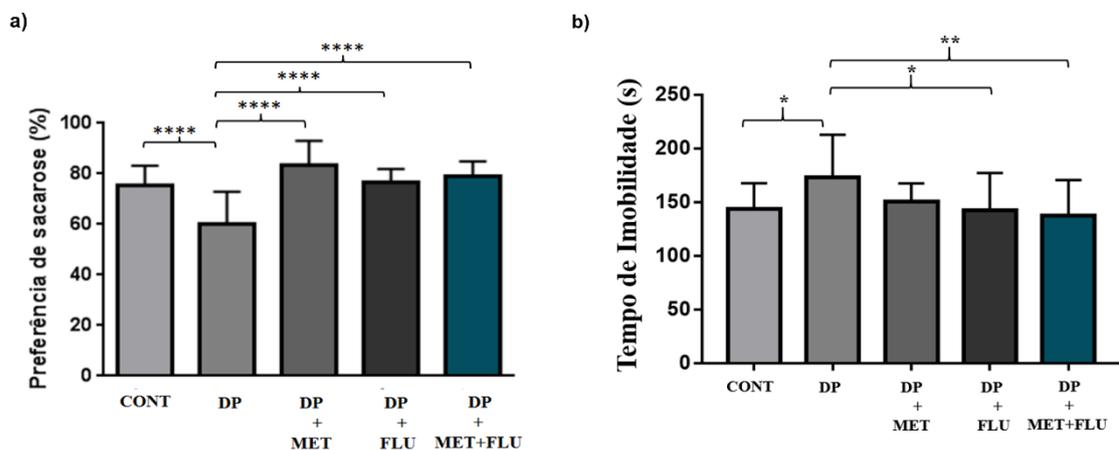
Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Tratamento com metformina e fluoxetina revertem o comportamento tipo-depressivo produzidos pela administração de rotenona.

Os animais induzidos à DP com rotenona apresentaram menor preferência de sacarose avaliada pelo Teste de Preferência de Sacarose (TPS) em relação ao controle (*Valor de $p < 0,0001$*). No entanto, os tratamentos com metformina (*Valor de $p < 0,0001$*) e fluoxetina (*Valor de $p < 0,0001$*) isoladamente ou em associação

(Valor de $p < 0,0001$) foram capazes de prevenir este comportamento, demonstrando uma ação tipo anti-depressiva (**Figura 10 (a)**). O mesmo padrão foi observado no Teste da Suspensão da cauda (TSC), no qual o tempo de imobilidade é proporcional ao comportamento depressivo do animal. No TSC, os animais induzidos com rotenona apresentaram maior tempo de imobilidade em relação ao controle (Valor de $p = 0,01$), enquanto a fluoxetina isoladamente (Valor de $p = 0,02$) e associada à metformina (Valor de $p = 0,006$) impediram o aumento da imobilidade, tornando esta igual ao grupo controle, como mostra a **Figura 10 (b)**.

Figura 10 - (a) Teste da Preferência de Sacarose e (b) Teste da Suspensão da cauda



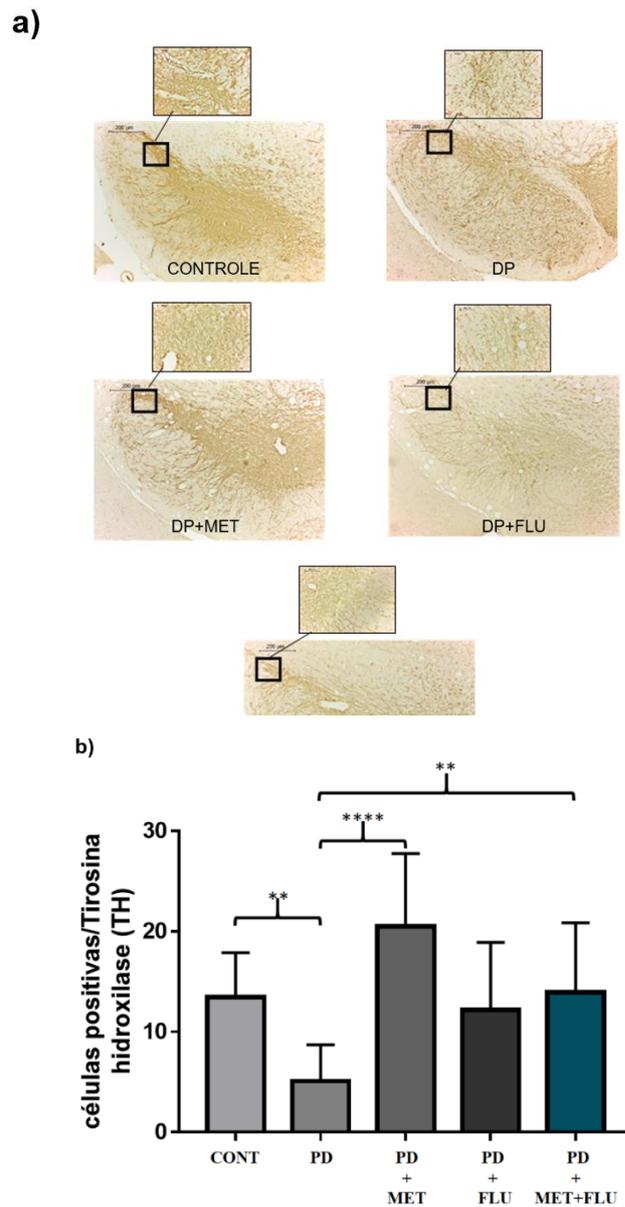
Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Tratamento com metformina e fluoxetina atenuaram a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra.

A administração de rotenona causou perda significativa dos neurônios dopaminérgicos na substância negra dos animais induzidos em relação ao controle (Valor de $p = 0,0046$), já a metformina isoladamente (Valor de $p < 0,0001$) ou associada à fluoxetina (Valor de $p = 0,003$) foi capaz de atenuar esta perda, já a fluoxetina isoladamente não aumentou significativamente o número de neurônios quando comparado ao grupo controle (Valor de $p = 0,06$).

A **figura 11 (a)** mostra a imunohistoquímica para a marcação da Tirosina Hidroxilase (TH) e a figura **(b)** mostra a representação gráfica dos mesmos resultados.

Figura 11 - (a e b) Imunohistoquímica para TH na Substância Negra.

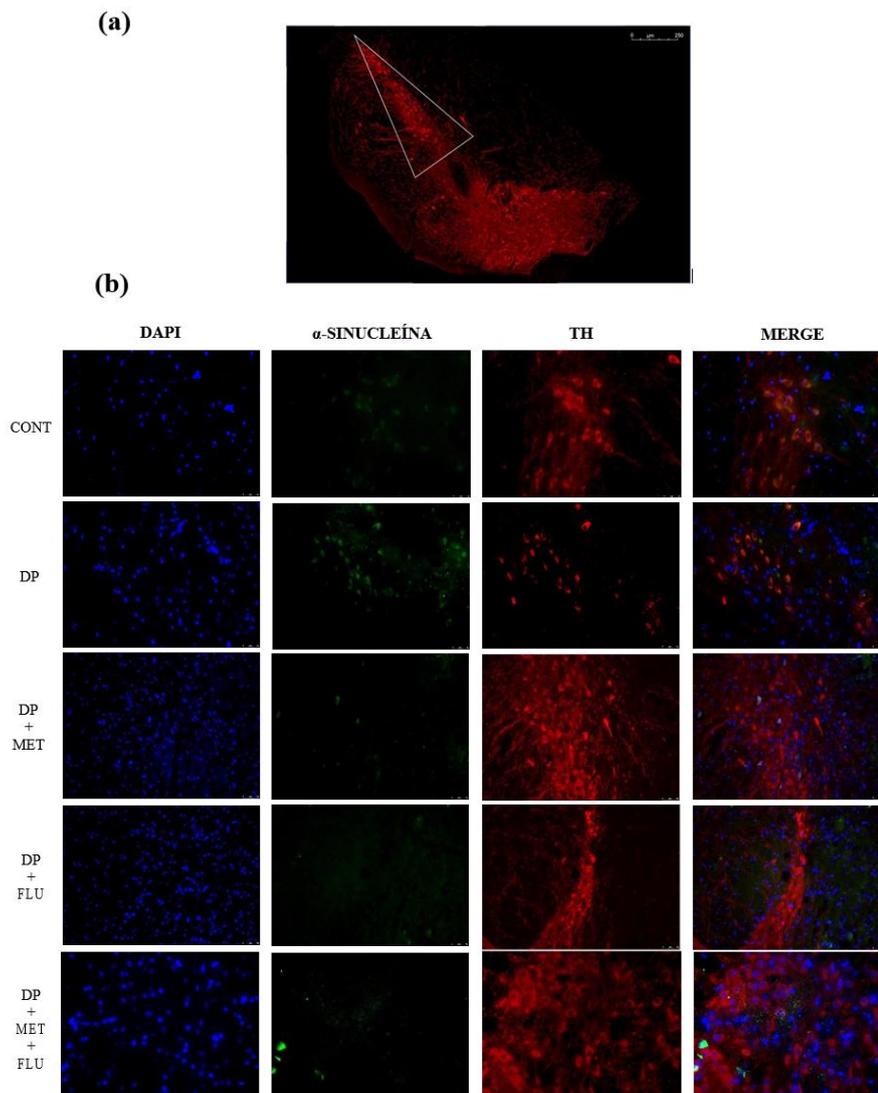


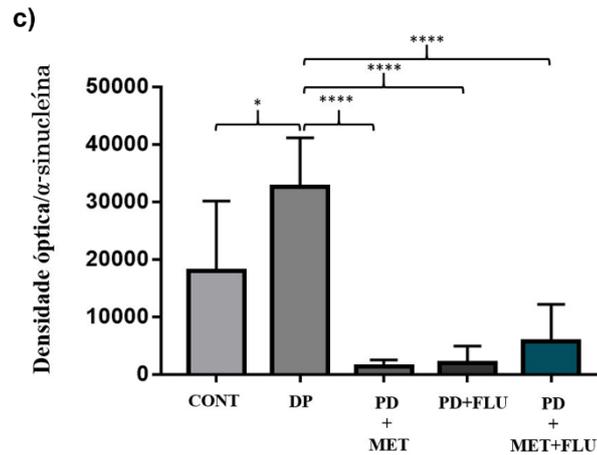
Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Tratamento com metformina e fluoxetina atenuaram o aumento de α -sinucleína induzido pela rotenona na substância negra.

A figura 12 (a) mostra a delimitação da região quantificada. Os animais induzidos com rotenona apresentaram maior marcação para a α -sinucleína na substância negra em relação ao grupo controle (*Valor de $p = 0,011$*). Por outro lado, a metformina (*Valor de $p < 0,0001$*) e fluoxetina (*Valor de $p < 0,0001$*) isoladamente ou em associação (*Valor de $p < 0,0001$*) atenuaram consideravelmente o aumento da α -sinucleína, como mostra as figuras 5 (b) e (c).

Figura 12 - (a, b e c) Imunofluorescência para TH e α -sinucleína na Substância Negra.





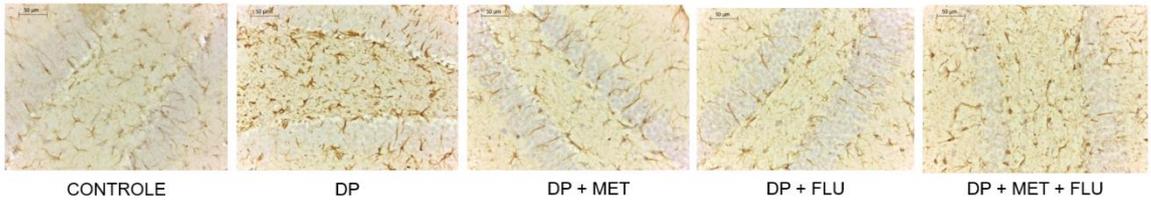
Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Metformina e fluoxetina preveniram neuroinflamação hipocampal, através da atenuação do aumento de células gliais provocado pela rotenona.

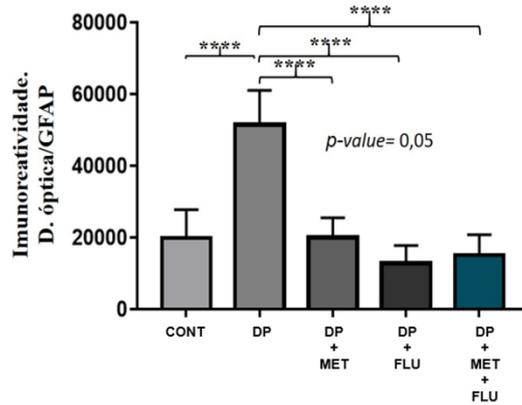
No hipocampo, a administração de rotenona aumentou significativamente o número e a densidade de células gliais em relação ao grupo controle (*Valor de $p < 0,05$*). Esse aumento foi mais significativo em relação aos astrócitos (*Valor de $p < 0,0001$*). O tratamento com metformina e fluoxetina isoladamente e em associação foi capaz de atenuar significativamente o aumento de astrócitos de forma igual nos três grupos de tratamento (*Valor de $p < 0,0001$*). **Figura 13 (a) e (b)**. Em relação ao número de micróglia a rotenona aumentou de forma também significativa o número dessas células em relação ao grupo controle (*Valor de $p = 0,007$*). Os tratamentos com metformina e fluoxetina isoladamente e em associação atenuaram significativamente o aumento de células Iba-1 positivas, sendo a associação de metformina e fluoxetina mais eficaz (*Valor de $p = 0,0012$*) em comparação aos grupos tratados com os fármacos isoladamente, metformina (*Valor de $p = 0,04$*) e fluoxetina (*Valor de $p = 0,0015$*). **Figura 13 (c) e (d)**.

Figura 13 - (a e b) Imunohistoquímica para GFAP no hipocampo; (c e d) Imunohistoquímica para IBA-1 no hipocampo.

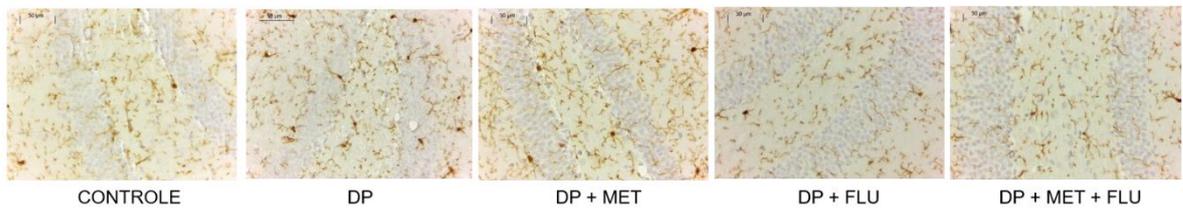
a)



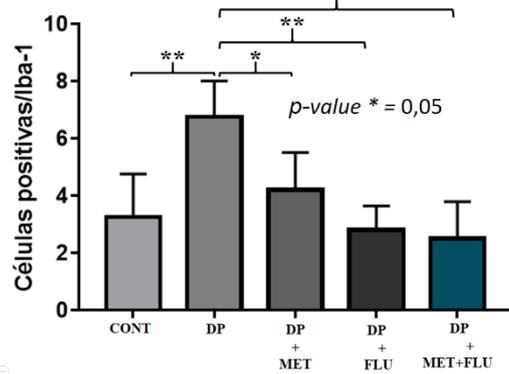
b)



c)



d)

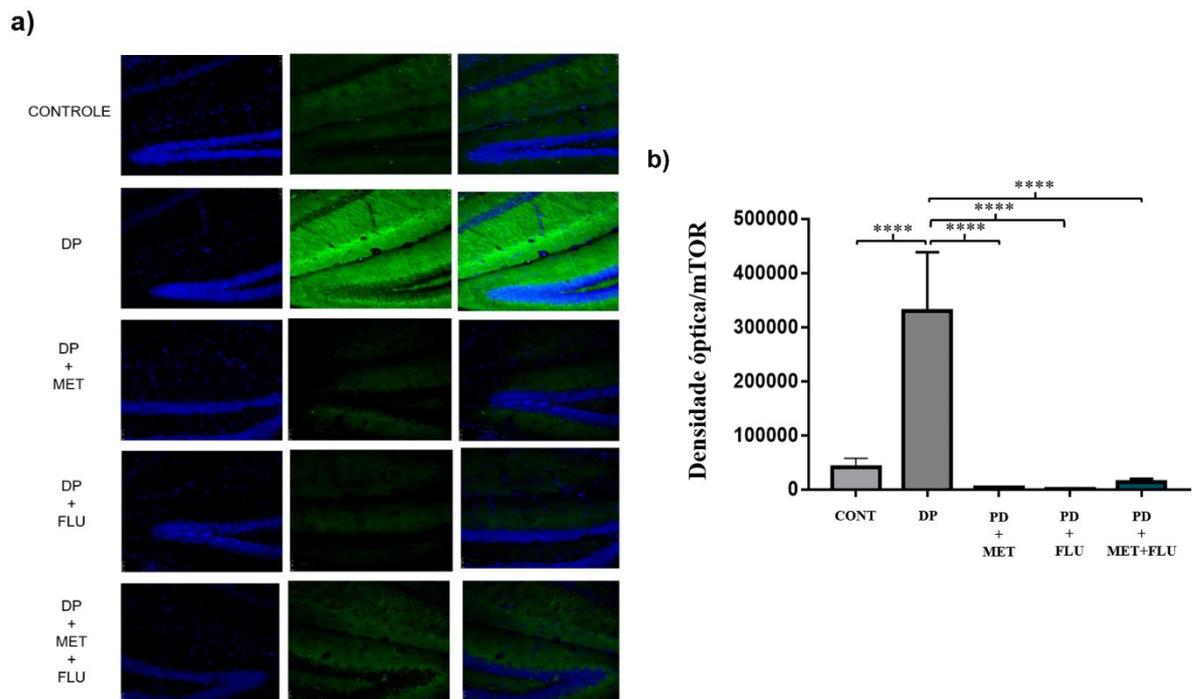


Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

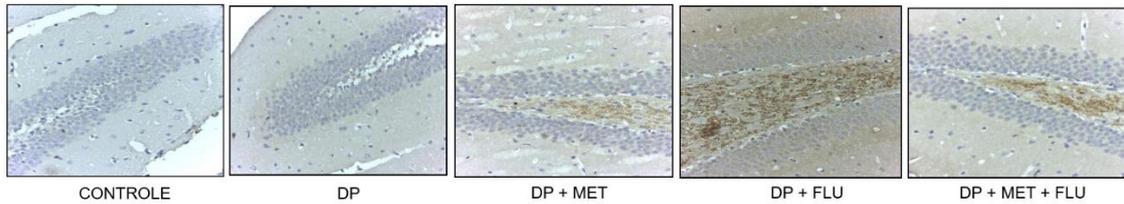
Metformina e fluoxetina induziu autofagia através da inibição de mTOR e aumento de ATG.

A figura 14 (a) e (b) mostra que a rotenona provocou um aumento significativo da fosforilação de mTOR em relação ao controle (*Valor de $p < 0,0001$*), conseqüentemente inibindo a autofagia. Já o tratamento com metformina e fluoxetina isoladamente e em associação provocaram uma redução da fosforilação do mTOR em relação ao grupo DP de forma estatisticamente semelhante (*Valor de $p < 0,0001$*). Metformina e fluoxetina também aumentaram significativamente a expressão da proteína associada à autofagia ATG5 em relação ao grupo DP (*Valor de $p = 0,02$ e $<0,0001$* , respectivamente), embora em associação houve menor significância vistos na figura 14 (c) e (d).

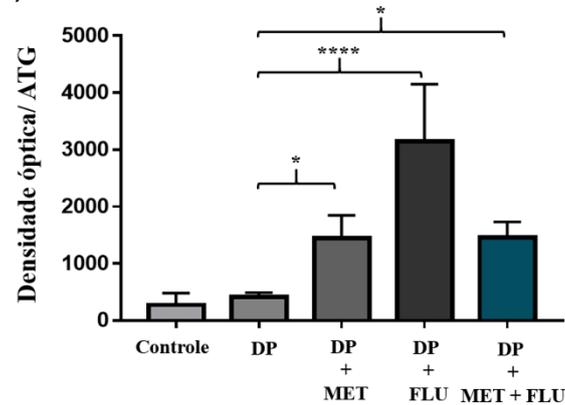
Figura 14 - (a e b) Imunofluorescência para mTOR no hipocampo; (c e d) Imunofluorescência para ATG5 no hipocampo



c)



d)

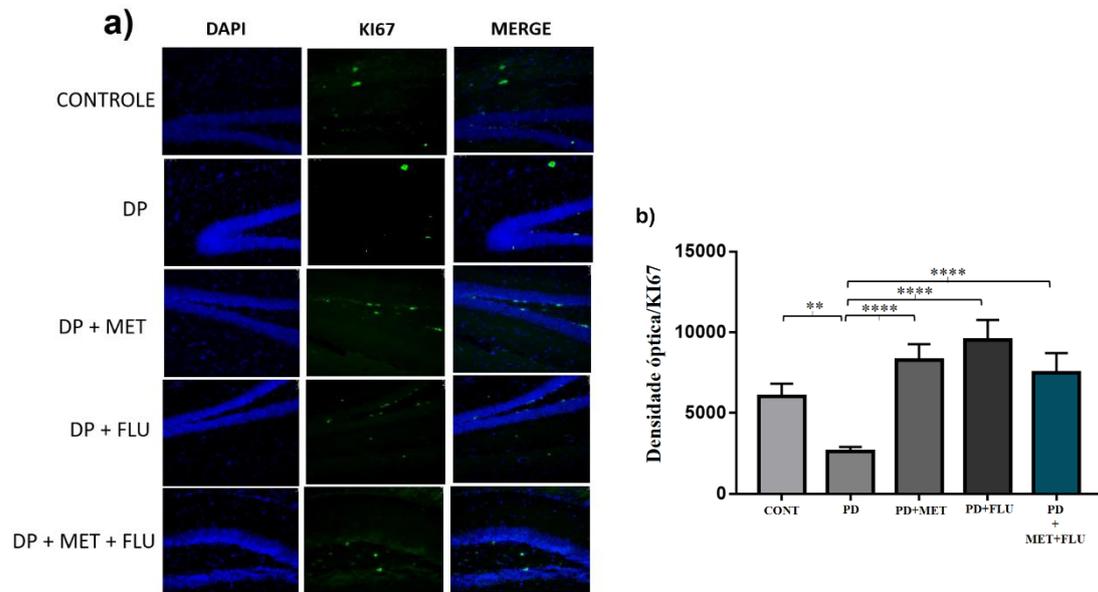


Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Rotenona inibiu a neurogênese hipocampal, sendo revertida pela metformina e fluoxetina.

Os animais induzidos com rotenona apresentaram menor marcação para a proteína KI67, que participa do processo de proliferação celular, em relação ao grupo controle (*Valor de $p = 0,0013$*). No entanto, tal diminuição foi revertida pelo tratamento com os fármacos metformina (*Valor de $p < 0,0001$*) e fluoxetina (*Valor de $p < 0,0001$*) isoladamente e em associação (*Valor de $p < 0,0001$*) (**figura 15 (a) e (b)**).

Figura 15 - (a e b) Imunofluorescência para KI67 no hipocampo



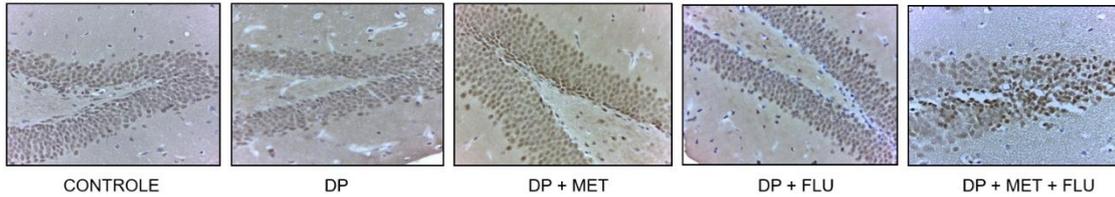
Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

A associação de Metformina e Fluoxetina promoveu aumento de neurônios maduros no hipocampo

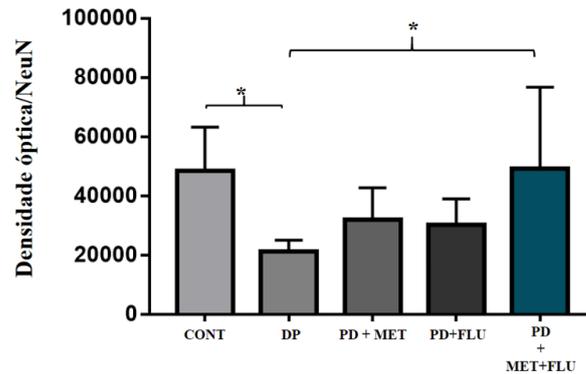
A administração de rotenona causou degeneração de neurônios hipocâmpais com redução de células imunorreativas para a detecção da proteína Neu N nos animais doentes (*Valor de p* = 0,019). Por outro lado, o tratamento com a associação de metformina e fluoxetina preveniu a morte neuronal (*Valor de p* = 0,04), **figura 16 (a) e (b)**.

Figura 16 - (a e b) Imunohistoquímica para NeuN no hipocampo

a)



b)



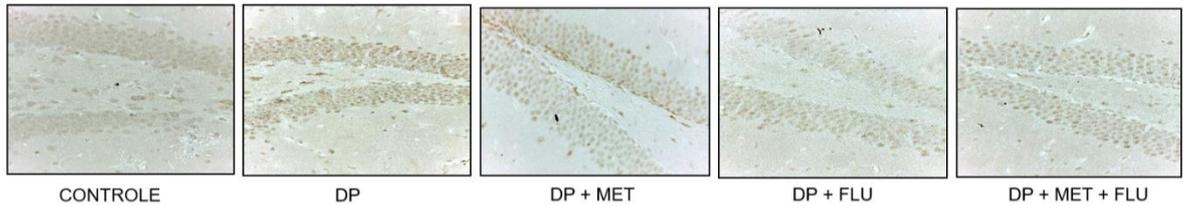
Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Fluoxetina e metformina atenuaram a morte celular no hipocampo

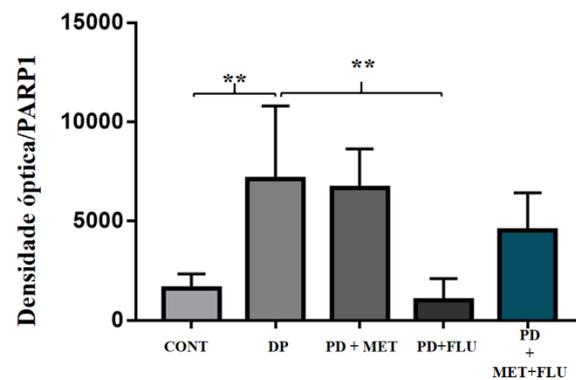
A expressão da enzima nuclear PARP 1 (do inglês, Poly [ADP-ribose] polymerase 1) foi aumentada pela administração de rotenona no grupo doente (*Valor de $p = 0,002$*), o que reflete a intensidade de morte celular causada por esta toxina. No entanto, a fluoxetina foi capaz de reduzir consideravelmente a imunomarcagem desta molécula no hipocampo de animais tratados (*Valor de $p = 0,001$*), atenuando assim o nível de morte celular, como vistos na **figura 17 (a) e (b)**. Por sua vez, a administração de rotenona aumentou a expressão de caspase 3 no teste de imunohistoquímica no hipocampo de animais induzidos ao modelo de DP em relação ao grupo controle (*Valor de $p = 0,007$*), enquanto o tratamento com fluoxetina separadamente (*Valor de $p = 0,0002$*) e associada à metformina (*Valor de $p = 0,004$*) reduziram significativamente a densidade óptica da imunoreação para esta molécula, como vistos na **figura 17 (a) e (b)**.

Figura 17 - (a e b) Imunohistoquímica para PARP1 no hipocampo

a)



b)



Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

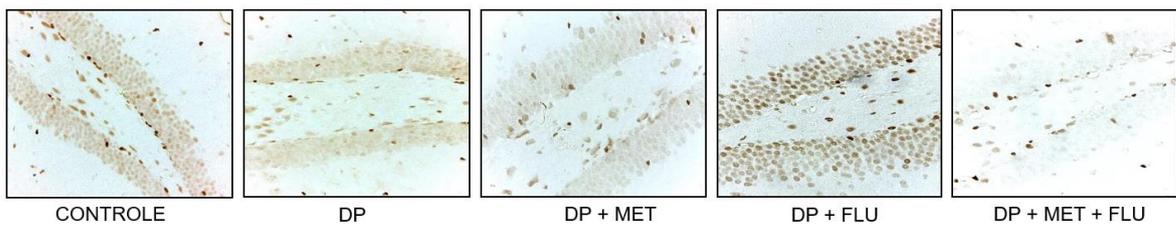
Fluoxetina e metformina induzem plasticidade sináptica

A rotenona provocou uma redução da expressão da proteína de ligação responsiva ao AMPc fosforilada (*do inglês, cAMP response element-binding protein* ou CREB-p) em relação ao controle (*Valor de $p = 0,0004$*), no entanto, a fluoxetina preveniu esta redução significativamente no grupo doente que foi tratado com fluoxetina (*Valor de $p = 0,01$*) (**figura 18 (a) e (b)**).

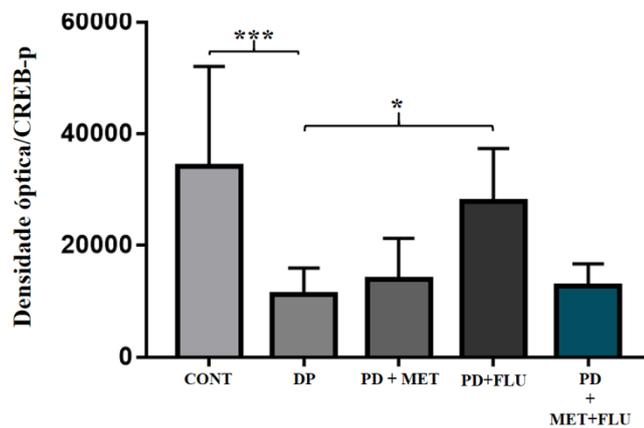
Da mesma forma, a expressão do Fator neurotrófico derivado do cérebro (*do inglês, Brain derived neurotrophic fator ou BDNF*) também foi reduzido pela administração de rote- nona, em relação ao controle (*Valor de $p = 0,01$*), no entanto, o BDNF também foi aumentado pela fluoxetina (*Valor dep = 0,006*) e potencializado pela metformina no grupo doente tratado com os dois fármacos (*Valor de $p < 0,0001$*), sugerindo um efeito sinérgico deste último quando combinado com a fluoxetina (**figura 18 (c) e (d)**).

Figura 18 - (a e b) Imunohistoquímica para CREB-p no hipocampo; (c e d) Imunohistoquímica para BDNF no hipocampo

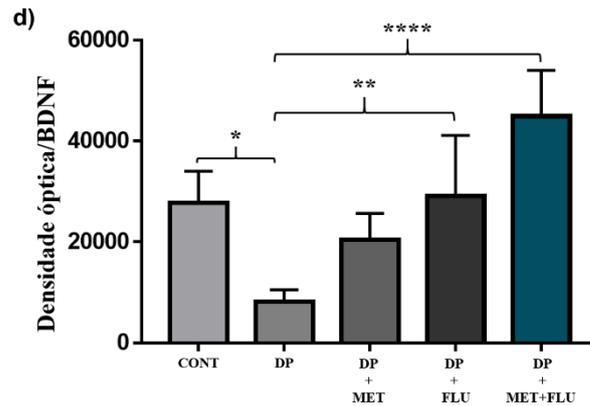
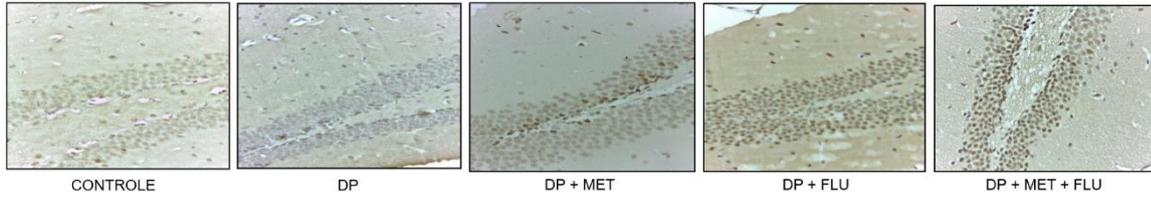
a)



b)



c)



Fonte: Ingrid Mendonça (2021)

Discussão

A metformina exibe um efeito neuroprotetor em muitos distúrbios neurológicos e tem sido investigada em variados modelos de DP. Recentemente, em um modelo experimental de DP em *C. elegans* induzido por 6-OHDA, metformina reduziu a neurodegeneração dopami- nérgica e a agregação de -sinucleína, mostrando efeito neuroprotetivo nesse modelo (Saewan- ne et al, 2021). Já Ryu et al (2020) mostrou que em modelo murino de PD induzido também por 6-OHDA, o tratamento com metformina melhorou efetivamente os sintomas moto- res, porém não teve efeito sobre os neurônios positivos para tirosina hidroxilase (Ryu et al, 2020). No presente estudo, vimos que a metformina preveniu o déficit motor nos animais DP tratados com o fármaco, e foi o tratamento mais eficaz sobre o aumento de células positivas para tirosina hidroxilase, portanto na redução da neurodegeneração, além disso, nossos resultados complementam a literatura demonstrando que a fluoxetina também atuou na melhora do déficit motor avaliado

pelo rotarod.

Já é conhecido que a fluoxetina, um antidepressivo ISRS, tem amplas funções neuro- biológicas e efeitos neuroprotetores em lesões do sistema nervoso central, mas seus papéis na DP são pouco conhecidos, porém, em um modelo de DP induzido por rotenona, demonstrou- se que o pré-tratamento com fluoxetina melhorou significativamente o sintomade catalep- sia e aumentou a atividade locomotora. Além disso, fluoxetina inibiu a neurodegeneração mediada por rotenona por meio de apoptose neuronal mediada por caspase-3 (Peng et al, 2018). No entanto, no nosso modelo de administração de fluoxetina, não houve efeito signifi- cativo deste fármaco em relação à lesão nigral. Tais divergências de resultados podem ser de- vido à diferenças metodológicas relacionadas à espécie animal, tempo de indução da DP e via de administração do fármaco, em relação ao último estudo citado.

Embora esteja relacionada à patologia da DP, a função fisiológica da α -sinucleína está sob constante investigação. Uma das linhas de pesquisa mais proeminentes sugere que α - si- nucleína atua no terminal pré-sináptico e regula a transmissão sináptica, portanto não é origi- nalmente tóxica (Villar-Piqué, Fonseca e Outeiro, 2016). No entanto, alterações estruturais bem como predisposição genética devido a mutações no gene desta proteína pode levar a mu- danças conformacionais que facilitam sua aglomeração tornando-a tóxica para a célula. Os aglomerados de sinucleína e outras proteínas formam inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos e neurites de Lewy dentro dos neurônios dopaminérgicos remanecentes da SNpc (Colla et al, 2012; Choi et al, 2013). O papel preciso das formas tóxicas da α - sinucleína na etiologia de PD não são claros, no entanto dados gerados a partir de modelos *in vivo* e *in vitro* mostram que as formas agregadas de α -sinucleína podem contribuir para o processo neurode- generativo na DP interferindo com a função lisossomal e mitocondrial,prejudicando a autofa- gia, homeostase vesicular e transporte de microtúbulos. Ao mesmo tempo, processos celula- res, como disfunção mitocondrial, podem iniciar o acúmulo de α - sinucleína. Qualquer uma desses processos são potencialmente devastadores para asobrevivência neuronal (Rocha, Mi- randa e Sanders, 2017). Em nossos resultados, encontramos que a rotenona induziu aumento da α -sinucleína total na SNpc. Esse resultado é compatível com modelos experimentais de DP induzidos pela rotenona tanto *in vitro* (Shin e Chung, 2020) quanto *in vivo*

(Dodiya et al, 2020). No nosso estudo, a metformina e a fluoxetina atenuaram a expressão de α -sinucleína na SNpc quando comparado ao grupo rotenona, confirmando resultados prévios obtidos por Katila et al (2017), utilizando um modelo murino induzido por MPTP e tratados com metformina, e recentemente reproduzindo também resultados de Saewanee et al (2021) que utilizaram um modelo em *C. Elegans* induzido por rotenona e também tratados com metformina (Katila et al, 2017; Saewanee et al, 2021). Os nossos resultados complementam os estudos sobre os efeitos anti-agregativos de α -sinucleína exercidos pela metformina em modelo de DP, e indicam a mesma ação sendo exercida pela fluoxetina, embora as vias intracelulares não estejam totalmente elucidadas.

Alguns estudos já mostraram a aplicabilidade de paradigmas que são usados no campo da pesquisa experimental da depressão. No teste de preferência à sacarose (TPS), a anedonia no animal é medida pela redução do consumo de sacarose em comparação à níveis basais, roedores anedônicos mostram preferência diminuída pela solução de sacarose, provavelmente devido a um sentido reduzido de recompensa do sabor doce, da mesma forma a eficácia antidepressiva do tratamento é medida pela maior preferência do animal pela água açucarada (Wang, 2009; Schintu, Zhang, Svenningsson, 2012). No teste de suspensão da cauda (TSC), é avaliado um endofenótipo denominado de “comportamento tipo-desespero” que é proporcional ao tempo de imobilidade (Schintu, Zhang, Svenningsson, 2012). Como visto na **figura 9**, a rotenona provocou um comportamento anedônico nos animais em relação ao grupo controle, este resultado representa um complemento a recentes estudos utilizando modelos de DP induzido por 6-OHDA que comprovaram o desenvolvimento de comportamento anedônico e tipo-desespero ou comportamento tipo-depressivo (Vechia et al, 2021; Bonato et al, 2018).

A metformina tem sido relatada como tendo efeitos antidepressivos em estudos experimentais de depressão (Shivaved et al, 2017). Poggini e colaboradores (2019) demonstraram em um modelo de depressão induzido por estresse crônico imprevisível, que o tratamento combinado de fluoxetina e metformina foi mais eficaz do que a fluoxetina isolada na melhora do fenótipo depressivo após uma semana de tratamento. Isso foi associado a um aumento na expressão de mRNA de IGF2 e aumento da potenciação de longo prazo, especificamente no hipocampo (Poggini et al, 2019). No modelo de DP utilizado no

presente estudo, metformina e fluoxetina produziram uma ação tipo-antidepressiva aumentando a preferência pela sacarina e diminuindo a imobilidade na avaliação do comportamento tipo-desespero avaliados por TPS e TSC, respectivamente. Além disso, pela primeira vez, mostramos que a metformina exerceu um efeito potencializador sobre a fluoxetina em relação à melhora do comportamento tipo-depressivo no TSC, como visto na **figura 3 (b)**.

Microglia e astrócitos são células da glia envolvidas em processos neuroinflamatórios na DP. Microglia parece contribuir mais intensamente para o processo degenerativo. No entanto, o perfil de astrócito pró-inflamatório pode ser significativamente prejudicial para neurônios dopaminérgicos (Hu, 2016; Pal et al, 2016). Em um estudo utilizando o modelo de DP por 6-OHDA, foi observada uma reatividade astrocítica no estriado e SNpc em paralelo com o aumento da imunorreatividade para iNOS (Kuter, Olech e Glowacka, 2018; Mori et al, 2018). Silva et al (2016) encontrou aumento da ativação microglial na SNpc, estriado e hipocampo em um modelo de DP induzido também por 6-OHDA em ratos. Além disso, Tansey e Goldberg (2010), concluíram que a microglia reativa pode contribuir para a morte de neurônios dopaminérgicos, levando a uma redução nos níveis de dopamina estriatal. O presente estudo mostrou que a rotenona aumentou significativamente microglia e astrócitos no hipocampo dos animais DP (Silva et al, 2016; Tansey e Goldberg, 2016). No modelo utilizado nesse estudo, a rotenona foi administrada sistemicamente, diferentemente dos modelos induzidos por 6-OHDA dos estudos citados acima, nos quais a 6-OHDA foi administrada localmente no SNC. Juntos, esses dados indicam que o aumento de astrócitos e microglia contribuiu para o comportamento do tipo depressivo, bem como contribuiu para déficits motores.

No nosso estudo a metformina e a fluoxetina reduziram significativamente as células microgliais e astrocitárias no hipocampo dos animais doentes. Esses resultados complementam dados da literatura que mostram que a metformina também melhora déficits cognitivos através da ativação alternativa de microglia de fenótipo M2 aliado à uma diminuição de citocinas inflamatórias, além de reduzir a hipertrofia de astrócitos (Kodali et al, 2020). Para além dos efeitos em relação aos níveis de serotonina, são descritos efeitos anti-inflamatórios da fluoxetina. Em modelo de injúria cerebral, a fluoxetina reduziu o número de micróglia / macrófagos positivos para Iba-1, infiltração de neutrófilos e morte celular, além de

reduzir os níveis de citocinas pro-inflamatórias (Liu et al, 2018). Esses dados mostram que aumento de células gliais estão envolvido no processo degenerativo da DP no hipocampo e que metformina e fluoxetina apresentam efeito benéfico neuromodulador.

A autofagia é um processo catabólico que funciona como uma via de depuração de agregados de proteínas, componentes citoplasmáticos e organelas celulares como mitocôndrias em fases de degeneração (Glick, Barth e Macleod, 2010). A autofagia é descrita como sendo prejudicada em cérebros de pacientes parkinsonianos pós-morte, e em modelos experimentais tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Anglade et al., 1997; Zhu et al., 2003; Higashi et al., 2011). Wise e colaboradores (2018) encontraram distúrbios autofágicos em diferentes regiões fora do sistema nigroestriatal (Wise et al, 2018). Os resultados do presente estudo mostraram que a rotenona induziu aumento da proteína quinase p-mTOR no hipocampo, enquanto metformina e fluoxetina reduziram significativamente a expressão dessa proteína. O alvo da rapamicina em mamíferos (*do inglês, mammalian target of rapamycin* ou mTOR), é um ponto central de convergência de sinais de crescimento, proliferação e sobrevivência celular, além de inibir o processo de autofagia. Embora seja necessário manter um certo nível de atividade mTOR já que a sinalização mTOR é essencial para a sobrevivência e crescimento celular, no contexto da DP, é crucial acelerar a depuração de agregados tóxicos de proteínas nos neurônios. A autofagia é uma via chave para promover a degradação desses agregados (Lavy, Towers e Thorburn, 2017; Zhu et al, 2019). Portanto, a inibição do mTOR pela metformina e fluoxetina encontrada no nosso modelo de DP sugere indução de autofagia. Esta interpretação é complementada pelos nossos resultados em relação à proteína ATG5 que foi aumentada no hipocampo dos animais tratados com os respectivos fármacos. ATG5 é uma proteína crucial envolvida na extensão da membrana fagofórica nas vesículas autofágicas, portanto, indica atividade de autofagia (Qiao et al, 2020).

Os fatores neurotróficos são intimamente ligados à neurogênese e neuroplasticidade no adulto, processos que podem estar prejudicados durante o curso de algumas doenças neuropsiquiátricas e/ou neurodegenerativas (Horgusluoglu et al, 2016). No nosso modelo experimental, a rotenona reduziu significativamente a proliferação de precursores neuronais no hipocampo dos animais doentes através da diminuição da proteína KI67, como também reduziu a

população de neurônios maduros, já o tratamento com a fluoxetina induziu aumento da proteína KI67, portanto aumento da proliferação celular no hipocampo, enquanto que a associação de fluoxetina e metformina promoveu aumento dos neurônios maduros. Nossos resultados mostram que metformina e fluoxetina promoveram neurogênese e sobrevivência neuronal hipocampal frente ao modelo de DP, e estão em conformidade ao que tem sido demonstrado na literatura, onde a fluoxetina tem a capacidade para regular o nascimento de novos neurônios (neurogênese) e a sobrevivência dessas células (Hitoshi et al., 2007; Micheli et al, 2018).

A rotenona aumentou a apoptose neuronal no hipocampo, enquanto a fluoxetina associada à metformina reduziram a morte neuronal por apoptose, através da menor densidade óptica de caspase 3. Para reforçar a degeneração hipocampal no presente estudo, mostramos também o aumento de PARP 1 pela rotenona e a inibição deste componente pela fluoxetina. A detecção de caspase 3 em tecidos é um método importante para avaliação da apoptose induzida por uma ampla variedade de sinais apoptóticos. Por sua vez, a PARP 1 é uma enzima envolvida no reparo celular em situações de estresse oxidativo e é um indicativo de morte celular (Choudhary, Al-Harbi e Almasan, 2015; Keuss et al, 2019). Outros modelos de DP também reproduziram morte neuronal no hipocampo (Kin et al, 2014; Li et al, 2020). A fluoxetina também reduziu morte neuronal hipocampal avaliada pela técnica de TUNEL (do inglês, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) em um modelo de depressão induzido por dexametasona (Heynes, Barber e Mitchell, 2004). Nossos resultados reforçam o efeito inibidor da fluoxetina, já relatada na literatura, sobre a morte neuronal no hipocampo.

O efeito antidepressivo na fluoxetina também é devido ao aumento de fatores relacionados à neuroplasticidade, como CREB e BDNF. A microinjeção bilateral de CREB no hipocampo de ratos com depressão induzida produziu efeito antidepressivo e sugere que CREB pode servir como um potencial alvo molecular para novos agentes terapêuticos (Chenet et al, 2001). A metformina também induz aumento de fatores neurotróficos segundo alguns estudos. Recentemente, Fang e colaboradores (2020), mostraram que a metformina aumentou significativamente a expressão do BDNF, aumentando a acetilação da histona junto com o promotor do BDNF, que foi atribuído à ativação da proteína quinase ativada por AMP

(AMPK) e de CREB. Neste mesmo estudo, a metformina melhorou o comportamento de-pressivo de ratos quando administrada sozinha e potencializou o efeito da fluoxetina quando foi administrada em associação (Fang et al, 2020). Nós mostramos neste estudo, que o modelo de DP induzido pela rotenona causou redução de CREB-p e BDNF, indicando uma reduzida neuroplasticidade hipocampal. No entanto a fluoxetina aumentou significativamente a imunorreatividade de CREB-p e potencializou o efeito da metformina no aumento de BDNF, quando administrado em associação. Portanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura em relação aos efeitos indutores de neuroplasticidade dos fármacos metformina e fluoxetina, além de reforçar o efeito sinérgico desses dois fármacos sobre a neuroplasticidade hipocampal frente ao processo da DP experimental.

Conclusões

O presente estudo concluiu que o tratamento com metformina e fluoxetina separadamente ou em associação apresentam efeitos antiparkinsonianos e antidepressivos. Tais efeitos estão relacionados à processos anti-inflamatórios, autofágicos, neuroplásticos e neuroprotetores em modelo experimental de doença de Parkinson. Esses processos estão envolvidos na DP, e são relatados em humanos e em modelos experimentais. Os resultados obtidos até o momento são promissores, embora necessitem de investigações sobre vias intracelulares envolvidas nos processos citados. Finalmente, os resultados estão embasados em estudos prévios e indicam uma potencial estratégia polifarmacológica composta por metformina e fluoxetina para sintomas motores e não-motores da DP.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não houve conflito de interesse em relação a publicação deste artigo

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar sua gratidão ao Programa de Excelência em Pesquisa - Instituto Aggeu Magalhães (IAM PROEP # 400208 / 2019-9) e o Conhecimento Programa de Geração - 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 - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

Referências

- Airan RD, Meltzer LA, Roy M, Gong Y, Chen H, Deisseroth K. High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science*. 2007 Aug 10;317(5839):819-23. doi: 10.1126/science.1144400. Epub 2007 Jul 5. PMID: 17615305.
- Bonato JM, Bassani TB, Milani H, Vital MABF, de Oliveira RMW. Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. *Exp Neurol*. 2018 Feb;300:188-200. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.11.009. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29162435.
- Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Duman RS. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry*. 2001 May 1;49(9):753-62. doi: 10.1016/s0006-3223(00)01114-8. PMID: 11331083.
- Choi BK, Choi MG, Kim JY, Yang Y, Lai Y, Kweon DH, Lee NK, Shin YK. Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 5;110(10):4087-92. doi: 10.1073/pnas.1218424110. Epub 2013 Feb 19.
- Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2015;1219:1-9. doi: 10.1007/978-1-4939-1661-0_1. PMID: 25308257.
- Colla E, Jensen PH, Pletnikova O, Troncoso JC, Glabe C, Lee MK. Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci*. 2012 Mar

- 7;32(10):3301-5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012. PMID: 22399752; PMCID: PMC3548448.
- Dodiya HB, Forsyth CB, Voigt RM, Engen PA, Patel J, Shaikh M, Green SJ, Naqib A, Roy A, Kordower JH, Pahan K, Shannon KM, Keshavarzian A. Chronic stress- induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2020 Feb;135:104352. doi: 10.1016/j.nbd.2018.12.012. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30579705.
 - El-Ghaiesh SH, Bahr HI, Ibrahiem AT, Ghorab D, Alomar SY, Farag NE, Zaitone SA. Metformin Protects From Rotenone-Induced Nigrostriatal Neuronal Death in Adult Mice by Activating AMPK-FOXO3 Signaling and Mitigation of Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2020 Jun 18;13:84. doi: 10.3389/fnmol.2020.00084. PMID: 32625061; PMCID: PMC7314970.
 - Fang W, Zhang J, Hong L, Huang W, Dai X, Ye Q, Chen X. Metformin ameliorates stress- induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation. *J Affect Disord.* 2020 Jan 1;260:302-313. doi:10.1016/j.jad.2019.09.013. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31521867.
 - Fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutr Neurosci.* 2018 Jun;21(5):341-351. doi: 10.1080/1028415X.2017.1290928. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28221817.
 - Guo et al. Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after sub- arachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. *J Neuroinflammation.* 2018 Dec 20;15(1):347. doi: 10.1186/s12974-018-1388-x. PMID: 30572907; PMCID: PMC6302437.
 - Gassen NC, Rein T. Is There a Role of Autophagy in Depression and Antidepressant Action? *Front Psychiatry.* 2019 May 15;10:337. doi: 10.3389/fpsy.2019.00337. PMID: 31156481; PMCID: PMC6529564.

- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697. PMID: 20225336; PMCID: PMC2990190.
- Haynes LE, Barber D, Mitchell IJ. Chronic antidepressant medication attenuates dex- amethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. *Brain Res.* 2004 Nov 12;1026(2):157-67. doi: 10.1016/j.brainres.2004.05.117. PMID: 15488477.
- Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kumar A, Kato N, Ikenaka K. Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. *J Neurosci Res.* 2007 Dec;85(16):3574-85. doi: 10.1002/jnr.21455. PMID: 17668856.
- Horgusluoglu E, Nudelman K, Nho K, Saykin AJ. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2017 Jan;174(1):93-112. doi: 10.1002/ajmg.b.32429. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26879907; PMCID: PMC4987273.
- Hu H. Reward and Aversion. *Annu Rev Neurosci.* 2016 Jul 8;39:297-324. doi: 10.1146/annurev-neuro-070815-014106. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27145915.
- Katila N, Bhurtel S, Shadfar S, Srivastav S, Neupane S, Ojha U, Jeong GS, Choi DY. Metformin lowers α -synuclein phosphorylation and upregulates neurotrophic factor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2017 Oct;125:396-407. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.08.015. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28807678.
- Keuss MJ, Hjerpe R, Hsia O, Gourlay R, Burchmore R, Trost M, Kurz T. Unanchored tri- NEDD8 inhibits PARP-1 to protect from oxidative stress-induced cell death. *EMBO J.* 2019 Mar 15;38(6):e100024. doi: 10.15252/embj.2018100024. Epub 2019 Feb 25. PMID: 30804002; PMCID:

PMC6418418.

- Khedr SA, Elmelgy AA, El-Kharashi OA, Abd-Alkhalek HA, Louka ML, Sallam HA, Aboul- Fotouh S. 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018 Apr;391(4):407-422. doi: 10.1007/s00210-018-1466-8. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29379991.
- Kim M, Cho KH, Shin MS, Lee JM, Cho HS, Kim CJ, Shin DH, Yang HJ. Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease. *Int J Mol Med*. 2014 Apr;33(4):870-8. doi: 10.3892/ijmm.2014.1656.
- Kodali M, Attaluri S, Madhu LN, Shuai B, Upadhya R, Gonzalez JJ, Rao X, Shetty AK. Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus. *Aging Cell*. 2021 Jan 14:e13277. doi: 10.1111/ace1.13277. Epub ahead of print. PMID: 33443781.
- Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017 Sep;17(9):528-542. doi: 10.1038/nrc.2017.53. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28751651; PMCID:PMC5975367.
- Li T, Tu L, Gu R, Yang XL, Liu XJ, Zhang GP, Wang Q, Ren YP, Wang BJ, Tian JY. Neuroprotection of GLP-1/GIP receptor agonist via inhibition of mitochondrial stress by AKT/JNK pathway in a Parkinson's disease model. *Life Sci*. 2020 Sep 1;256:117824. doi:10.1016/j.lfs.2020.117824. Epub 2020 May 20. PMID: 32445758.
- Liu FY, Cai J, Wang C, Ruan W, Guan GP, Pan HZ, Li JR, Qian C, Chen JS, Wang L, Chen Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, Tirone F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull*. 2018 Oct;143:181-193. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.09.002. Epub 2018 Sep 17. PMID:

30236533.

- Mori MA, Delattre AM, Carabelli B, Pudell C, Bortolanza M, Staziaki PV, Visentainer JV, Montanher PF, Del Bel EA, Ferraz AC. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated. *Neuropharmacology*. 2020 Sep 15;175:108173. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108173.
- Pal R, Tiwari PC, Nath R, Pant KK. Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol Res*. 2016 Dec;38(12):1111-1122. doi: 10.1080/01616412.2016.1249997. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27808010.
- Peng T, Liu X, Wang J, Liu Y, Fu Z, Ma X, Li J, Sun G, Ji Y, Lu J, Wan W, Lu H. Fluoxetine-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effects of Parkinson's disease. *Aging (Albany NY)*. 2018 Dec 24;10(12):4188-4196. doi: 10.18632/aging.101716. PMID: 30585175; PMCID: PMC6326670.
- Poggini S, Golia MT, Alboni S, Milior G, Sciarria LP, Viglione A, Matte Bon G, Brunello N, Puglisi-Allegra S, Limatola C, Maggi L, Branchi I. Combined Fluoxetine and Metformin Treatment Potentiates Antidepressant Efficacy Increasing IGF2 Expression in the Dorsal Hippocampus. *Neural Plast*. 2019 Jan 21;2019:4651031. doi: 10.1155/2019/4651031. PMID:30804991; PMCID: PMC6360645.
- Qiao CM, Sun MF, Jia XB, Shi Y, Zhang BP, Zhou ZL, Zhao LP, Cui C, Shen YQ. Sodium butyrate causes α -synuclein degradation by an Atg5-dependent and PI3K/Akt/mTOR-related autophagy pathway. *Exp Cell Res*. 2020 Feb 1;387(1):111772. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111772. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31836471.
- Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2018 Jan;109(Pt B):249-257. doi: 10.1016/j.nbd.2017.04.004. Epub 2017 Apr 8. PMID: 28400134
- Saewanee N, Praputpittaya T, Malaiwong N, Chalorak P, Meemon K. Neuroprotective effect of metformin on dopaminergic neurodegeneration and α -synuclein aggregation in *C. elegans* model of

- Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 2021 Jan;162:13-21. doi: 10.1016/j.neures.2019.12.017. Epub 2019 Dec 24. PMID: 31881233.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, DumanR, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 2003 Aug 8;301(5634):805-9. doi: 10.1126/science.1083328. PMID: 12907793.
 - Schintu N, Zhang X, Svenningsson P. Studies of depression-related states in animal models of Parkinsonism. *J Parkinsons Dis.* 2012;2(2):87-106. doi: 10.3233/JPD-2012-12076. PMID: 23939436.
 - Shin WH, Chung KC. 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 Neurol.* 2020 Jun 30;29(3):207-218. doi: 10.5607/en20014. PMID: 32624505; PMCID: PMC7344377.
 - Shivavedi N, Kumar M, Tej GNVC, Nayak PK. Metformin and ascorbic acid combination therapy ameliorates type 2 diabetes mellitus and comorbid depression in rats. *Brain Res.* 2017 Nov 1;1674:1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2017.08.019. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28827076.
 - Silva TP, Poli A, Hara DB, Takahashi RN. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neurosci Lett.* 2016 May 27;622:83-7. doi:10.1016/j.neulet.2016.04.049. Epub 2016 Apr 22. PMID: 27113204.
 - Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, Belzung C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry.* 2008 Aug 15;64(4):293-301. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.02.022. Epub 2008 Apr 11. PMID: 18406399.
 - Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its

- role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis.* 2010 Mar;37(3):510-8. doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.004. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19913097; PMCID: PMC2823829.
- Vecchia DD, Kanazawa LKS, Wendler E, Hocayen PAS, Vital MABF, Takahashi RN, Da Cunha C, Miyoshi E, Andreatini R. Ketamine reversed short-term memory impairment and depressive-like behavior in animal model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull.* 2021 Mar;168:63-73. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.12.011. Epub 2020 Dec 31. PMID: 33359641.
 - Villar-Piqué A, Lopes da Fonseca T, Outeiro TF. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J Neurochem.* 2016 Oct;139 Suppl 1:240-255. doi: 10.1111/jnc.13249. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26190401.
 - Yan J, Liu A, Fan H, Qiao L, Wu J, Shen M, Lai X, Huang J. Simvastatin Improves Behavioral Disorders and Hippocampal Inflammatory Reaction by NMDA-Mediated Anti-inflammatory Function in MPTP-Treated Mice. *Cell Mol Neurobiol.* 2020 Oct;40(7):1155-1164. doi: 10.1007/s10571-020-00804-7. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32016638.
 - Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci.* 2008 Feb 6;28(6):1374-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008. PMID: 18256257; PMCID:PMC6671574.
 -

4.2 ARTIGO 2

O artigo "*Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: A review*" foi publicado no periódico *INTERNATIONAL*

MMUNOPHARMACOLOGY, volume 83, 2020, DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106434.

link para acesso: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32224442/>



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

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

Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: A review

Ingrid Prata Mendonça^{a,b,*}, Eduardo Duarte-Silva^{a,c}, Adriano José Maia Chaves-Filho^d,
Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa^c, Christina Alves Peixoto^{a,e,*}

^a Laboratory of Ultrastructure, AggeuMagalhães 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)/AggeuMagalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil

^d Neuropsychopharmacology Laboratory, Drug Research and Development Center, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

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

^{*} 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
Depression
Neuroinflammation
Monoamines
Gut microbiota
Pharmacotherapy

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most prevalent neurodegenerative diseases in the world with a harmful impact on the quality of life. Although its clinical diagnosis is based on motor symptoms such as resting tremor, postural instability, slow gait, and muscle stiffness, this disorder is also characterized by the presence of early emotional impairment, including features such as depression, anxiety, fatigue, and apathy. Depression is the main emotional manifestation associated with PD and the mechanisms involved in its pathophysiology have been extensively investigated however, it is not yet completely elucidated. In addition to monoaminergic imbalance, immunological and gut microbiota changes have been associated with depression in PD. Besides, a patient group appears to be refractory to the treatment available currently. This review emphasizes the mainly neuromolecular findings of the PD-associated depression as well as discuss novel and potential pharmacological and non-pharmacological therapeutic strategies.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic central nervous system (CNS) pathology that affects about 1% of the world's population and is considered the second most prevalent neurodegenerative disease in the world, being more frequent in people over 60 years of age. The PD pathophysiology is related mainly to the degeneration of dopamine-producing neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc) region in the midbrain. The classic motor symptoms of PD are resting tremor, postural instability and slow gait. In addition to such symptoms related to the motor system, patients are also affected by other conditions such as constipation, hyposmia, cognitive deficits and depression, classified

as non-motor symptoms of PD [163]. The PD etiology has been studied for a long time and remains unclear, but it is currently suggested that besides genetic factors, exposure to environmental toxins and conditions such as diabetes mellitus and obesity may increase the risk to develop PD due to insulin resistance in the brain, which may compromise the dopamine (DA) signaling pathway [23,53]. Moreover, studies suggest that the Peripheral Nervous System (PNS) and Enteric Nervous System (ENS) may also be involved in the neurodegenerative process underlying PD. Furthermore, one of the major neuropathological markers of PD, α -synuclein aggregates, may spread from the gut to the brain, which is influenced by the gut microbiota of the affected individuals [17,82].

Abbreviations: AADC, L-aminoaciddecarboxylase; AD, Alzheimers Disease; ALA, α -linolenic acid; APC, Antigen Presenting Cell; ASO, α -synuclein-overexpressing; BDI, Beck Depression Inventory; BDNF, Brain-Derived Neurotrophic Factor; CBD, Cannabidiol; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DA, Dopamine; DG, dentate gyrus; DHA, docosahexaenoic acid; ENS, Enteric Nervous System; EPA, eicosapentaenoic acid; GSH, glutathione reductase; 3-HA, 3-hydroxyanthranilic acid; HDRS, Hamilton rating scale for depression; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 3-HK, 3-hydroxy kynurenine; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; 5-HTT, 5-HT transporter; HVA, homovanillic acid; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule

* Corresponding authors at: Laboratory of Ultrastructure, AggeuMagalhães Institute (IAM), Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50.670-420, Brazil.

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

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106434>

Received 21 January 2020; Accepted 19 March 2020

Available online 27 March 2020

1567-5769/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Depression is the main non-motor symptom associated with PD, affecting 7–76% of parkinsonian patients and is considered an early PD symptom. The depressive symptoms emerge early in the course of the disease, anticipating up to 10 years the clinical diagnoses based on motor disturbances [26,95,150,165].

Clinically, depression in PD presents the same symptoms as non-PD depression, which is characterized by depressed mood, irritability, anhedonia, difficulty concentrating, sleep and appetite disorders. However, in PD patients, pathological findings reinforce the idea that dopaminergic deficiency of the nigrostriatal circuit is implicated in the onset of depressive symptoms, as also demonstrated by experimental PD models with depressive-like behavior [119]. Therefore, factors that have been classified as “comorbidities” of PD, such as depression, can now be reformulated as integral aspects of changes that occur in PD and may even result from common pathophysiological pathways [6].

Currently, the pathophysiology of depression has been approached holistically. In addition to monoaminergic disorders, immunological changes may also be involved, such as glucocorticoid resistance, glutamate excess, microglial activation, increased production of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS), and more recently gut microbiota alterations [43,52,112], suggesting that depression has an immunopsychiatric character. PD patients exhibit signs of inflammation in postmortem brain tissue and animal studies indicated that activation of glial cells and release of inflammatory cytokines lead to dopaminergic neuronal degeneration in SNpc [169]. Besides, elevated levels of inflammatory markers have been found in the cerebrospinal fluid (CSF) of parkinsonian patients with non-motor symptoms, including depression [99].

So far, there is no treatment to stop the progression of PD, thus the drug therapy used is symptomatic and aims to compensate for dopaminergic deficiency that can improve motor symptoms and also relieve depressive symptoms when associated with other approaches. However, the PD therapy may induce several side effects and is not considered totally efficient [25,175]. The heterogeneity of PD symptoms and the lack of specific biomarkers make clinical trial design and results difficult [141]. In this review, we analyze the neuromolecular mechanisms of the PD-associated depression to provide an up-to-date understanding of the underlying immunopsychiatric processes and suggest novel therapeutic strategies.

2. Beyond dopaminergic degeneration: Monoaminergic dysfunction in the development of depression associated-Parkinson's disease

The degeneration of dopaminergic neurons of the SNpc is the main known neuropathological signature of PD. However, in the last decades, compelling evidence has pointed to the involvement of other neurotransmitter systems in PD non-motor symptoms, such as depression. In fact, clinical depression is the most prevalent affective disorder in PD [40,66,81,91] and dampens the quality of life of patients and caregivers, being the most determinant factor in reduction of functionality and morbidity more than motor alterations [113,148].

DA neurotransmission has also been implicated in the emergence of depressive symptoms. Considering that motor symptoms only appear clinically when about 70% of nigral DA neurons have been depleted, affective symptoms may be more sensitive to early dopaminergic degeneration [139]. In fact, it was reported that anxious and depressive symptoms in PD patients keep a negative correlation with DA transporter functioning in ventral striatum [171]. Moreover, in post-mortem evaluation, DA neuronal loss in SNpc was about seven times greater in depressed PD patients compared to non-depressed ones [55], corroborating that PD depression course with a greater DA neurodegeneration. However, the postulation that DA depletion can be the only mechanism responsible for PD depressive symptoms has been challenged by the observation that DA replacement therapy with L-DOPA not only did not improve these symptoms but also can exacerbate them in some

patients [139]. These findings have been partially justified by the fact the L-DOPA therapy, despite rapidly improving motor symptoms, prompts a supraphysiological release of DA into mood-regulated brain regions, such as the prefrontal cortex and hippocampus, as previously observed [49]. These extracellular concentrations of DA have been able to induce psychosis and agitation, but may also exacerbate anxiety and depression in PD patients [31,86]. Besides, these high levels of DA can induce a marked formation of noxious pro-oxidant radicals, such as quinone metabolites, which can damage neural cells in limbic brain areas [8].

In PD pathology, it is well established that noradrenergic dysfunction occurs before significant degradation of nigral DA neurons. In addition, serotonergic cell degeneration happens in the raphe nucleus before the classical dopaminergic striatal changes and the development of motor symptoms [18]. Therefore, compelling evidence has advocated for the participation of these neurotransmitter systems, more than just dopaminergic changes, in the neurobiology of depression and affective-symptoms of PD [42,79]. First evidences on the involvement of these neurotransmitters in depression PD came from the observation of the superior antidepressant effectiveness of drugs that enhance noradrenaline (NE) bioavailability, such as tricyclic antidepressants compared to other antidepressants [115]. Additionally, in PD post-mortem brain studies, it was demonstrated that a profound loss of NE neurons of *locus coeruleus* precedes DA neurodegeneration [18,55].

Additionally, changes in NE transporter (NET) and NE receptors are also been described. In fact, in PD patients, it was demonstrated a decrease of neuromelanin signal, a derivative of catecholamines, in *locus coeruleus* and a widespread reduction in binding of 11C-MeNER, a radiotracer selective for NET [153]. This reduction in NET functioning was also reported in the motor cortex of PD patients [154]. Besides, lower NET binding in *locus coeruleus* was also related to increased incidence of anxiety and depression symptoms in these patients. A PET study using [11C]RTI-32, a dopamine and noradrenaline transporter ligand, showed significant loss in limbic structures, such as ventral striatum and amygdala of PD patients, and this was associated with depression [142]. Interestingly, DA loss in PD correlates with noradrenaline levels in *nucleus accumbens*. Noradrenaline levels and NET functioning changes have also been related to cognition decline and worse life quality in these patients [153].

Interestingly, lower expression of the dopamine β -hydroxylase, the enzyme responsible for hydroxylation of DA to NE, has been observed in the CSF of patients, which was exacerbated by L-DOPA treatment [58,71]. In this context, it was demonstrated that L-DOPA can be converted in DA in NE terminals, replacing NE release by DA in these axons [7]. Furthermore, L-DOPA can significantly dampen dopamine β -hydroxylase activity, increasing NE deficits in the brain of these subjects [164]. L-DOPA treatment, as mentioned above, is associated with several neuropsychiatric adverse events, such as mania, psychosis, addiction, and depression [49,139], and exacerbation of NE dysfunction may be a contributing factor for this observed clinical phenomenon.

Strong evidence advocates for serotonergic dysfunction in depression, and, more recently, these 5-HT changes have also been pointed as an important mediating factor for depression in PD. In fact, early studies reported reduced levels of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), a 5-HT metabolite, in the CSF of PD patients compared to healthy controls [27,76]. Additionally, greater decreases in 5-HIAA levels were described in CSF of depressed PD subjects compared to non-depressed PD ones [109]. These studies also showed that CSF levels of dopamine metabolite homovanillic acid (HVA) were not associated with the presence of depression in PD [109].

The homeostasis of the serotonergic synapse has also been evaluated by 5-HT transporter (5-HTT) availability in living patients with radioactive ligands. The loss of 5-HTT binding represents a decrease in 5-HT neuronal terminals and possibly a loss of 5-HT neurons [160]. In fact, a single polymorphic region in 5-HTT gene associated with disturbed function has been associated with increased depression risk including in

PD patients [123]. Regarding 5-HTT binding, positron studies showed reduced binding of selective 5-HTT ligands in a wide range of regions, such as frontal cortex, caudate nucleus, putamen, and also in the midbrain raphe region of PD subjects [64,116]. Politis et al. [137] reported 5-HTT binding variations that followed the progression of PD. They found that a reduced binding to this target is already markedly reduced in the striatum, thalamus and cingulate cortex of early-stage PD patients. In advanced and demented PD patients, it extends to the prefrontal cortex and in the rostral and caudal raphe nuclei [137].

Like NE, L-DOPA treatment has been implicated in 5-HT dysfunction and the potential emergence of depressive symptoms. In this context, preclinical research showed that L-DOPA exposure in rats caused a marked reduction in 5-HT and 5-HIAA levels in the dorsal raphe nucleus, striatum, amygdala, and prefrontal cortex, with a simultaneous increase in DA and its metabolites levels [16]. An *in vivo* microdialysis study showed progressive reductions in 5-HT release in hippocampus and prefrontal cortex after acute injection of L-DOPA in parkinsonian rats [127]. Clinical and experimental studies showed convergent findings and significant reduction in 5-HT metabolism, as observed in CSF of PD patients submitted to L-DOPA treatment [106].

The mechanisms for this L-DOPA effect are not fully understood. It involves L-DOPA competitive effect with 5-hydroxytryptophan for conversion to 5-HT via aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), as well as its inhibitory action on tryptophan hydroxylase (TPH) activity [67]. Accordingly, despite inducing oxidative damage to serotonergic cells [156], L-DOPA derived quinones promptly inactivates the catalytic core of TPH, substantially reducing 5-HT synthesis [90]. In addition, a marked reduction in TPH expression was found in the dorsal raphe nucleus of 6-OHDA-lesioned rats treated 8 weeks with L-DOPA [12]. Furthermore, similarly to NE terminals, 5-HT neurons can capture extracellular L-DOPA and convert it into DA, releasing this neurotransmitter as a "false neurotransmitter" at the expense of 5-HT, accentuating 5-HT deficit in brain circuits [78].

Finally, more than dopaminergic degeneration, other neurotransmitter abnormalities are underlying the development of mood-related symptoms in PD. In special, depletion of NE and 5-HT levels and disturbances in their transporters and some hetero- and autoreceptors can mediate the emergence of anxiety and depressive symptoms in PD patients and worsen these symptoms. Furthermore, it has been proposed that chronic L-DOPA for the treatment of motor disturbances can accentuate these monoaminergic disturbances, contributing to the aggravation of mood symptoms, especially in advanced stage PD patients.

3. Neuroinflammation associated with the depressive behavior in Parkinson's disease

Neuroinflammation is strongly related to the development of depressive behavior and has been studied and well demonstrated in preclinical [69,104,112] and clinical studies [129]. Patients with PD have a variable prevalence of depression (7–76%) that results in significant impaired cognitive and executive function, and poorer quality of life [165]. Several studies have shown that PD is associated with the activation of glial cells and the production of classical proinflammatory cytokines, together with other factors, that play a key role in the process of dopaminergic neuronal death [105,181]. Depression is a non-motor comorbidity of PD at different stages of the disease and is reported in both pre-clinical and clinical studies. Additionally, studies have shown the importance of immuno-inflammatory processes and oxidative and nitrosative stress in both depression and PD, suggesting that prodromal and concurrent depression may be intricately involved in the etiology and course of PD [5,13,59,95], and since the role of inflammatory processes in the development of depressive symptoms of PD is under current investigation, this discussion is relevant to understanding its pathophysiology.

3.1. Microglial activation

Microglia comprises the population of resident macrophages of the CNS and is the main component of the immune system in the brain. These cells may play a homeostatic role and are commonly referred to as "vigilant microglia", having highly branched morphology. After proinflammatory stimuli, such as Lipopolysaccharide (LPS), microglia undergoes a morphological alteration acquiring an amoeboid form characterized as "activated" microglia. In this state, intracellular signaling routes, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) are activated, which in turn, leads to activation of the Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) and consequently to the expression of pro-inflammatory mediators [22,44,83]. As reviewed recently by Chaves-Filho et al. [28], microglia plays important roles in synaptogenesis both during neurodevelopment and in the adult brain. However, under pathological conditions such as neurodegeneration, microglia undergoes structural and functional alterations, which are involved in several neuropsychiatric diseases [28].

Reactive microglia, identified by the ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) marker has been documented in many studies using animal models of depression. Mice subjected to chronic stress had an increase in microglial activation in hippocampal regions such as CA1 and dentate gyrus (DG) and this was associated with depressive-like behavior [68]. The same result was found in a model of depression induced by LPS leading to chronic neuroinflammation, in which increased reactive microglia was also accompanied by gene expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA in the prefrontal cortex and hippocampus [176]. In addition to preclinical studies, microgliosis has also been reported in the brain of individuals who committed suicide and had a history of affective disorders, including depression. Specifically, activated microglia were observed in the dorsolateral prefrontal cortex, anterior cingulate cortex and thalamus. Interestingly, the thalamus is a region of the limbic system, which performs functions related to affective behavior [157,166]. In studies with PD, the quantitative microglial increase in SN may be related to a neuroinflammatory microenvironment, which has been proposed as an important factor in the induction of dopaminergic neuronal death [34,75]. Interestingly, in brain autopsies of parkinsonian patients, a greater number of CR/43-positive microglia, a marker of the Class II Major Histocompatibility Complex (MHC-II), was found in the SN, putamen, and in regions of the limbic system [72]. MHC-II is expressed at low levels in microglia. However, under neurodegenerative insult it is overexpressed, providing the microglia a role as Antigen Presenting Cell (APC). Besides, APCs associated with T-cell reactivity have a key role in the brain pathogenesis of neurodegenerative diseases. Taken together, these data indicate that functional changes in microglia occur in neurodegenerative diseases and are also present in regions responsible for emotional behavior in the context of PD [72,88,102].

Silva et al. [152] mimicked early stages of the disease using a rat PD model induced by 6-OHDA bilateral striatal injection and found increased microglial activation one week after induction not only in the striatum but also in the SNpc and hippocampus, which was associated to the motor deficit assessed by the open field test (OFT). In contrast, when assessing anhedonic behavior by sucrose preference testing (SPT), the results were significant only after three weeks of induction. Interestingly, similar to the anhedonia period, striatal dopamine levels were significantly decreased three weeks after induction [152]. Thus, reduced striatal dopamine levels may be an important factor in the development of depressive behavior. As already reviewed by Tansey and Goldberg [161], neuroinflammation including the role of reactive microglia can contribute to the death of dopaminergic neurons, leading to a reduction in striatal dopamine levels. These data suggest that neuroinflammation contributes to depressive-like behavior as well as contributes to motor deficits [161].

A lasting increase in microglia has also been found in the hippocampal regions CA1, CA3 and Hilus in rats with experimental PD for

23 days after acute 6-OHDA infusion, and was also accompanied by depressive-like behavior [15]. It is important to note that although SNpc is the region most commonly affected by neuroinflammation in PD, the hippocampus also undergoes microglial activation, which is often observed concomitant to the previously mentioned depressive symptoms. The hippocampus is rich in microglia and is a region that interconnects with numerous other brain structures. Anatomically it is subdivided into ventral and dorsal regions according to their functions. The ventral region of the rodent hippocampus, which corresponds to the anterior portion of the primate hippocampus is mainly related to stress response and emotive behavior, whereas the rodent dorsal region, that corresponds to the posterior portion of the primate hippocampus, is more related to cognitive processes [51,168]. Although it is not clear from the studies cited above whether the increase in reactive microglia in animal models and postmortem brains is more intense in the ventral or dorsal portion of the hippocampus, it is reasonable to suggest that these findings may underlie the depressive symptoms observed in PD.

3.2. Astrocytic activation

Astrocytes have been considered regulators of CNS homeostasis and have also played an important role in acute stress situations. They have neuroprotective and antioxidant function, and provide energy substrates through lactate, having also a large glycogen reserve. Astrocytes are also regulators of neuronal blood flow leading to vasoconstriction or vasodilation according to the energy required by neurons [11,126,162]. Astrocytes are extremely important for CNS metabolism, especially for synapse formation, including the so-called quadripartite synapses, which are formed by pre- and postsynaptic neurons and glial cells [54,131].

The location of astrocytes in each neural subregion matches their functional characteristics, for example in the striatum, specifically on the nucleus accumbens, which is located in its ventral region and participates on the brain reward system, astrocytes can control the dopamine and glutamate homeostasis and actively participate in the regulation of synapses through reuptake of these neurotransmitters, thereby regulating their extracellular levels [54]. Khakh and Sofroniew [84] reviewed the functions of astrocytes in hippocampal subregions, and concluded that in normal conditions astrocyte's functional roles are distinct within microcircuits that comprise the larger hippocampal circuit between CA1 e CA3 and, in the latter, the basal levels of astrocytic Ca²⁺ may be important for long term potentiation (LTP) by regulating the constitutive release of D-serine, considered an important gliotransmitter [84].

However, although astrocytes provide support and protection to neurons, the expression of the proinflammatory astrocytic profile may exacerbate neuronal damage, and depending on the inflammatory stimulus, astrocytes may differentiate into the classically neurotoxic A1 or A2 neuroprotective phenotype. Pro-inflammatory substances such as LPS and IFN- γ stimulate astrocytes toward a predominantly harmful reactive state increasing the expression of pro-inflammatory genes such as Nitric oxide synthase (iNOS), IL1- β and TNF- α , whereas stimulation with anti-inflammatory molecules such as IL-4 can lead to a more protective or restorative state producing anti-inflammatory factors [74]. Thus, as well as microglia, astrocytes can also act with different phenotypes which may be neuroprotective or neurotoxic [97,128].

Under conditions of neurodegeneration, in which microglial reactivity is also present, toxic products released by microglia induce the activation of pro-inflammatory processes such as Nod-like receptor protein (NLRP) inflammasome activity in astrocytes, which promotes maturation and release of IL-1 β contributing to the destruction of neurons and enhancing neurodegenerative processes [97,185]. In a *in vivo* study, Kuter, Olech, and Glowacka [92] induced functional impairment in mesencephalic astrocytes and observed the effects of these astrocytes on 6-OHDA-induced neuronal death, and found that impaired astrocytes accelerated neuronal death 7 days after the insult.

Moreover, in another 6-OHDA-study, astrocytic reactivity was observed in the striatum and SNpc in parallel with the increase of iNOS immunoreactivity [121]. Corroborating these findings, the death of mid-brain neurons increased after being cultured with previously LPS-activated astrocytes or glutathione-depleted astrocytes. These data show that dysfunctional or toxic profile activated astrocytes can make neurons vulnerable or exacerbate the neurodegenerative process. Several studies have shown that the transition of astrocytes from resting to pro-inflammatory reactive states is associated with the secretion of molecules such as cytokines, eicosanoids, ROS, nitric oxide, and excitatory amino acids [92,110,121,144].

Finally, reactive microglia and astrocytes are the main cells that present a key neuroinflammatory role in PD. Microglia appear to contribute most intensely to the degenerative process. However, the proinflammatory astrocyte profile can be significantly detrimental to dopaminergic neurons. Dopamine is a neurotransmitter also responsible for pleasure and motivation, which take part in the reward mechanism that involves, among other regions, the ventral striatum. Brain reward system dysfunctions contribute to major psychiatric disorders, including depression. Thus, astrocytic toxicity may play a role in the depletion of dopamine, one of the monoamines related to depressive symptoms of PD [70,130].

3.3. Molecular inflammatory markers

A variety of molecules are expressed by neural cells in the CNS such as cytokines (e.g., TNF- α and IL1- β), prostaglandins (prostaglandin E2 - PGE2), trophic factors (e.g., BDNF) and tryptophan catabolites (e.g., quinolinic acid) [120,173]. Some cytokines participate in neural functions by modulating synapses influencing the excitability of neuronal membranes. For example, at physiological levels, cytokines such as TNF- α regulate synaptic potency in a given neuron in response to prolonged electrical activity and influence glutamate receptor subunits, similarly to IL1- β , which also assists in the process of excitatory transmission and synaptic pruning (for review, see [28]). However, in pathological conditions such as neurodegeneration, the activation of TNF- α and IL1- β receptors induce a cascade of intracellular events that results in activation of transcriptional factors such as NF- κ B, which enhances the expression of several inflammatory mediators, such as iNOS, an enzyme that generates large amounts of nitric oxide leading to neuronal apoptosis [32,124].

Specifically, in the PD pathobiology, there is a strong contribution of inflammatory cytokines in both motor and non-motor symptoms, mainly IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-10. Furthermore, polymorphisms in the TNF- α , IL1- β and IL-6 genes are related to a higher risk of PD [65,89,107,167]. Circulating and CNS levels of inflammatory cytokines have also been reported in patients with major depression [48,125] and in animal models [184]. In the blood of PD patients, studies have shown the presence of elevated levels of IL1- β and TNF- α . Interestingly, the latter has been reported to be significantly correlated with more severe depression, greater cognitive impairment, and more difficulty for sleeping in PD patients with non-motor symptoms [4,114]. In addition, Karpenko et al [80] investigated the status of cytokines present in PD patients taking into consideration the stage and clinical manifestations, and observed a correlation between the levels of IL-1 β in the serum and TNF- α in the CSF with the severity and rapid progression of PD, which supports the idea that inflammation in both periphery and CNS contributes to PD development. Besides, IL-10 was related to the degree of anxiety and depression among these patients [80]. Unlike TNF- α and IL-1 β , which are pro-inflammatory cytokines, IL-10 is generally considered to have predominantly anti-inflammatory effects. However, its acting is highly complex influencing immune response from helper T cells [122]. Although these studies agree that neuroinflammatory markers are present in the progression of PD, the expression profiles of each of them in the CNS vary according to the brain regions affected by these disease. According to Garcia-Esparcia and colleagues [57], there

are significant differences between TNF- α , IL1- β , IL-6, IL10 and IL-10 alpha receptor (IL10AR) levels between SNpc, putamen, and frontal cortex of postmortem patients with PD-related pathology, suggesting a region-specific inflammatory response [57].

Both central and peripheral inflammation may contribute to the etiology of PD and/or increase neurodegenerative processes inducing the synthesis of toxic metabolites. For example, TNF- α and IL1- β induce indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme activity on the CNS producing tryptophan catabolites (TRYCATs) such as kynurenine and quinolinic acid, which have been associated with depression in PD [5,186]. Quinolinic acid inhibits neurogenesis and cognition, while other TRYCATs, including 3-hydroxy kynurenine (3-HK) and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HA) directly affect mitochondrial function decreasing mitochondrial complexes I, II and IV [149]. In the CNS, IDO is expressed in microglia, astrocytes, neurons and infiltrating leukocytes, but the ability to produce toxic metabolites is best understood in microglia [62]. Then, central inflammation produced by neural cells and infiltrated leukocytes induces changes in tryptophan metabolism, favoring the synthesis of toxic molecules, which besides contributing to the degenerative process, decreases the synthesis of serotonin, a monoamine important for emotional behavior.

In addition, inflammatory cytokines have positive reciprocal interactions with oxidative and nitrosative stress, which leads to mitochondrial dysfunction, which is one of the main deleterious processes of PD, and its ability to trigger cell death is well described in regions of the nigrostriatal system in dopaminergic cells of patients [60] and experimental models [10,132]. Oxidative damage has been observed through levels of lipid peroxidation, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in serum, midbrain and striatum from different PD rodent models [111]. In rotenone-induced PD mice, Alabi and colleagues [2] demonstrated depressive behavior in animals and increased TNF- α and IL-6 in striatum, prefrontal cortex, and hippocampus, as well as increased lipid peroxidation and nitrite levels, and decreased glutathione reductase (GSH) [2]. Thus, the effects of the molecules produced during neuroinflammation have a key role in the PD-associated depression.

4. Microbiota, depression and Parkinson's disease: Is there a link already?

Today it is becoming more and more evident that the human body, especially the gut, is colonized by a swarm of commensal bugs, including not only bacteria but also fungi, viruses, archaea and protozoa [45,46]. Clinical and preclinical research has predominantly focused on the role of bacteria and their metabolites in chronic diseases such as Irritable Bowel Syndrome (IBS) and obesity, neuropsychiatric and neurodegenerative disorders such as Major Depressive Disorder (MDD), anxiety, Alzheimer's Disease (AD), Multiple Sclerosis (MS). Currently, the dysfunction of the gut microbiota or dysbiosis has been also associated with PD [45,147,158].

The gut microbiota is usually viewed as having an intimate and bidirectional connection with the brain and this communication is termed the gut-brain axis. The means of this crosstalk includes humoral (bacterial metabolites, immune and endocrine molecules, neurotransmitters) and neural routes (vagus nerve activation) through which body homeostasis is achieved [24,35,46,108]. Not surprisingly, the malfunction of this axis has been implicated in disease states [24,46,61].

Several preclinical [77,93,133,178] and clinical findings [96,98,134,140] support the involvement of gut microbiota dysfunction in the development or progression of PD. The interest in microbes in PD research originated from the fact that (i) α -synuclein (α Syn) aggregates are also observed in the enteric nervous system (ENS); (ii) PD patients often have gastrointestinal problems; (iii) PD patients have altered gut microbiota. Although the mechanisms by which the microbiota leads to PD are not yet fully understood, current data

suggested that microbiota is necessary for the development of PD. Working with α -synuclein-overexpressing (ASO) mouse, Sampson et al. [146] demonstrated that germ-free (GF)-ASO mice displayed less amount of aggregated α Syn, suggesting that microbes contribute to PD by interfering with α Syn aggregation/clearance pathways. Besides, when ASO mice were treated with a mixture of SCFAs they presented motor dysfunction compared to GF-ASO animals. In this context, SCFAs *per se* caused neuropathology and that was probably due to modulation of microglia activation and α Syn formation/clearance. Besides, fecal transplantation from PD patients to GF mice caused motor deficits in the recipient mice [146].

Microbiota dysfunction is also associated with depression in animal models of PD as well as in patients [52]. Although there are numerous studies postulating mechanisms underpinning depressive-like symptoms in rodent models of PD, including but not limited to modulation of 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors in the brain [101,183], as well as the hyperactivity of the lateral habenula [103,155,170,182], how dysbiosis contributes to depression in PD is yet to be elucidated. The only study available suggested that comorbid depression in PD is associated with the increased levels of *Christensenella minuta*, *Clostridium disporicum*, and *Oscillibacter valericigenes* [3]; even though these species have not been previously correlated with MDD and these results need to be corroborated by other studies. Previous research showed that the families Christensenella and Clostridium are associated with MDD patients without PD, but results for Oscillibacter are divergent [30,179]. Therefore, these data highlight the fact that depression in PD may also be due to dysbiosis.

In sum, some evidence reveal a direct role of microbiota in PD pathogenesis and in the future nutritional elements such as probiotics and prebiotics, which exhibit direct or indirect immunoregulatory properties, could be useful as a potential therapeutic tool for the treatment of depression-associated PD.

5. Novel therapeutic strategies for the treatment of depressive symptoms in Parkinson's disease

Selective serotonin reuptake inhibitors, dual reuptake inhibitors and dopamine agonists can improve depression in PD, however their use may be accompanied by some side effects [143]. For this reason, some efforts must be made to propose new pharmacological or non-pharmacological strategies that can decrease or even eliminate depressive symptoms.

5.1. Cannabidiol

Cannabidiol (CBD), the second main component of *Cannabis sativa* (cannabis), has shown therapeutic potential for the treatment of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases due to its antioxidant, anti-inflammatory and antidepressant properties [47]. CBD acts with low affinity for its receptors CB1 and CB2 and exerts its effects through various others receptors, including 5-HT_{1A} serotonin receptor, which has been implicated in a variety of pathological processes including anxiety and depression, by which it is possible to explain its anxiolytic and antidepressant effects [145].

Recent studies highlight that CBD is able to cope with mitochondrial dysfunction, inflammatory changes and protein aggregation, all features present in neurodegeneration. Its anti-inflammatory effects are related to strong ability to inhibit the production of inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6, and interferon- β (IFN- β) in LPS-stimulated murine microglial cells, by decreasing the activity of the NF- κ B signaling pathway, besides up-regulating the activation of the STAT3 transcription factor that induces anti-inflammatory events [87,135].

In *in vivo* and *in vitro* PD preclinical studies, most of the results with CBD are promising. Rats stimulated with 6-OHDA showed increased striatal dopamine content when treated for 2 weeks with 3mg/kg of CBD and positively regulated previously reduced levels of the

antioxidant enzyme superoxide dismutase. These effects were only observed after the immediate post-6-OHDA treatment with CBD, suggesting CBD's may be useful for slowing the disease progression in earlier, rather than later stages [47,56,94]. Neuroprotective effects of CBD have also been shown *in vitro* with both rotenone and MPTP-induced murine mesencephalic neurons. In the presence of rotenone, CBD reduced neuronal degeneration and restored glutathione levels, thus showing antioxidant activity, while in the presence of MPTP CBD also protected dopaminergic neuron against degeneration and increased neuron count by 117% [117,118]. Interestingly, in PD patients, CBD treatment for four weeks decreased non-motor symptoms [187]. Although further studies are needed, CBD has also been showing its benefits in anxiety or mood disorders. In patients with generalized social anxiety disorder, CBD significantly decreased anxiety and such effect was associated with its action on paralimbic and limbic areas [33]. In depression models using genetically modified mice and rats, CBD at dose of 50 mg/kg and 30 mg/kg, respectively, was sufficient to promote better performance in the anhedonia evaluation test, while in rats it even promoted the exploration of novel objects and increased locomotion, indicating antidepressant properties [100,151]. The therapeutic potential of CBD is currently under discussion and may be useful for the treatment of PD since it has antioxidative and anti-inflammatory pathways, which may also underlie non-motor symptoms of PD such as depression.

5.2. Omega-3

The omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) effects have also been discussed in several studies due to their performance in various biochemical functions, including synthesis of anti-inflammatory mediators, cell membrane fluidity, intracellular signaling and gene expression by epigenetic mechanisms [9,73]. Omega-3 is one of the major classes of PUFAs and comprises α -linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). DHA constitutes about 90% of omega-3 and 10 to 20% of total lipids present in the brain, and among its described functions in the literature stand out gene expression modulation, myelination, neuroinflammation and neuronal growth [20,39,172]. ALA is metabolized to generate EPA and DHA. However, humans are unable to synthesize ALA, requiring the intake of foods rich in such nutrients [19].

Dietary recommendations can alleviate some of the motor and non-motor symptoms in PD. According to Avallone et al [9], dietary treatment with omega-3 fatty acids may reduce inflammation and, consequently, depressive symptoms. Clinical trials with parkinsonian patients with depression treated for six months with 800 mg/day DHA and 290 mg/day EPA showed that patients had a 50% reduction in depressive symptoms assessed by Hamilton rating scale for depression (HDRS) [138]. In another double-blind study, Brazilian depressed-PD patients were evaluated by the Montgomery-Asberg Depression Scale (MADRS) and supplementation for three months with omega 3 capsules from fish oil led to high index of remission of depressive symptoms [37]. Moreover, cohort studies with a large population sample showed also a positive association between PUFAs intake and lower risk of developing PD [1,41].

In fact, thinking that only a dietary treatment can restore brain functions is really an utopia. However, these studies indicate that the intake of omega-3 can be used as adjuvant therapy. Thus, treatment with omega-3 fatty acids represents a promising biological tool in the treatment of neurodegenerative diseases, mainly in their early stages, which in the case of PD comprises the period during which non-motor symptoms such as depression may occur.

5.3. Physical activity

Physical activity can also be an extremely valuable therapeutic approach for the treatment of PD-associated depression. Physical

exercise contributes to brain plasticity and can thus improve clinical symptoms of PD. The benefits promoted by physical exercise result from the inhibition of oxidative stress, repair of mitochondrial damage and production of growth factors, and these properties suggest that exercise or physiotherapy may be beneficial to improve motor and non-motor symptoms, increasing quality of life of PD patients [38,175]. In depressive patients, aerobic exercise (three 45-minute sessions/week) was as effective as antidepressant treatment in reducing depressive symptoms after 16 weeks of treatment [14]. Clinical trials with parkinsonian patients who underwent aerobic exercise for 12 weeks twice a week showed an improvement in a range of parameters including mood [21]. Besides, patients with early-mid stage PD that participated in a prospective double-blinded randomized clinical trial and were evaluated by the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) for motor symptoms and the Beck Depression Inventory (BDI) for depressive symptoms, physical exercise not only improved motor and depressive symptoms, but such effects persisted for six months after the last day of exercise [38]. As reviewed by Szuhany, Bugatti and Otto [159], the benefits of exercise performed in various protocols may be mediated by increased of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) activity, which has been associated with neuroplasticity and hippocampal neurogenesis, factors that may contribute to an antidepressant effect [159].

According to the World Health Organization (WHO), 150 min of moderate-intensity aerobic physical activity or 75 min of vigorous-intensity physical activity per week is effective against PD symptoms, and higher volumes or intensities of physical activity will even bring greater benefits [174]. Physical therapy is indicated as an adjuvant in the treatment of PD mainly because it improves medication efficacy, gives benefits in motor and non-motor symptoms and the integration of patients with the community, consequently promotes better quality of life [175]. Moreover, aerobic exercise that includes brisk walking, running, bicycling, jumping rope and swimming represents a low cost and affordable alternative for poorer patient populations.

5.4. Other promising drugs

As already discussed in this review, pharmacological therapy indicated for the treatment of classic PD motor symptoms is represented by dopaminergic drugs. For depressive symptoms, the first-line drug therapy is selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) (eg sertraline, escitalopram) and serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) (eg venlafaxine, duloxetine), besides it is also common to optimize the dosage of the dopaminergic therapy to improve such symptoms [25,29]. However, antidepressant drugs, as well as dopaminergic agonists, are not able to slow the progression of neurodegeneration or recover lost neurons in the brain subregions responsible for these symptoms. Based on the need to alleviate depressive symptoms of PD, new drug-based approaches have been suggested to assist in the treatment of such symptoms and may also be able to improve the main symptoms of patients.

Several studies have tested the effectiveness of drug classes that are already used in the clinic for other conditions but not for PD. Drugs about the non-steroidal anti-inflammatory class have been suggested due to their anti-inflammatory properties by inhibiting cytokine production and COX isoforms [50]. Zaminelli and colleagues [180] observed an improvement in motor impairment and depressive behavior in rats with rotenone-induced PD following ibuprofen treatment; such effects were attributed to the anti-inflammatory and antioxidant capacity of the drug [180].

In addition to anti-inflammatory drugs, other classes of medications have also been more discussed regarding their effects on PD. Metformin, a representative of antidiabetic drug class, has been tested in experimental models in rodents and cultured cells and, although some results diverge due to the differences in the methodology, it generally demonstrates neuroprotective effects in PD treatment [36,177]. A recent study with depressed patients treated for 24 weeks

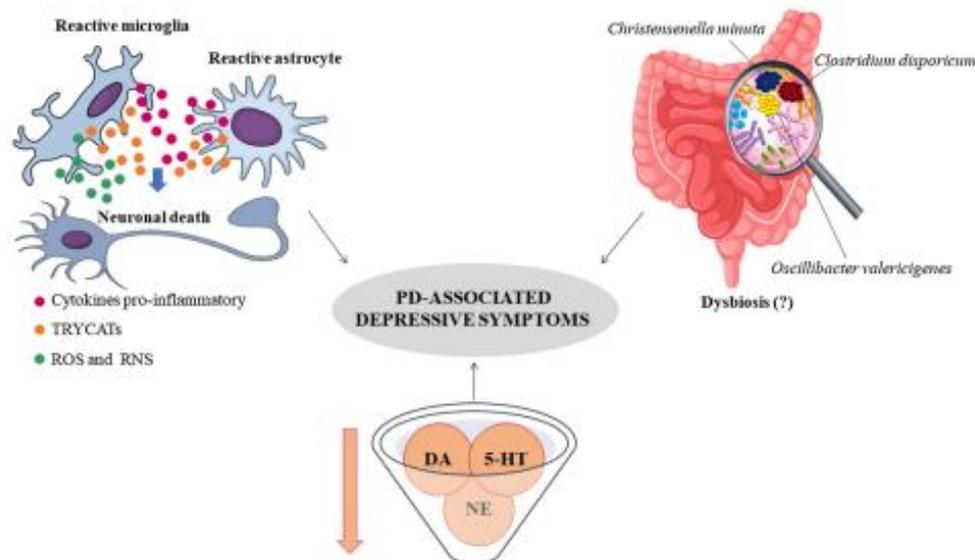


Fig. 1. Pathological processes underlying depressive symptoms associated with PD. Proinflammatory microglial and astrocytic profile release proinflammatory cytokines, tryptophan catabolites (TRYCATs), and reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) in the CNS leading to neuronal death and dopamine (AD), serotonin (5HT) and norepinephrine (NE) depletion, which may mediate the onset of depressive symptoms in PD patients. In addition, increased levels of *Christensenella minuta*, *Clostridium disporicum* and *Oscillibacter valericigenes* configure gut dysbiosis, which is thought to play a direct role in the pathogenesis of PD, including depressive symptoms.

with metformin showed an improvement in depressive symptoms, whereas in preclinical studies metformin potentiated the antidepressant effect of fluoxetine through mechanisms of hippocampal neuroplasticity involving growth factors as IGF2 and trophic factors as BDNF [63,85,136].

6. Conclusion and future perspectives

Clinical depression is the most prevalent affective disorder in PD and dampens quality of life of patients and caregivers, being the most determinant factor in the reduction of functionality. The pathophysiology of PD-associated depression is complex and includes alterations in monoaminergic system (dopamine, serotonin, and noradrenaline), as well as immunological impairment and gut dysbiosis (Fig. 1). L-DOPA treatment is the usual pharmacological therapy for the PD motor symptoms. However, the chronic L-DOPA can accentuate serotonin and noradrenalin disturbances, contributing to the aggravation of mood symptoms, especially in advanced-stage patients. Although their adverse effects, selective serotonin reuptake inhibitors and dual reuptake inhibitors are currently used to minimize the depression symptoms of PD. Nowadays, novel approaches have been proposed for treatment for PD-associated depression such as cannabidiol, anti-inflammatory and anti-diabetic drugs, omega-3 and physical activity although further research is needed to prove their effectiveness and include them in the standard treatment.

Authors contributions

LP.M wrote, conceived and created the figure. E.D.S.; A.J.M.C.F. wrote the manuscript. B.L.S.A.C. reviewed the manuscript. C.A.P. conceived, supervised, and reviewed the manuscript. All authors approved the final version of this paper.

Funding

The authors would like to express their gratitude to Pernambuco State Science and Technology Support Foundation (FACEPE/IBPG-1506-2.10/18), to the Research Excellence Program - Aggeu Magalhães Institute (IAM PROEP#400208/2019-9) and the Knowledge Generation Program - Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ;#VPPCB-007-FIO-18-2-17), the Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM; #465489/2014-1), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq;#301777/2012-8). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

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.

References

- [1] R.D. Abbott, G.W. Ross, L.R. White, W.T. Sanderson, C.M. Burchfiel, M. Kashon, D.S. Sharp, K.H. Masaki, J.D. Curb, H. Petrovich, Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: Recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study, *J. Neurol. Suppl.* 250 (2003) 30–39, <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1306-7>.
- [2] A.O. Alabi, A.M. Ajayi, B. Ben-Azu, A.G. Bakre, S. Umukoro, 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* 74 (2019) 172–183, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.07.003>.
- [3] V.M. Alifirova, N.G. Zhukova, I.A. Zhukova, Y.S. Mironova, V.A. Petrov, O.P. Izhdoldina, M.A. Titova, A.V. Latypova, M.A. Nikitina, Y.B. Dorofeeva, I.V. Saltykova, A.V. Tyakht, E.S. Kostyukova, A.E. Sazonov, Correlation between emotional-affective disorders and gut microbiota composition in patients with Parkinson's disease, *Ann. Russ. Acad. Med. Sci.* (2017), <https://doi.org/10.15690/vmm734>.

- [4] A. Alrafiah, E. Al-Ofi, M.T. Obaid, N. Alsomali, S. Muthuraju, Assessment of the levels of level of biomarkers of bone matrix glycoproteins and inflammatory cytokines from Saudi Parkinson patients, *Biomol Res. Int.* 2019 (2019) 2690205, <https://doi.org/10.1155/2019/2690205>.
- [5] G. Andersson, M. Maes, Neurodegeneration in Parkinson's disease: Interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins, *Mol. Neurobiol.* 49 (2014) 771–783, <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8554-z>.
- [6] G. Andersson, M. Seo, M. Berk, A.F. Carvalho, M. Maes, Gut permeability and microbiota in Parkinson's disease: role of depression, tryptophan catabolites, oxidative and nitrosative stress and melatonergic pathways, *Curr. Pharm. Des.* 22 (2016) 6142–6151, <https://doi.org/10.2174/138161282266616090>.
- [7] A. Arai, M. Tomiyama, K. Kannari, T. Kimura, C. Suzuki, M. Watanabe, T. Kawarabayashi, H. Shen, M. Shoji, Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter, *Synapse* 62 (2008) 632–635, <https://doi.org/10.1002/syn.20535>.
- [8] M. Asanuma, I. Miyazaki, N. Ogawa, Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease, *Neurotox. Res.* 5 (2003) 165–176, <https://doi.org/10.1007/BF0303137>.
- [9] R. Avallone, G. Vitale, M. Bertolotti, Omega-3 fatty acids and neurodegenerative diseases: new evidence in clinical trials, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4256, <https://doi.org/10.3390/ijms20194256>.
- [10] Jeong Beok, Jae Jeong, Kyoung Kim, So-Yoon Won, Young Chang, Jin Nam, Eun Cho, Tae-Boon Ahn, Eugene Bok, Won-Ho Shin, Byung Jin, Inhibition of microglia-derived oxidative stress by ciliary neurotrophic factor protects dopamine neurons in vivo from MPP⁺ neurotoxicity, *JMS* 19 (11) (2018) 3543 <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3543https://doi.org/10.3390/ijms19113543>.
- [11] M. Bèlanger, I. Allaman, P.J. Magistretti, Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation, *Cell Metab.* 14 (2011) 724–738, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- [12] K. Berghauzen-Maciejewska, J. Wardas, B. Kosmowska, H. Domin, M. Śmiakowska, U. Glowacka, K. Ossowska, Adaptive down-regulation of the serotonin transporter in the 6-hydroxydopamine-induced rat model of preclinical stages of Parkinson's disease and after chronic pramipexole treatment, *Neuroscience* 314 (2016) 22–34, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.049>.
- [13] O. Bernal-Pacheco, N. Limosai, C.L. Go, H.H. Fernandez, Nonmotor manifestations in parkinson disease, *Neurologist* 18 (2012) 1–16, <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31823d7abb>.
- [14] J.A. Blumenthal, M.A. Babyak, K.A. Moore, W.E. Craighead, S. Herman, P. Khatzi, R. Waugh, M.A. Napolitano, L.M. Forman, M. Appelbaum, P.M. Doraiswamy, K.R. Krishnan, Effects of exercise training on older patients with major depression, *Arch. Intern. Med.* 159 (1999) 2349–2356, <https://doi.org/10.1001/archinte.159.19.2349>.
- [15] J.M. Bonato, T.R. Bassani, H. Milani, M.A.F. Vital, R.M.W. 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>.
- [16] A. Borah, K.P. Mohanakumar, Long-term L-DOPA treatment causes indiscriminate increase in dopamine levels at the cost of serotonin synthesis in discrete brain regions of rats, *Cell. Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 985–996, <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9213-6>.
- [17] H. Braak, K. Del Tredici, Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff, *J. Parkinsons. Dis.* 7 (2017) 571–585, <https://doi.org/10.3233/JPD-179001>.
- [18] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R.A.I. De Vos, E.N.H.J. Steur, E. Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging* 24 (2003) 197–211, [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9).
- [19] J. Bradbury, Docosahexaenoic acid (DHA): An ancient nutrient for the modern human brain, *Nutrients* 3 (2011) 529–554, <https://doi.org/10.3390/nu3050529>.
- [20] J.T. Brenna, G.Y. Dhan, The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 77 (2007) 247–250, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.016>.
- [21] K.J. Bridgewater, M.H. Sharpe, Aerobic exercise and early parkinson's disease, *Neurobiol. Neural Repair* 10 (1996) 233–241, <https://doi.org/10.1177/154596839601000403>.
- [22] D. Brites, A. Fernandes, Neuroinflammation and depression: Microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation, *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015) 1–20, <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00476>.
- [23] T. Brudek, Inflammatory bowel diseases and parkinson's disease, *J. Parkinsons. Dis.* (2019) 1–14, <https://doi.org/10.3233/jpd-191729>.
- [24] A. Burokas, R.D. Moloney, T.G. Dinan, J.F. Cryan, Microbiota regulation of the mammalian gut-brain axis, *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier Ltd., 2015 <https://doi.org/10.1016/b.s.aambs.2015.02.001>.
- [25] V. Cabreira, J. Massano, Parkinson's disease: clinical review and update, *Acta Medica Cordoba.* 32 (2019) 661–670, <https://doi.org/10.20344/amp.11978>.
- [26] C. Carricini, M. Russo, F. Dono, M. Di Pietro, M.G. Rispoli, V. Di Stefano, L. Ferri, F. Barbone, M. Vitale, A. Thomas, S.L. Sensi, M. Onofri, L. Bonanni, A stage-based approach to therapy in Parkinson's disease, *Biomolecules* 9 (2019) 388, <https://doi.org/10.3390/biom9080388>.
- [27] T.N. Chase, L.K.Y. Ng, Central monoamine metabolism in Parkinson's disease, *Arch. Neurol.* 27 (1972) 486–491, <https://doi.org/10.1001/archneur.1972.00490180022006>.
- [28] A.J.M. Chaves-Filho, D.S. Macedo, D.F. Lucena, M. Maes, Shared microglial mechanisms underpinning depression and chronic fatigue syndrome and their comorbidities, *Behav. Brain Res.* 372 (2019) 111–975, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111975>.
- [29] P. Chen, H.C. Kales, D. Weintraub, F.C. Blow, L. Jiang, A.M. Mellow, Antidepressant treatment of veterans with Parkinson's disease and depression: Analysis of a national sample, *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 20 (2007) 161–165, <https://doi.org/10.1177/0891988707301866>.
- [30] S.G. Cheung, A.R. Goldenthal, A.C. Uhlmann, J.J. Mann, J.M. Miller, M.E. Sublette, Systematic review of gut microbiota and major depression, *Front. Psych.* 10 (2019) 00034, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00034>.
- [31] C. Choi, Y.H. Sohn, J.H. Lee, J.S. Kim, The effect of long-term levodopa therapy on depression level in de novo patients with Parkinson's disease, *J. Neurol. Sci.* 172 (2000) 12–16, [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(99\)00198-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(99)00198-7).
- [32] C.K. Combs, J. Colleen Karlo, S.C. Kao, G.E. Landreth, B-amyloid stimulation of microglia anti monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis, *J. Neurosci.* 21 (2001) 1179–1188, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-04-01179.2001>.
- [33] J.A.S. Crippa, G.N. Derenusson, T.B. Ferrari, L. Wichert-Ana, F.L.S. Duran, R. Martin-Santos, M.V. Simões, S. Bhattacharyya, P. Fusco-Poli, Z. Atakan, A. Santos-Filho, M.C. Freitas-Ferrari, P.K. McGuire, A.W. Zuardi, G.F. Busato, J.E.C. Hallak, Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: A preliminary report, *J. Psychopharmacol.* 25 (2011) 121–130, <https://doi.org/10.1177/0259688110379283>.
- [34] E. Croisier, L.B. Moisan, D.T. Deane, R.K. Pearce, R.B. Graeber, Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: Relationship to alpha-synuclein deposition, *J. Neuroinflam.* 2 (2005) 1–8, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-14>.
- [35] J.F. Cryan, S.M. O'Mahony, The microbiome-gut-brain axis: From bowel to behavior, *Neurogastroenterol. Motil.* 23 (2011) 187–192, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x>.
- [36] D.W. Curry, B. Stutz, Z.B. Andrews, J.D. Elsworth, Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in Parkinson's disease, *J. Parkinsons. Dis.* 8 (2018) 161–181, <https://doi.org/10.3233/JPD-171296>.
- [37] T.M. da Silva, R.P. Muehler, C. Alvarez, K. Naliwaiko, Á. Kiss, R. Andreatini, A.C. Ferraz, Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation, *J. Affect. Disord.* 111 (2008) 351–359, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.03.008>.
- [38] K. Dashtipour, E. Johnson, C. Kani, K. Kani, E. Hadi, M. Ghansary, S. Pezeshkian, J.J. Chen, Effect of exercise on motor and nonmotor symptoms of Parkinson's disease, *Parkinsons. Dis.* 2015 (2015) 5, <https://doi.org/10.1155/2015/586378>.
- [39] I. de Bus, R. Witkamp, H. Zuillhof, B. Albeda, M. Balvers, The role of n-3 PUFA-derived fatty acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation, *Prostag. Other Lipid Mediat.* 144 (2019) 106351, <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106351>.
- [40] M.A.J. de Carvalho, A. Chaves-Filho, A.G. de Souza, C.N.C. Lima, K.A. Lima, E.R.R. Vasconcelos, M.L. Feitosa, J.V.S. Oliveira, D.A.A. de Sousa, D.S. Macedo, F.C.F. de Souza, M.M.F. Fonteles, Proconvulsant effects of sildenafill citrate on pilocarpine-induced seizures: Involvement of cholinergic, nitergic and pro-oxidant mechanisms, *Brain Res. Bull.* 149 (2019) 60–74, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.04.008>.
- [41] L.M.L. De Lau, M. Bornebroek, J.C.M. Witteman, A. Hofman, P.J. Koudstaal, M.M.B. Breteler, Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: The Rotterdam Study, *Neurology* 64 (2005) 2040–2045, <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000166038.67153.9f>.
- [42] K. Del Tredici, U. Rüb, R.A.I. De Vos, J.R.E. Böhl, H. Braak, Where does P.D pathology begin in the brain, *J. Neurop. Exp. Neurol.* 61 (2002) 413–426.
- [43] J. Detka, A. Kurek, A. Basta-Kaim, M. Kubera, W. Lasona, B. Budziszewska, Neuroendocrine link between stress, depression and diabetes, *Pharmacol. Rep.* 65 (2013) 1591–1600, [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)01520-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)01520-2).
- [44] S.T. Dheen, K. Charanjit, E. Ling, Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 1189–1197, <https://doi.org/10.2174/092986707780597961>.
- [45] T. Dinan, J.F. Cryan, Gut Feelings on Parkinson's and Depression, *Cerebrum* 2017 (1–10) (2017) 28698775.
- [46] T.G. Dinan, R.M. Stilling, C. Stanton, J.F. Cryan, Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior, *J. Psychiatr. Res.* 63 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.02.021>.
- [47] S. Elaid, S. Klobber, B. Le Foll, Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings, *Molecular Basis of Neuropsychiatric Disorders: from Bench to Bedside*, first ed., Elsevier Inc., 2019 <https://doi.org/10.1016/b.s.pmb.2019.06.005>.
- [48] D. Enache, C.M. Pariante, V. Mondelli, 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. Behav. Immun.* 81 (2019) 24–40, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.015>.
- [49] K.L. Eskow Jaumaraj, J.A. George, C. Bishop, L-DOPA-induced dysregulation of extrastriatal dopamine and serotonin and affective symptoms in a bilateral rat model of Parkinson's disease, *Neuroscience* 218 (2012) 243–256, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.052>.
- [50] E. Esposito, V. Di Matteo, A. Benigno, M. Pierucci, G. Crescimanno, G. Di Giovanni, Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 205 (2007) 295–312, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.02.008>.
- [51] M.S. Fanselow, H. Dong, Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65 (2010) 7–19, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>.
- [52] V.D. Felice, E.M. Quigley, A.M. Sullivan, G.W. O'Keefe, S.M. O'Mahony, Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms, *Park. Relat. Disord.* 27 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.parkrel.2016.03.012>.
- [53] F. Fiory, G. Ferruolo, I. Cimmino, S. Cúbaro, F.C. Pignatola, C. Miele, F. Berginot, P. Formisano, F. Oriente, The relevance of insulin action in the dopaminergic system, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 1–16, <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00868>.

- [54] M. Fouyssac, D. Belin, Beyond drug-induced alteration of glutamate homeostasis, astrocytes may contribute to dopamine-dependent intrastriatal functional shifts that underlie the development of drug addiction: A working hypothesis, *Eur. J. Neurosci.* 50 (2019) 3014–3027, <https://doi.org/10.1111/ejn.14416>.
- [55] P.G. Frisvold, V. Hanoutian, L.S. Libow, The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease, *Park. Relat. Disord.* 15 (2009) 144–148, <https://doi.org/10.1016/j.parkrel.2008.04.038>.
- [56] M. García-Arencibia, S. González, E. de Lago, J.A. Ramos, R. Mechoulam, J. Fernández-Ruiz, Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties, *Brain Res.* 1134 (2007) 162–170, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.063>.
- [57] P. García-España, F. Llorens, M. Carmona, I. Ferrer, Complex deregulation and expression of cytokines and mediators of the immune response in Parkinson's disease brain in region dependent, *Brain Pathol.* 24 (2014) 584–598, <https://doi.org/10.1111/bps.12137>.
- [58] A. Ghosh, A. Kizawa, T. Sadhukhan, S.K. Das, J. Ray, Role of Dopamine β Hydroxylase (DBH) in Parkinson's disease patients of Indian population, *Mol. Cytogenet.* 7 (2014) P122, <https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-S1-P122>.
- [59] J.G. Goldman, R. Postuma, Premotor and non-motor features of Parkinson's disease, *Curr. Opin. Neurol.* 27 (2014) 434–441, <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000112>.
- [60] I. González-Casasuberta, D.L. Juárez-Flores, C. Morén, G. Garrabou, Bioenergetics and Autophagic Imbalance in Patient-Derived Cell Models of Parkinson Disease Supports Systemic Dysfunction in Neurodegeneration, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 1–20, <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00894>.
- [61] S. Grenham, G. Clarke, J.F. Cryan, T.G. Dinan, Brain-gut-microbe communication in health and disease, *vol. 2*, 2011, pp. 1–15, <https://doi.org/10.3389/fphs.2011.00094>.
- [62] G.J. Guillemin, G. Smythe, O. Takikawa, B.J. Brew, Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons, *Glia* 49 (2005) 15–23, <https://doi.org/10.1002/glia.20090>.
- [63] M. Guo, J. Mi, Q.M. Jiang, J.M. Xu, Y.Y. Tang, G. Tian, B. Wang, Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41 (2014) 650–656, <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12265>.
- [64] M. Guttmann, I. Boileau, J. Warsh, J.A. Saint-Cyr, N. Ginovart, T. McCluskey, S. Houle, A. Wilson, E. Mundo, P. Rajuan, J. Meyer, S.J. Kish, Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2007) 523–528, <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2007.01727.x>.
- [65] A. Håkansson, L. Westberg, S. Nilsson, S. Buerverich, A. Carmine, B. Holmberg, O. Sydow, L. Olsson, B. Johnels, E. Eriksson, H. Nissbrandt, Interaction of polymorphisms in the genes encoding interleukin-6 and estrogen receptor beta on the susceptibility to Parkinson's disease, *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* 133 B (2005) 88–92, <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30136>.
- [66] S. Happe, B. Schrodl, M. Fuld, C. Müller, E. Auff, J. Zeithofer, Sleep disorders and depression in patients with Parkinson's disease, *Acta Neurol. Scand.* 104 (2001) 275–280, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2001.00024.x>.
- [67] H. Hashiguti, D. Nakahara, W. Maruyama, M. Naoi, T. Ikeda, Simultaneous determination of in vivo hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat striatum by microdialysis-HPLC: relationship between dopamine and serotonin biosynthesis, *J. Neural Transm.* 93 (1993) 213–223.
- [68] M. Hei, P. Chen, S. Wang, X. Li, M. Xu, X. Zhu, Y. Wang, J. Duan, Y. Huang, S. Zhao, Effects of chronic mild stress induced depression on synaptic plasticity in mouse hippocampus, *Behav. Brain Res.* 365 (2019) 26–35, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.044>.
- [69] G.E. Hodes, M.L. Pflau, M. Leboeuf, S.A. Golden, D.J. Christoffel, D. Bregman, N. Rebusi, M. Heshmati, H. Aleyasin, B.L. Warren, B. Lebonoté, S. Horn, K.A. Lapidus, V. Stelzhammer, E.H.F. Wong, S. Bahn, V. Krishnan, C.A. Bolaños-Guzman, J.W. Murrough, M. Merad, S.J. Russo, Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) 16136–16141, <https://doi.org/10.1073/pnas.1415191111>.
- [70] H. Hu, Reward and Aversion, *Annu. Rev. Neurosci.* 39 (2016) 297–324, <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-014106>.
- [71] J.H. Hurst, P.A. LeWitt, R.S. Burns, N.L. Foster, W. Lovenberg, CSF dopamine-beta-hydroxylase activity in Parkinson's disease, *Neurology* 35 (1985) 565–568, <https://doi.org/10.1212/wnl.35.4.565>.
- [72] K. Imamura, N. Hishikawa, M. Sawada, T. Nagatsu, M. Yoshida, Y. Hashizume, Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains, *Acta Neuropathol.* 106 (2003) 518–526, <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0766-2>.
- [73] A.R. Isaac, E.A. Neves-da-Silva, R.J.B. de Matos, R.L. Augusto, G.M.M. Moreno, I.P. Mendonça, R.F. de Souza, P.E. Cabral-Filho, C.G. Rodrigues, C. Gonçalves-Pimentel, M.C.A. Rodrigues, B.L.S. Andrade-da-Costa, Low omega-6/omega-3 ratio in a maternal protein-deficient diet promotes histone-3 changes in progeny neural cells and favors leukemia inhibitory factor gene transcription, *J. Nutr. Biochem.* 55 (2018) 229–242, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.004>.
- [74] E. Jang, J.-H. Kim, S. Lee, J.-H. Kim, J.-W. Seo, M. Jin, M.-G. Lee, I.-S. Jang, W.-H. Lee, K. Suk, Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes, *J. Immunol.* 191 (2013) 5204–5219, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301637>.
- [75] V. Joers, M.G. Tansey, G. Mulas, A.R. Carta, Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease, *Prog. Neurobiol.* 155 (2017) 57–75, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.006>.
- [76] B. Johansson, B.E. Rook, 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's syndrome treated with L-DOPA, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 3 (1971) 232–235, <https://doi.org/10.1007/BF00565012>.
- [77] M.E. Johnson, A. Stringer, L. Bobrovskaya, Rotenone induces gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease, *Neurotoxicology* 65 (2018) 174–185, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.013>.
- [78] K. Kamari, H. Shen, A. Arai, M. Tomiyama, M. Baba, Reuptake of l-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum with dopaminergic denervation via serotonin transporters, *Neurosci. Lett.* 402 (2006) 62–65, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.059>.
- [79] O. Kano, K. Ikeda, D. Criderbring, T. Takazawa, Y. Yoshii, Y. Iwasaki, Neurobiology of depression and anxiety in parkinson's disease, *Parkinsons. Dis.* 2011 (2011) 143547, <https://doi.org/10.4061/2011/143547>.
- [80] M.N. Karpenko, A.A. Vasilishina, E.A. Gromova, Z.M. Muruzheva, A. Bernadotte, Interleukin-1 β interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- α levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease, *Cell. Immunol.* 327 (2018) 77–82, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.011>.
- [81] D.R. Kay, J.J. Tanner, D. Bowers, Sleep disturbances and depression severity in patients with Parkinson's disease, *Brain Behav.* 8 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.1002/beh3.967>.
- [82] S.P.V. Kessel, S. El Aidy, Bacterial Metabolites Mirror Altered Gut 3 Microbiota Composition in Patients 4 with Parkinson's Disease, *J. Park. Dis.* (2019), <https://doi.org/10.3233/JPD-191780>.
- [83] H. Kettenmann, U.K. Hanisch, M. Noda, A. Verkhratsky, Physiology of microglia, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 461–553, <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.
- [84] B. Khakh, M. Sofroniew, Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits, *Nat. Neurosci.* 18 (2017) 942–952, <https://doi.org/10.1038/nn.4043>.
- [85] S.A. Khadr, A.A. Elmehy, O.A. El-Kharashi, H.A. Abd-Elkhalik, 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 expression, *Naunyn. Schmiede. Arch. Pharmacol.* 391 (2018) 407–422, <https://doi.org/10.1007/s00201-018-1466-8>.
- [86] H.J. Kim, S.Y. Park, Y.J. Cho, K.S. Hong, J.Y. Cho, S.Y. Seo, D.H. Lee, B.S. Jeon, Nonmotor symptoms in de novo Parkinson disease before and after dopaminergic treatment, *J. Neurol. Sci.* 287 (2009) 200–204, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.07.026>.
- [87] E. Kozela, M. Pietr, A. Juknat, N. Rimmerman, R. Levy, Z. Vogel, Cannabinoids A9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF- κ B and interferon- β /STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 1616–1626, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069294>.
- [88] G.W. Kreutzberg, Microglia: A sensor for pathological events in the CNS, *Trends Neurosci.* 19 (1996) 312–318, [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7).
- [89] R. Krüger, C. Hardt, F. Tschentscher, S. Jickel, W. Kuhs, T. Müller, J. Werner, D. Wotalla, D. Berg, N. Kühn, G.A. Fuchs, E.J.M. Santos, H. Pruntek, J.T. Epples, L. Schöls, O. Riess, Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease, *J. Neural Transm.* 107 (2000) 553–562, <https://doi.org/10.1007/s007020070078>.
- [90] D.M. Kuhs, R.E. Arthur, L-DOPA-quinone inactivates tryptophan hydroxylase and converts the enzyme to a redox-cycling quinoprotein, *Mol. Brain Res.* 73 (1999) 78–84, [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00238-7).
- [91] J. Kulisevsky, J. Pagonbarraga, B. Pisuca-Sedano, C. García-Sánchez, A. Gironell, Prevalence and correlates of neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease without dementia, *Mov. Disord.* 23 (2008) 1889–1896, <https://doi.org/10.1002/mds.22246>.
- [92] 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 (2018) 3049–3066, <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0529-z>.
- [93] F. Lai, R. Jiang, W. Xie, X. Liu, Y. Tang, H. Xiao, J. Gao, Y. Jia, Q. Bai, Intestinal Pathology and Gut Microbiota Alterations in a Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Mouse Model of Parkinson's Disease, *Neurochem. Res.* 43 (2018) 1986–1999, <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2620-x>.
- [94] I. Lastres-Becker, F. Molina-Holgado, J.A. Ramos, R. Mechoulam, J. Fernández-Ruiz, Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.* 19 (2005) 96–107, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.11.009>.
- [95] A.F.G. Leentjens, M. Van den Akker, J.F.M. Metsmakers, M.A. Lousberg, F.R.J. Verhey, Higher incidence of Depression Preceding the Onset of Parkinson's Disease: A Register Study, *Movement Disorders* (2003), <https://doi.org/10.1002/mds.10385>.
- [96] F. Li, P. Wang, Z. Chen, X. Sui, X. Xie, J. Zhang, Alteration of the fecal microbiota in North-Eastern Han Chinese population with sporadic Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 707 (2019) 134297, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134297>.
- [97] S.A. Liddelov, K.A. Gutterman, L.E. Clarke, F.C. Bennett, C.J. Bohlen, L. Schirmer, M.L. Bennett, A.E. Minich, W.-S. Chung, T.C. Peterson, D.K. Wilton, A. Frouin, B.A. Nagler, N. Panicker, M. Kumar, M.S. Buckwalter, D.H. Rowitch, V.L. Dawson, T.M. Dawson, B. Stevens, B.A. Barres, Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, *Nature* 541 (2017) 481–487, <https://doi.org/10.1038/nature21029>.
- [98] A. Lin, W. Zheng, Y. He, W. Tang, X. Wei, R. He, W. Huang, Y. Su, Y. Huang, H. Zhou, H. Xie, Gut microbiota in patients with Parkinson's disease in southern China, *Park. Relat. Disord.* 53 (2018) 82–88, <https://doi.org/10.1016/j.parkrel.2018.05.007>.
- [99] D. Lindqvist, S. Hall, Y. Sarova, H.M. Nielsen, S. Janelidze, L. Brundin, O. Hansson, Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease - Associations with depression, fatigue, and cognitive impairment, *Brain. Behav. Immun.* 33 (2013) 183–189, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.07.007>.
- [100] R. Linge, L. Jiménez-Sánchez, I. Campa, F. Pilar-Cuellar, R. Vidal, A. Pazos, A. Adell, A. Díaz, Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and

- enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: Role of 5-HT1A receptors, *Neuropharmacology* 103 (2016) 16–26, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.017>.
- [101] K.C. Liu, J.-Y. Li, H.H. Tan, C.X. Du, W. Xie, Y.M. Zhang, W.L. Ma, L. Zhang, Serotonin_{1A} receptors in the dorsal hippocampus regulate depressive-like behaviors in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson's rats, *Neuropharmacology* 95 (2015) 290–298, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.031>.
- [102] X. Liu, J. Deng, R. Li, C. Tan, H. Li, Z. Yang, L. Chen, Y. Chen, X. Tian, ERβ-selective agonist alleviates inflammation in a multiple sclerosis model via regulation of MHC II in microglia, *Am. J. Transl. Res.* 11 (2019) 4411–4424 <https://doi.org/10.14236/ajtr.2019.11.4411>.
- [103] X.F. Luo, B.L. Zhang, J.C. Li, Y.Y. Yang, Y.F. Sun, H. Zhao, Lateral habenula as a link between dopaminergic and serotonergic systems contributes to depressive symptoms in Parkinson's disease, *Brain Res. Bull.* 110 (2015) 40–46, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.11.006>.
- [104] L. Ma, K.A. Domin, T.O. Kolesnikova, S.L. Kharsko, X. Zhu, X. Yuan, C. Song, D.A. Meshalkina, B.E. Leonard, L. Tian, A.V. Kaluff, Animal inflammation-based models of depression and their application to drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 12 (2017) 995–1009, <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1362385>.
- [105] M.M.F. Machado, T.B. Bassani, V. Coppola-Segovia, E.L.R. Moura, S.M. Zanata, R. Andreastri, M.A.B.F. Vital, PPAR-γ agonist pioglitazone reduces microglial proliferation and NF-κB activation in the substantia nigra in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease, *Pharmacol. Rep.* 71 (2019) 556–564, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.11.005>.
- [106] W. Maruyama, M. Naoi, A. Takahashi, H. Watanabe, Y. Konagaya, K. Mokuno, S. Hasegawa, D. Nakahara, The mechanism of perturbation in monoamine metabolism by L-DOPA therapy: in vivo and in vitro studies, *J. Neural Transm.* 90 (1992) 183–197, <https://doi.org/10.1007/bf01250960>.
- [107] K.M. Mattila, J.O. Rinne, T. Lehtimäki, M. Rönkä, J.P. Ahonen, M. Hurme, Association of an interleukin 1b gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients, *J. Med. Genet.* 39 (2002) 400–402, <https://doi.org/10.1136/jmg.39.6.400>.
- [108] E. Mayer, K. Tillisch, A. Gupta, E. Mayer, K. Tillisch, A. Gupta, Gut/brain axis and the microbiota find the latest version: Gut/brain axis and the microbiota, *J. Clin. Investig.* 125 (2015) 926–938, <https://doi.org/10.1172/JCI76304>.
- [109] R. Mayeux, Y. Stern, L. Coze, J.B.W. Williams, Altered serotonin metabolism in depressed patients with Parkinson's disease, *Neurology* 34 (1984) 642–646, <https://doi.org/10.1212/wnl.34.5.642>.
- [110] K.S.P. McNaught, P. Jenner, Altered glial function causes neuronal death and increases neuronal susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced toxicity in astrocyte/ventral mesencephalic co-cultures, *J. Neurochem.* 73 (1999) 2469–2476, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732469.x>.
- [111] M. Mei, Y. Zhou, M. Liu, F. Zhao, C. Wang, J. Ding, M. Lu, G. Hu, Antioxidant and anti-inflammatory effects of desrazoxane on dopaminergic neuron degeneration in rodent models of Parkinson's disease, *Neuropharmacology* 160 (2019) 107758, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107758>.
- [112] C. Ménard, M.L. Pflü, G.E. Hodes, S.J. Russo, Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience, *Neuropsychopharmacology* 42 (2017) 62–80, <https://doi.org/10.1038/npp.2016.90>.
- [113] B. Menon, R. Nayyar, S. Kumar, S. Cherkil, A. Venkatchalam, K. Surendran, K. Deepak, Parkinson's disease, depression, and quality-of-life, *Indian J. Psychol. Med.* 37 (2015) 144–148, <https://doi.org/10.4103/0253-7176.158611>.
- [114] M. Menza, R.D. Dobkin, H. Marin, M.H. Mark, M. Gara, K. Bienfait, A. Dicke, A. Kashekov, The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease, *Psychosomatics* 51 (2010) 474–479, <https://doi.org/10.1176/appi.ps.51.5.474>.
- [115] M. Menza, R.D. Dobkin, H. Marin, M.H. Mark, M. Gara, S. Buyske, K. Bienfait, A. Dicke, A controlled trial of antidepressants in patients with Parkinson disease and depression, *Neurology* 72 (2009) 886–892, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000336340.89821.53>.
- [116] J.H. Meyer, Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment, *J. Psychiatry Neurosci.* 32 (2007) 86–102, [https://doi.org/10.1016/j.s1180-4882\(07\)50013-2](https://doi.org/10.1016/j.s1180-4882(07)50013-2).
- [117] R. Moldzio, T. Pacher, C. Krewenka, B. Kranner, J. Novak, J.C. Duvigneau, W.D. Rausch, Effects of cannabinoids Δ(9)-tetrahydrocannabinol, Δ(9)-tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiol in MPP+ affected murine mesencephalic cultures, *Phytomedicine* 19 (2012) 819–824, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.04.002>.
- [118] R. Moldzio, B. Pöhn, C. Krewenka, B. Kranner, J.C. Duvigneau, W.-D. Rausch, 3,210 Phytocannabinoids Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Act Against Rotenone Induced Damages in Murine Cell Cultures, *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 (2012) S205–S206, [https://doi.org/10.1016/s1353-9020\(11\)70883-5](https://doi.org/10.1016/s1353-9020(11)70883-5).
- [119] L.H. Moraes, M.M.S. Lima, B.J. Martyniak, R. Santiago, T.T. Takahashi, D. Ariza, J.K. Barbiero, R. Andreastri, M.A.B.F. Vital, Characterization of motor, depressive-like and neurochemical alterations induced by a short-term rotenone administration, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 1081–1090, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2012.03.002>.
- [120] R.M. Moresco, T. Lavazza, S. Belloli, M. Lecchi, A. Pezzola, S. Todde, M. Matarrese, A. Carpinelli, E. Turolla, V. Zimarino, P. Popoli, A. Malgaroli, F. Fazio, Quinolinic acid induced neurodegeneration in the striatum: A combined in vivo and in vitro analysis of receptor changes and microglia activation, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 35 (2008) 704–715, <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0651-7>.
- [121] M.A. Mori, A.M. Delattre, B. Casabelli, C. Pudell, M. Bortolanza, P.V. Staziaki, J.V. Visentainer, P.F. Mostanther, 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 (2018) 341–351, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1280928>.
- [122] D.M. Mosser, X. Zhang, Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine, *Immunol. Rev.* 226 (2008) 205–218, <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x>.
- [123] R. Müssener, A. Henseberg, A. Schmitt, Y.V. Syagailo, M. Grüssle, T. Hennig, R. Simantov, M. Gerlach, P. Riederer, K.P. Lesch, Allelic variation of serotonin transporter expression is associated with depression in Parkinson's disease, *Mol. Psychiatry* 6 (2001) 350–352, <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000849>.
- [124] P.N. Moynagh, D.C. Williams, L.A.J. O'Neill, Interleukin-1 activates transcription factor NF-κB in glial cells, *Biochem. J.* 294 (1993) 343–347, <https://doi.org/10.1042/bj2940343>.
- [125] N. Müller, D. Krause, R. Barth, A.M. Myint, E. Weidinger, W. Stettinger, P. Zill, H. Drexhage, M.J. Schwarz, Childhood Adversity and Current Stress are related to Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Major Depression, *J. Affect. Disord.* 253 (2019) 270–276, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.04.088>.
- [126] C. Nasca, B. Bigio, D. Zelli, P. de Angelis, T. Lau, M. Okamoto, H. Soya, J. Ni, L. Brichta, P. Greenberg, R.L. Neve, F.S. Lee, B.S. McEwen, Role of the Astroglial Glutamate Exchanger xCT in Ventral Hippocampus in Resilience to Stress, *Neuron* 96 (2017) 402–413.e5, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.020>.
- [127] S. Navailles, A. Benazzouz, B. Bisoulac, C. Gross, P. De Dreuwerdère, High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-3,4-dihydroxyphenylalanine inhibit in vivo serotonin release in the prefrontal cortex and hippocampus in a rat model of Parkinson's disease, *J. Neurosci.* 30 (2010) 2356–2364, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5031-09.2010>.
- [128] M. Neal, D. Luo, D.S. Harischandra, R. Gordon, S. Sarkar, H. Jin, V. Anantharam, L. Desaubey, A. Kasthasamy, Arthi Kasthasamy, Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes, *Glia* 66 (2019) 2137–2157, <https://doi.org/10.1002/glia.23467>.
- [129] E.F. Osimo, L.J. Baxter, G. Lewis, P.B. Jones, G.M. Khandaker, Prevalence of low-grade inflammation in depression: A systematic review and meta-analysis of CRP levels, *Psychol. Med.* 49 (2019) 1958–1970, <https://doi.org/10.1017/S00332917190001454>.
- [130] 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 (2016) 1111–1122, <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1249997>.
- [131] H. Pantazopoulos, S. Berretta, In sickness and in health: Perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders, *Neural Plast.* 2016 (2016), <https://doi.org/10.1155/2016/9847696>.
- [132] E.S. Park, S.R. Kim, B.K. Jin, Transient receptor potential vanilloid subtype 1 contributes to mesencephalic dopaminergic neuronal survival by inhibiting microglia-originated oxidative stress, *Brain Res. Bull.* 89 (2012) 92–96, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.07.001>.
- [133] P. Perez-Pardo, H.B. Dodiya, P.A. Ergen, A. Naqib, C.B. Forsyth, S.J. Green, J. Garssen, A. Keshavarzian, A.D. Kraneveld, Gut bacterial composition in a mouse model of Parkinson's disease, *Benef. Microbes* 9 (2018) 799–814, <https://doi.org/10.3920/bm2017.0202>.
- [134] V.A. Petrov, I.V. Salykova, L.A. Zhukova, V.M. Alifirova, N.G. Zhukova, Y.B. Dorofeeva, A.V. Tyakht, B.A. Kovarsky, D.G. Alekseev, E.S. Kostryukova, V.S. Mironova, O.P. Izhdoldina, M.A. Nikitina, T.V. Perevozchikova, E.A. Fait, Y.V. Bobenko, M.T. Vakhitova, V.M. Govorun, A.E. Sizozov, Analysis of gut microbiota in patients with parkinson's disease, *Bull. Exp. Biol. Med.* 162 (2017) 734–737, <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3700-7>.
- [135] S. Pisanti, A.M. Malfitano, E. Ciaglia, A. Lamberti, R. Ranieri, G. Cuomo, M. Abate, G. Faggiola, M.C. Proto, D. Fiore, C. Lazzera, M. Bifulco, Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications, *Pharmacol. Ther.* 175 (2017) 133–150, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041>.
- [136] S. Poggini, M.T. Golia, S. Albani, G. Millor, L.P. Sciarria, A. Viglione, G.M. 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) 4651031, <https://doi.org/10.1155/2019/4651031>.
- [137] M. Politis, K. Wu, C. Loane, L. Kiferle, S. Molloy, D.J. Brooks, P. Piccini, Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's Disease: An in vivo 11C-DASB PET study, *Neurobiol. Dis.* 40 (2010) 216–221, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.028>.
- [138] M. Pomponi, G. Loria, S. Salvati, A. Di Biase, G. Cozzè, C. Vilella, E. Righino, C. Ciccarelli, P. Bria, G. La Torre, M.F.L. Pomponi, L. Janiri, A.R. Bentivoglio, DNA effects in Parkinson disease depression, *Basal Ganglia* 4 (2014) 61–66, <https://doi.org/10.1016/j.baga.2014.03.004>.
- [139] Y. Pylayeva-Gupta, Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of L-DOPA treatment, *Bone* 23 (2011) 1–7, <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [140] Y. Qian, X. Yang, S. Xu, C. Wu, Y. Song, N. Qin, S.D. Chen, Q. Xiao, Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease, *Brain. Behav. Immun.* 70 (2018) 194–202, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.016>.
- [141] D.A. Rastegar, N. Ho, G.M. Halliday, N. Dzakovic, Parkinson's progression prediction using machine learning and serum cytokines, *npj Park. Dis.* 5 (2019) 1–8, <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0086-4>.
- [142] P. Remy, M. Doder, A. Lees, N. Turjanski, D. Brooks, Depression in Parkinson's disease: Loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system, *Brain* 128 (2005) 1314–1322, <https://doi.org/10.1093/brain/awh445>.
- [143] I.H. Richard, M.P. McDermott, R. Kurlan, J.M. Lyness, P.G. Comi, N. Pearson, S.A. Factor, J. Juncos, C.S. Ramos, M. Brodsky, C. Manning, L. Marsh, L. Shulman, H.H. Fernandez, K.J. Black, M. Panisset, C.W. Christine, W. Jiang, C. Singer, S. Horn, R. Pfeifer, D. Rottenberg, J. Stevin, L. Elmer, D. Press, H. Hyson, W. McDonald, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antidepressants in Parkinson disease, *Neurology* 78 (2012) 1229–1236, <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182516244>.
- [144] D. Rossi, Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death, *Prog. Neurobiol.* 130 (2015) 86–120, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.04.003>.
- [145] E.B. Russo, A. Burnett, B. Hall, K.K. Parker, Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1A receptors, *Neurochem. Res.* 30 (2005) 1037–1043, <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>.
- [146] T.R. Sampson, J.W. Debelius, T. Thron, S. Jansson, G.G. Shastri, Z.E. Ilhan,

- C. Challis, C.E. Schretter, S. Rocha, V. Gradinaru, M.F. Chesselet, A. Keshavarzian, K.M. Shannon, R. Krajmalnik-Brown, P. Wittung-Stafshede, R. Knight, S.K. Mazmanian, Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease, *Cell* 167 (2016) 1469–1480.e12, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>.
- [147] S.F. Santos, H.L. de Oliveira, E.S. Yamada, B.C. Neves, A. Pereira, The Gut and Parkinson's Disease—A Bidirectional Pathway, *Front. Neurol.* 10 (2019) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00574>.
- [148] A. Schrag, Quality of life and depression in Parkinson's disease, *J. Neurol. Sci.* 248 (2006) 151–157, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.05.030>.
- [149] P.F. Schuck, A. Tosin, G. Da Costa Ferreira, C.M. Viegas, A. Latini, C.M. Wammacher, A.T.S. Wyse, C.S. Dutra-Filho, M. Wajner, Kynurenic acid impairs energy metabolism in rat cerebral cortex, *Cell. Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 147–160, <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9124-y>.
- [150] M. Shiba, J.H. Bower, D.M. Maraganore, S.K. McDonnell, B.J. Peterson, J.E. Ahlskog, D.J. Schaid, W.A. Rocca, Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: A case-control study, *Mov. Disord.* 15 (2000) 669–677, [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200007\)15:4<669::AID-MDS1011>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200007)15:4<669::AID-MDS1011>3.0.CO;2-5).
- [151] G. Shoval, L. Shikro, L. Hershkovitz, N. Hazut, G. Zalsman, R. Mechoulam, A. Weiler, Prohedonic effect of cannabidiol in a rat model of depression, *Neuropsychobiology* 73 (2016) 123–129, <https://doi.org/10.1159/000443890>.
- [152] T.P. Silva, A. Poli, D.B. Hara, R.N. 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>.
- [153] M. Sommerauer, T.D. Fedorova, A.K. Hansen, K. Knudsen, M. Otto, J. Jeppesen, Y. Frederiksen, J.U. Blücher, J. Geday, A. Nahimi, M.F. Damholdt, D.J. Brooks, P. Borghammer, Evaluation of the noradrenergic system in Parkinson's disease: an 11C-MeNER PET and neuromelanin MRI study, *Brain* 141 (2018) 496–504, <https://doi.org/10.1093/brain/awx348>.
- [154] M. Sommerauer, A.K. Hansen, P. Parbo, T.D. Fedorova, K. Knudsen, Y. Frederiksen, A. Nahimi, M.T. Barbe, D.J. Brooks, P. Borghammer, Decreased noradrenaline transporter density in the motor cortex of Parkinson's disease patients, *Mov. Disord.* 33 (2018) 1006–1010, <https://doi.org/10.1002/mds.27411>.
- [155] D. Sourani, R. Eitan, N. Gordon, G. Goelman, The habenula couples the dopaminergic and the serotonergic systems: Application to depression in Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.* 36 (2012) 2822–2829, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08200.x>.
- [156] B.J. Stanley, B.K. Yamamoto, L-dopa-induced dopamine synthesis and oxidative stress in serotonergic cells, *Neuropharmacology* 67 (2013) 243–251, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.010>.
- [157] J. Steiner, H. Biele, R. Brisch, P. Danos, O. Ullrich, C. Mawrin, H. Bernstein, B. Bogerts, Immunological aspects in the neurobiology of suicide: Elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide, *J. Psychiatr. Res.* 42 (2008) 151–157, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.10.013>.
- [158] M.F. Sun, Y.Q. Shen, Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease, *Ageing Res. Rev.* 45 (2018) 53–61, <https://doi.org/10.1016/j.jar.2018.04.004>.
- [159] K.L. Szuhany, M. Bugatti, M.W. Otto, A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor, *J. Psychiatr. Res.* 60 (2015) 56–64, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.10.003>.
- [160] S.K.H. Tan, H. Hartung, T. Sharp, Y. Temel, Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: A role for the subthalamic nucleus? *Neuropharmacology* 61 (2011) 387–399, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.006>.
- [161] M. Tansey, M. Goldberg, Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 510–518, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.004>.
- [162] G. Trendelenburg, U. Dirnagl, Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: Focus on ischemic preconditioning, *Glia* 51 (2005) 307–320, <https://doi.org/10.1002/glia.20204>.
- [163] O.B. Tynes, A. Storestein, Epidemiology of Parkinson's disease, *J. Neural Transm.* 124 (2017) 901–905, <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.
- [164] J. Vardi, S. Flechter, Z. Oberman, M. Allelov, J.M. Rabey, M. Hertzberg, M. Streifler, Plasma Dopamine Beta Hydroxylase (D. B. H.) Activity in Parkinsonian Patients Under L-Dopa, and 2-Bromo-Alpha-Ergocriptine Loading, *J. Neural Transm.* 46 (1979) 71–78, <https://doi.org/10.1007/bf01243430>.
- [165] C. Veazey, S.O.E. Aki, K.F. Cook, E.C. Lai, M.E. Kunik, Prevalence and treatment of depression in Parkinson's disease, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 17 (2005) 310–323, <https://doi.org/10.1176/jnp.17.3.310>.
- [166] R. Vertes, S. Linley, W.B. Hoover, Limbic circuitry of the midline thalamus, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54 (2015) 89–107, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.014>.
- [167] A.D. Wahner, J.S. Sinsheimer, J.M. Beorstein, B. Ritz, Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease, *Arch. Neurol.* 64 (2007) 836–840, <https://doi.org/10.1001/archneur.64.6.836>.
- [168] F. Walker, M. Nilsson, K. Jones, Acute and Chronic Stress-Induced Disturbances of Microglial Plasticity, Phenotype and Function, *Curr. Drug Targets* 14 (2013) 1262–1276, <https://doi.org/10.2174/1389450113149990208>.
- [169] Q. Wang, Y. Liu, J. Zhou, Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target, *Transl. Neurodegener.* 4 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0042-0>.
- [170] T. Wang, L. Zhang, Q.J. Zhang, Y. Wang, C.X. Du, Y.-N. Sun, J. Zhang, S.X. Lv, L. Chen, J. Liu, Involvement of lateral habenula c1 subunit-containing GABAA receptor-mediated inhibitory transmission in the regulation of depression-related behaviors in experimental Parkinson's disease, *Neuropharmacology* 116 (2017) 399–411, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.015>.
- [171] D. Weintraub, P.J. Moberg, J.E. Duda, I.R. Katz, M.B. Stern, Effect of Psychiatric and Other Nonmotor Symptoms on Disability in Parkinson's Disease, *J. Am. Geriatr. Soc.* 52 (2004) 784–788, <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2004.52219.x>.
- [172] M.J. Weiser, C.M. Butt, M.H. Mohajeri, Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan, *Nutrients* 8 (2016) 1–40, <https://doi.org/10.3390/n8020099>.
- [173] E.S. Wobbe, Neuron-microglia interactions in mental health disorders: "For better, and for worse", *Front. Immunol.* 7 (2016) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00544>.
- [174] World Health Organization, Global Recommendations on Physical Activity for Health 65 years and above, World Health Organization, 2011.
- [175] X. Xu, Z. Fu, W. Le, Exercise and Parkinson's disease, *Int. Rev. Neurobiol.* 147 (2019) 45–74, <https://doi.org/10.1016/bs.imr.2019.06.003>.
- [176] Y. Yamawaki, N. Yoshioka, K. Nozaki, H. Ito, K. Oda, K. Harada, S. Shirawachi, S. Asano, H. Aizawa, S. Yamawaki, T. Kanematsu, H. Akagi, Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice, *Brain Res.* 1680 (2018) 13–38, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.004>.
- [177] Q. Yan, C. Han, G. Wang, J.L. Waddington, L. Zheng, X. Zhen, Activation of AMPK/mTORC1-mediated autophagy by metformin reverses C1k1 deficiency-sensitized dopaminergic neuronal death, *Mol. Pharmacol.* 92 (2017) 640–652, <https://doi.org/10.1124/mol.117.109512>.
- [178] X. Yang, Y. Qian, S. Xu, Y. Song, Q. Xiao, Longitudinal analysis of fecal microbiome and pathologic processes in a rotenone induced mice model of Parkinson's disease, *Front. Aging Neurosci.* 9 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00441>.
- [179] M. Yu, H. Jia, C. Zhou, Y. Yang, Y. Zhao, M. Yang, Z. Zou, Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 231–239, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.008>.
- [180] T. Zaminelli, R.W. Gradowski, T.B. Bassani, J.K. Barbiero, R.M. Santiago, D. Maria-Ferreira, C.H. Baggio, M.A.B.F. Vital, Antidepressant and Antioxidative Effect of Ibutopren in the Rotenone Model of Parkinson's Disease, *Neurotox. Res.* 26 (2014) 351–362, <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9467-y>.
- [181] G. Zhang, G. Yang, J. Liu, Phloretin attenuates behavior deficits and neuroinflammatory response in MPTP induced Parkinson's disease in mice, *Life Sci.* 232 (2019) 116600, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116600>.
- [182] J. Zhang, Y. Wang, Y.-N. Sun, L.B. Li, L. Zhang, Y. Guo, T. Wang, L. Yao, L. Chen, J. Liu, Blockade of calcium-permeable AMPA receptors in the lateral habenula produces increased antidepressant-like effects in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats compared to sham-lesioned rats, *Neuropharmacology* 157 (2019) 107687, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107687>.
- [183] Q.J. Zhang, C.X. Du, H.H. Tan, L. Zhang, L.B. Li, J. Zhang, X.L. Niu, J. Liu, Activation and blockade of serotonin7 receptors in the prefrontal cortex regulate depressive-like behaviors in a 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease rat model, *Neuroscience* 311 (2015) 45–55, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.016>.
- [184] J. Zhong, G. Li, H. Xu, Y. Wang, M. Shi, Baicalin ameliorates chronic mild stress-induced depression-like behaviors in mice and attenuates inflammatory cytokines and oxidative stress, *Brazilian J. Med. Biol. Res. - Rev. Bras. Pesqui. medica e Biol.* 52 (2019) e8434, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198434>.
- [185] J. Zhu, Z. Hu, X. Han, D. Wang, Q. Jiang, J. Ding, M. Xiao, C. Wang, M. Lu, G. Hu, Dopamine D2 receptor restricts astrocytic NLRP3 inflammasome activation via enhancing the interaction of β -arrestin2 and NLRP3, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 2037–2049, <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0127-2>.
- [186] A. Zinger, C. Barcia, M.T. Herrero, G.J. Guillemin, The involvement of neuroinflammation and Kynurenic acid pathway in Parkinson's disease, *Parkinsons Dis.* 2011 (2011) 716859, <https://doi.org/10.4061/2011/716859>.
- [187] A.W. Zuardi, J.A.S. Crippa, J.E.C. Hallak, J.P. Pinto, M.H.N. Chagas, G.G.R. Rodrigues, S.M. Dursun, V. Tumas, Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease, *J. Psychopharmacol.* 23 (2009) 979–983, <https://doi.org/10.1177/0269811108096519>.

5. CONCLUSÃO

Ao final desta dissertação, conclui-se que:

- O tratamento com metformina e fluoxetina separadamente ou em associação apresentam efeitos antiparkinsonianos e anti-depressivos.
- Tais efeitos estão relacionados à processos anti-inflamatórios, autofágicos, neuroplásticos e neuroprotetores em modelo experimental de doença de Parkinson. Esses processos estão envolvidos na DP, e são relatados em humanos e em modelos experimentais.
- Os resultados obtidos até o momento são promissores, embora necessitem de investigações sobre vias intracelulares envolvidas nos processos citados.
- Finalmente, os resultados estão embasados em estudos prévios e indicam uma potencial estratégia polifarmacológica composta por metformina e fluoxetina para sintomas motores e não-motores da DP.

6. SÚMULA CURRICULAR

Durante o período referente ao mestrado foi apresentado trabalho no Congresso da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Realizada no Centro de Convenções de Campos do Jordão. Em Campos de Jordão-São Paulo. 2019.

7. REFERÊNCIAS

- BALLANGER B, KLINGER H, ECHE J, LEROND J, VALLET AE, LE BARS D, TREMBLAY L, SGAMBATO-FAURE V, BROUSSOLLE E, THOBOIS S. Role of serotonergic. A receptor dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. **Mov Disord**. 2012 Jan;27(1):84-9. doi: 10.1002/mds.23895. Epub 2011 Oct 12. PMID: 21994070.
- BISBAL M, SANCHEZ M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. **Neural Regen Res**. 2019 May;14(5):762-766. doi: 10.4103/1673-5374.249847. PMID: 30688258; PMCID: PMC6375050.
- BOLAM JP, HANLEY JJ, BOOTH PA, BEVAN MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. **J Anat**. 2000 May;196 (Pt 4)(Pt 4):527-42. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x. PMID: 10923985; PMCID: PMC1468095.
- BONATO JM, BASSANI TB, MILANI H, VITAL MABF, DE OLIVEIRA RMW. Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. **Exp Neurol**. 2018 Feb;300:188-200. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.11.009. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29162435.
- BOSCIA F, ESPOSITO CL, DI CRISCI A, DE FRANCISCIS V, ANNUNZIATO L, CERCHIA L. GDNF selectively induces microglial activation and neuronal survival in CA1/CA3 hippocampal regions exposed to NMDA insult through Ret/ERK signalling. **PLoS One**. 2009 Aug 3;4(8):e6486. doi: 10.1371/journal.pone.0006486. PMID: 19649251; PMCID: PMC2715099.
- BRAAK H, DEL TREDICI K. Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. **J Parkinsons Dis**. 2017;7(s1):S71-S85. doi: 10.3233/JPD-179001. PMID: 28282810; PMCID: PMC5345633.
- BRUDEK T. Inflammatory Bowel Diseases and Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**. 2019;9(s2):S331-S344. doi: 10.3233/JPD-191729. PMID: 31609699; PMCID: PMC6839501.
- CALABRESI P, CASTRIOTO A, DI FILIPPO M, PICCONI B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**. 2013 Aug;12(8):811-21. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70118-2. PMID: 23867199.
- CARRARINI C, RUSSO M, DONO F, DI PIETRO M, RISPOLI MG, DI STEFANO V, FERRI L, BARBONE F, VITALE M, THOMAS A, SENSI SL, ONOFRJ M, BONANNI L. A Stage-Based Approach to Therapy in Parkinson's Disease. **Biomolecules**. 2019 Aug 20;9(8):388. doi: 10.3390/biom9080388. PMID: 31434341; PMCID: PMC6723065.
- CHIA SJ, TAN EK, CHAO YX. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci**. 2020 Apr 2;21(7):2464. doi: 10.3390/ijms21072464. PMID:

32252301; PMCID: PMC7177377.

CHUNG ES, CHUNG YC, BOK E, BAIK HH, PARK ES, PARK JY, YOON SH, JIN BK. Fluoxetine prevents LPS-induced degeneration of nigral dopaminergic neurons by inhibiting microglia-mediated oxidative stress. **Brain Res.** 2010 Dec 2;1363:143-50. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.049. Epub 2010 Sep 18. PMID: 20858471.

CHUNG YC, KIM SR, PARK JY, CHUNG ES, PARK KW, WON SY, BOK E, JIN M, PARK ES, YOON SH, KO HW, KIM YS, JIN BK. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. **Neuropharmacology.** 2011 May;60(6):963-74. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.043. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21288472.

COSTA C, SGOBIO C, SILIQUINI S, TOZZI A, TANTUCCI M, GHIGLIERI V, DI FILIPPO M, PENDOLINO V, DE IURE A, MARTI M, MORARI M, SPILLANTINI MG, LATAGLIATA EC, PASCUCCI T, PUGLISI-ALLEGRA S, GARDENA F, DI LUCA M, PUCCINI B, CALABRESI P. Mechanisms underlying the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in experimental Parkinson's disease. **Brain.** 2012 Jun;135(Pt 6):1884-99. doi: 10.1093/brain/aws101. Epub 2012 May 4. PMID: 22561640.

DINIS-OLIVEIRA, R.J.; REMIÃO, F.; CARMO, H.; DUARTE, J.A.; NAVARRO, A.S.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v.27, n.6, p.1110-22,2006.

EISCH AJ, PETRIK D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science.* 2012 Oct 5;338(6103):72-5. doi: 10.1126/science.1222941. PMID: 23042885; PMCID: PMC3756889.

EMAMZADEH. 2017. Role of apolipoproteins and α -synuclein in Parkinson's disease. **J Mol Neurosci.** DOI 10.1007/S12031-017-0942-9.

ERBAŞ, O.; YILMAZ, M.; TASKIRAN, D. Levetiracetam attenuates rotenone-induced toxicity: A rat model of Parkinson's disease. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.42, p.226– 230,2016.

FANSELOW MS, DONG HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron.** 2010 Jan 14;65(1):7-19. doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.031. PMID: 20152109; PMCID: PMC2822727.

FIORY F, PERRUOLO G, CIMMINO I, CABARO S, PIGNALOSA FC, MIELE C, BEGUINOT F, FORMISANO P, ORIENTE F. The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. **Front Neurosci.** 2019 Aug 16;13:868. doi: 10.3389/fnins.2019.00868. PMID: 31474827; PMCID: PMC6706784.

GUERTIN DA, STEVENS DM, THOREEN CC, BURDS AA, KALAANY NY, MOFFAT J, BROWN M, FITZ-GERALD KJ, SABATINI DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. **Dev Cell.** 2006

Dec;11(6):859-71. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.007. PMID: 17141160.

GUYTON A.C., HALL J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª Edição. Elsevier editora Ltda. 2011. Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T. Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):92-6. doi: 10.1248/bpb.34.92. PMID: 21212524.

KANTHASAMY, A.G.; KITAZAWA, M.; KANTHASAMY, A.; ANANTHARAN, V. Dieldrin-induced neuro- toxicity: relevance to Parkinson's disease pathogenesis. **Neurotoxicology**, v.26, p.701–719, 2005.

KOHL Z, WINNER B, UBHI K, ROCKENSTEIN E, MANTE M, MÜNCH M, BARLOW C, CARTER T, MASLIAH E, WINKLER J. Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model. **Eur J Neurosci**. 2012 Jan;35(1):10-9. doi: 10.1111/j.1460- 9568.2011.07933.x. PMID: 22211740; PMCID: PMC3251944.

LEAL G, COMPRIDO D, DUARTE CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**. 2014 Jan;76 Pt C:639-56. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23602987.

LEENTJENS AF, VAN DEN AKKER M, METSEMAKERS JF, LOUSBERG R, VERHEY FR. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. **Mov Disord**. 2003 Apr;18(4):414-8. doi: 10.1002/mds.10387. PMID: 12671948.

LIM J, BANG Y, CHOI HJ. Abnormal hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: relevance to a new therapeutic target for depression with Parkinson's disease. **Arch Pharm Res**. 2018 Oct;41(10):943-954. doi: 10.1007/s12272-018-1063-x. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30136247.

MARTÍ Y, MATTHAEUS F, LAU T, SCHLOSS P. Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) differentially affects monoamine release and re-uptake in murine embryonic stem cell-derived dopamin- ergic and serotonergic neurons. **Mol Cell Neurosci**. 2017 Sep;83:37-45. doi: 10.1016/j.mcn.2017.06.009. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28673772.

MAYBERG HS, STARKSTEIN SE, SADZOT B, PREZIOSI T, ANDREZEJEWSKI PL, DANNALS RF, WAGNER HN JR, ROBINSON RG. Selective hypometabolism in the inferior frontal lobe in depressed patients with Parkinson's disease. **Ann Neurol**. 1990 Jul;28(1):57-64. doi: 10.1002/ana.410280111. PMID: 2375634.

Ministério da Saúde. Blog da Saúde - Doença de Parkinson. 2014.

MYCEK MJ, HARVEY RA, CHAMPE PC. **Farmacologia ilustrada**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 1998.

NISTICO, R.; MEHDAWY, B.; PICCIRILLI, S.; MERCURI, N. Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *International Journal of*

Immunopathology and Pharmacology, v.24, n.2, p.313-322,2011.

OBESO JA, RODRIGUEZ-OROZ MC, GOETZ CG, MARIN C, KORDOWER JH, RODRIGUEZ M, HIRSCH EC, FARRER M, SCHAPIRA AH, HALLIDAY G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nat Med**. 2010 Jun;16(6):653-61. doi: 10.1038/nm.2165. Epub 2010 May 23. PMID: 20495568.

PARENT A, HAZRATI LN. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. **Brain Res Rev**. 1995 Jan;20(1):128- 54. doi: 10.1016/0165-0173(94)00008-d. PMID: 7711765.

PENG T, LIU X, WANG J, LIU Y, FU Z, MA X, LI J, SUN G, JI Y, LU J, WAN W, LU H. Fluoxetine-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effects of Parkinson's disease. **Aging** (Albany NY). 2018 Dec 24;10(12):4188-4196. doi: 10.18632/aging.101716. PMID: 30585175; PMCID: PMC6326670.

PEREZ-CABALLERO L, TORRES-SANCHEZ S, BRAVO L, MICO JA, BERROCOSO E. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. **Expert Opin Drug Discov**. 2014 May;9(5):567-78. doi: 10.1517/17460441.2014.907790. Epub 2014 Apr 16. PMID: 24738878.

PURVES D., AUGUSTINE G.J., VITZPATRICK D., HALL W.C., LAMANTIA A.S., WHITE L.E., (2012) **Neurociências**. 3ª edition. Sinauer Associates. Massachusetts, U.S.A.

SAUER H, OERTEL WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**. 1994 Mar;59(2):401-15. doi: 10.1016/0306-4522(94)90605-x. PMID: 7516500.

SHIBA M, BOWER JH, MARAGANORE DM, MCDONNELL SK, PETERSON BJ, AHLKOG JE, SCHAID DJ, ROCCA WA. Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case- control study. **Mov Disord**. 2000 Jul;15(4):669-77. doi: 10.1002/1531- 8257(200007)15:4<669::aid-mds1011>3.0.co;2-5. PMID: 10928577.

SILVA, DIANA KLANOVICZ; ANDRADE, FABIANA MICHELSEN DE. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptção de serotonina: uma revisão. **Rev. psiquiatr**. Rio Gd. Sul, Porto Alegre , v. 30, n. 1, supl. 2008.

SIMONYAN K. Recent advances in understanding the role of the basal ganglia. **F1000Res**. 2019 Jan 30;8:F1000 Faculty Rev-122. doi: 10.12688/f1000research.16524.1. PMID: 30755797; PMCID: PMC6354324.

SPELLANTINI, M.G.; SCHMIDT, M.L.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. Alpha-synuclein in Lewy Bodies. **Nature**, v.388, n.6645, p.839-40.1997.

TAYMANS, J.M.; NKILIZA, A.; CHARTIER-HARLIN, M.C. Deregulation of protein translation control, a potential game-changing hypothesis for Parkinson's disease pathogenesis. **Trends in Molecular Medicine**, v.21, n.8, p.466–472, 2015.

TOFARIS GK, GARCIA REITBÖCK P, HUMBY T, LAMBOURNE SL, O'CONNELL M, GHETTI B, GOSSAGE H, EMSON PC, WILKINSON LS, GOEDERT M, SPILLANTINI MG. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. **J Neurosci**. 2006 Apr 12;26(15):3942-50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4965-05.2006. PMID: 16611810; PMCID: PMC6673887.

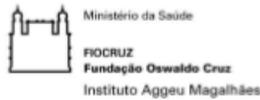
TYSNES OB, STORSTEIN A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm** (Vienna). 2017 Aug;124(8):901-905. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150045.

VEAZEY C, AKI SO, COOK KF, LAI EC, KUNIK ME. Prevalence and treatment of depression in Parkinson's disease. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**. 2005 Summer;17(3):310-23. doi: 10.1176/jnp.17.3.310. PMID: 16179652.

WALKER FR, NILSSON M, JONES K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. **Curr Drug Targets**. 2013 Oct;14(11):1262-76. doi: 10.2174/13894501113149990208. PMID: 24020974; PMCID: PMC3788324.

WANG SH, ZHANG ZJ, GUO YJ, ZHOU H, TENG GJ, CHEN BA. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. **J Psychopharmacol**. 2009 May;23(3):295-304. doi: 10.1177/0269881108089814. Epub 2008 Jun 18. PMID: 18562439.

ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DE PREBIÓTICOS (FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-OLIGOSSACARÍDEO) SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL E AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON” protocolado sob nº 169 /2021 pela pesquisadora Christina Alves Peixoto está de acordo com a Lei 11.794/2008 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 de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 01 de dezembro de 2024 com a finalidade de **pesquisa científica**. É responsabilidade da coordenadora do projeto notificar à CEUA sobre quaisquer alterações em relação ao projeto. A coordenadora concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados								
Animal	Espécie e linhagem	Quant. (total)	Sexo			Idade	Peso	Origem
			♂	♀	Ambos			
Camundongo	<i>Mus Musculus</i> C57BL/6	212	X			7 semanas	20-25g	Biotério de criação do IAM
Total		212						

Recife, 23 de setembro de 2021

Virginia M. Barros de Lorena

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