



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JOÃO GABRIEL FALCÃO DE MORAES

**EFEITOS DE PREBIÓTICOS SOBRE O
COMPROMETIMENTO MOTOR, NEURODEGENERAÇÃO E
NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA DE PARKINSON**

Recife
2024

JOÃO GABRIEL FALCÃO DE MORAES

**EFEITOS DE PREBIÓTICOS SOBRE O
COMPROMETIMENTO MOTOR, NEURODEGENERAÇÃO E
NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA DE PARKINSON**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Me. Ingrid Prata Mendonça
Coorientadora: Dr^a. Christina Alves Peixoto

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Moraes, João Gabriel Falcão de.

Efeitos de prebióticos sobre o comprometimento motor, neurodegeneração e neuroinflamação em modelo experimental de doença de parkinson / João Gabriel Falcão de Moraes. - Recife, 2024.

44p : il.

Orientador(a): Ingrid Prata Mendonça

Coorientador(a): Christina Alves Peixoto

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, apêndices, anexos.

I. Parkinson. 2. Prebióticos. 3. Terapia. 4. Neuroinflamação. 5. Microbiota. I. Mendonça, Ingrid Prata. (Orientação). II. Peixoto, Christina Alves. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

JOÃO GABRIEL FALCÃO DE MORAES

**EFEITOS DE PREBIÓTICOS SOBRE O
COMPROMETIMENTO MOTOR, NEURODEGENERAÇÃO E
NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA DE PARKINSON**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 26/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Me. Ingrid Prata Mendonça
IAM (FioCruz-PE) / Departamento de Entomologia

Me. Rodrigo Soares da Silva
IAM (FioCruz-PE) / Departamento de Entomologia

Profª. Drª. Karla Patrícia de Sousa Barbosa Teixeira
Universidade Federal de Pernambuco- CAV/Curso de Educação Física

Aos meus anjos da guarda Josias Lino de Moraes (*in memoriam*) e Omar dos Santos Falcão (*in memoriam*). Assim como, às madrinhas Nedy Vasconcellos de Moraes e Teresa Cristina Cardoso da Silva Falcão

Agradeço primeiramente a Deus, à Nossa Senhora, a São Bento, a São José, a São Alberto Magno, a São Lucas, ao meu anjo da guarda, e a todos os santos, mártires e anjos que intercedem por mim em todos os meus momentos e que, sem eles, eu não estaria aqui.

Gostaria de agradecer, também, enormemente as minhas orientadoras Ingrid e Christina por terem me acolhido no laboratório, pelos ensinamentos, pela paciência em me ensinar e ajudar em todas as minhas dúvidas e aprendizados, cujas experiências foram fundamentais para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório: Rodrigo, Ingrid, Igor, Laís, César, Samara, Neila, Débs, Nath, Karla, Duda e Bia por contribuírem com o meu aprendizado na vida acadêmica, terem lidado com todos os meus surtos, por todas as risadas, alegrias, companheirismo e me auxiliarem nos meus afazeres no laboratório.

Ao meu herói e maior inspiração, Omarzinho (*in memoriam*), que me deixou para a busca da vida eterna e que sempre Joãozinho fará de tudo para honrar o seu legado.

A minha família: Minha mãe (Marta), meu pai (João Bôsko), minhas irmãs (Malu, Bella e Bia), meus avôs (Moraes e Falcão) (*in memoriam*), minhas avós (Didi e Têê), meus tios (Sérgio e Paulo), minhas tias (Mônica, Ana Lúcia e Verônica), minha madrasta (Cris) e meu cunhado (Lucas) por todo o apoio desde o meu nascimento, que estiveram ao meu lado nas alegrias, nas tristezas, nos dias e nas noites e que não hesitaram em contribuir para a minha formação como pessoa, como cidadão e como profissional. Amo muito vocês, não há palavras suficientes para descrever vocês.

A minha namorada, Bruna, que foi a minha maior confidente, amiga, apoiadora, companheira, minha paixão e maior presente que a Biomedicina me deu para o resto da minha vida. Je t'aime, ma vie. Assim como, agradeço a toda a sua família espetacular. Amo vocês, muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos meus amados amigos: Leu, Leca, Sassá, Gabriel, Mari, Ducanto, Beka, João Victor, Gabi, Tayná, Álvaro e Bruna Maria, assim como todos os meus amigos e colegas que não foram citados, por me aguentarem todo esse tempo, nos surtos, na hiperatividade, nos áudios, nas ligações, na ansiedade e nos

desafios impostos a todos nós. Além disso, por todas as risadas, brincadeiras e ajudas. Muito obrigado por tudo e espero manter essas amizades e companheirismo para o resto da vida.

Às instituições FACEPE, FioCruz-PE e UFPE, assim como a todos os seus servidores, por todo o apoio, financiamento e confiança dedicados a mim e ao meu trabalho científico e acadêmico.

A todos os servidores e alunos vinculados ao curso de Biomedicina e ao Centro de Biociências, em especial os professores: Rosângela Frade, Marcos André e Thiago de Salazar, assim como todos os meus colegas de monitoria e de projeto de extensão.

Ao Hospital da Restauração e a todos os servidores do SEPAC por todo conhecimento ensinado, paciência e dedicação para me proporcionarem a experiência única da rotina clínica hospitalar..

“A melhor vida é aquela que nos é imposta por
decisão irrecorrível da consciência”

Joaquim Nabuco

MORAES, João Gabriel Falcão de. **EFEITOS DE PREBIÓTICOS SOBRE O COMPROMETIMENTO MOTOR, NEURODEGENERAÇÃO E NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON.** 2024. 44. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum no mundo, afetando aproximadamente 1% da população acima de 60 anos. É caracterizada por sintomas motores, como rigidez muscular, bradicinesia e tremores, e não-motores, como depressão, déficit cognitivo e sintomas gastrointestinais. Sua etiopatogenia está associada ao acúmulo de α -sinucleína e à degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc). A teoria de Braak sugere que a patologia da DP se inicia no trato gastrointestinal (TG) e se propaga ao sistema nervoso central (SNC), via nervo vago. Fatores como a alteração da microbiota intestinal também contribuem para esta patologia facilitando a proliferação de bactérias que produzem lipopolissacarídeos (LPS), causando inflamação, disfunção gastrointestinal, agregação de α -sinucleína intestinal e aumento da permeabilidade intestinal. Além disso, citocinas inflamatórias liberadas neste processo intestinal podem atingir a corrente sanguínea e adentrar o SNC, levando ao acúmulo de α -sinucleína e morte neuronal. Tratamentos atuais para DP focam na reposição de dopamina, mas são limitados em eficácia e possuem efeitos colaterais significativos. Prebióticos como frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS) vêm sendo investigados como alternativas terapêuticas devido a sua capacidade de estabilizar a microbiota intestinal, reduzir a inflamação sistêmica e regular a permeabilidade intestinal. Este estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos terapêuticos dos prebióticos FOS e GOS na DP experimental, especificamente sobre: a capacidade motora de camundongos induzidos com rotenona; a neuroinflamação e o acúmulo de alfa-sinucleína na substância negra; e as alterações na abundância de algumas espécies de bactérias intestinais. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, divididos em três grupos: CONTROLE, DP (induzidos com rotenona), DP+PREB (induzidos com rotenona e tratados com FOS e GOS). A rotenona foi administrada subcutaneamente a 2,5 mg/kg/dia por 20 dias, e os prebióticos foram administrados concomitantemente por via oral. Após o tratamento, os camundongos foram submetidos ao teste de rotarod e campo aberto para avaliação da coordenação motora e, posteriormente, a substância negra foi extraída para análise proteica. Os camundongos tratados com rotenona apresentaram déficits motores significativos no teste de rotarod, com menor tempo de latência para cair em comparação ao grupo controle. No entanto, os camundongos tratados com FOS e GOS mostraram melhora significativa na capacidade motora. Na análise proteica, a indução com rotenona aumentou a expressão de IBA-1, IL-1 β e iNOS na substância negra, indicando neuroinflamação. O tratamento feito com prebióticos diminuiu a reatividade microglial, diminuindo os níveis desses marcadores inflamatórios. Os prebióticos também aumentaram significativamente a abundância de *Lactobacillus reuteri*, *Desulfovibrio ssp* e *Alistipes ssp*, e diminuíram *Helicobacter hepaticus*. Logo, a combinação de FOS e GOS melhora os sintomas motores da DP em camundongos e reduz a neuroinflamação na substância negra, sugerindo uma ação moderadora no comprometimento motor e uma potencial ação terapêutica na DP. Estes resultados indicam que os prebióticos podem modular a inflamação induzida pela rotenona, representando uma abordagem promissora para o tratamento da DP.

Palavras-chave: Parkinson. Prebióticos. Terapia. Neuroinflamação. Microbiota.

MORAES, João Gabriel Falcão de. **EFFECTS OF PREBIOTICS ON MOTOR IMPAIRMENT, NEURODEGENERATION, AND NEUROINFLAMMATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE.** 2024. 44. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder in the world, affecting approximately 1% of the population over 60 years of age. It is characterized by motor symptoms such as muscle rigidity, bradykinesia and tremors; and non-motor, such as depression, cognitive impairment and gastrointestinal symptoms. Its etiopathogenesis is associated with the accumulation of α -synuclein and the degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc). Braak's theory suggests that PD pathology begins in the gastrointestinal tract (TG) and spreads to the central nervous system (CNS) via the vagus nerve. Factors such as changes in the intestinal microbiota also contribute to this pathology by facilitating the proliferation of bacteria that produce lipopolysaccharides (LPS), causing inflammation, gastrointestinal dysfunction, aggregation of intestinal α -synuclein and increased intestinal permeability. Furthermore, inflammatory cytokines released in this intestinal process can reach the bloodstream and enter the CNS, leading to the accumulation of α -synuclein and neuronal death. Current treatments for PD focus on dopamine replacement, but are limited in efficacy and have significant side effects. Prebiotics such as fructooligosaccharides (FOS) and galactooligosaccharides (GOS) have been investigated as therapeutic alternatives due to their ability to stabilize the intestinal microbiota, reduce systemic inflammation and regulate intestinal permeability. This study had the general objective of evaluating the therapeutic effects of FOS and GOS prebiotics in experimental PD, specifically on: the motor capacity of mice induced with rotenone; neuroinflammation and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra; and changes in the abundance of some species of intestinal bacteria. Male C57BL/6 mice were used, divided into three groups: CONTROL, DP (induced with rotenone), DP+PREB (induced with rotenone and treated with FOS and GOS). Rotenone was administered subcutaneously at 2.5 mg/kg/day for 20 days, and prebiotics were administered concomitantly orally. After treatment, the mice were subjected to the rotarod and open field test to evaluate motor coordination and, subsequently, the substantia nigra was extracted for protein analysis. Mice treated with rotenone showed significant motor deficits in the rotarod test, with a shorter latency time to fall compared to the control group. However, mice treated with FOS and GOS showed significant improvement in motor capacity. In protein analysis, rotenone induction increased the expression of IBA-1, IL-1 β and iNOS in the substantia nigra, indicating neuroinflammation. Treatment with prebiotics decreased microglial reactivity, reducing the levels of these inflammatory markers. Prebiotics also significantly increased the abundance of *Lactobacillus reuteri*, *Desulfovibrio ssp*, and *Alistipes ssp*, and decreased *Helicobacter hepaticus*. Therefore, the combination of FOS and GOS improves the motor symptoms of PD in mice and reduces neuroinflammation in the substantia nigra, suggesting a moderating action on motor impairment and a potential therapeutic action in PD. These results indicate that prebiotics can modulate rotenone-induced inflammation, representing a promising approach for the treatment of PD.

Key words: Parkinson's. Prebiotics. Therapy. Neuroinflammation. Microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Disfunção Mitocondrial na Doença de Parkinson.....	18
Figura 2 – Comparação entre a composição da microbiota intestinal entre pacientes com DP e indivíduos saudáveis.....	21
Figura 3 – Mecanismos da microbiota intestinal na DP.....	25
Figura 4 – Avaliação do comprometimento motor na DP.....	30
Figura 5 – Dosagem de TH e alfa-sinucleína em western blotting.....	31
Figura 6 – Avaliação quantitativa de IBA-1 na substância negra.....	32
Figura 7 – Avaliação quantitativa de iNOS e IL-1 β na substância negra.....	32
Figura 8 – Sequenciamento de DNA bacteriano intestinal.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGM	Carga Global de Morbidade
CL	Corpos de Lewy
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FOS	Frutooligossacarídeo
GOS	Galactooligossacarídeo
HCl	Ácido Clorídrico
IBA-1	Molécula Adaptadora de Ligação ao Cálcio Ionizado 1
IL-1 β	Interleucina -1 β
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
JNK	c-Jun N-terminal cinase
L-dopa	Levodopa
LPS	Lipopolissacarídeo
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NV	Nervo Vago
PMSF	Fluoreto de Fenilmetanosulfonil
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
SCFAs	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNpc	Substância Negra <i>pars compacta</i>
TG	Trato Gastrointestinal
TLR4	Receptores Toll-like 4
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
α -syn	Alfa-sinucleína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Sintomatologia e fisiopatologia da doença de Parkinson.....	16
2.2	Envolvimento do eixo microbiota-intestino-cérebro na doença de Parkinson.....	19
2.3	Terapêutica atual da doença de Parkinson: limitações e desafios.....	22
2.4	Prebióticos como potenciais nutracêuticos coadjuvantes no tratamento e prevenção da doença de Parkinson.....	23
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo Geral.....	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	Animais.....	26
4.2	Delineamento experimental.....	26
4.3	Teste motor rotarod.....	27
4.4	Teste motor do Campo Aberto.....	27
4.5	Extração da substância negra e obtenção das proteínas.....	28
4.6	Análise da expressão proteica de marcadores na substância negra.....	28
4.7	Sequenciamento e identificação das principais espécies da microbiota intestinal.....	28
4.8	Análises estatísticas.....	29
5	RESULTADOS	29
5.1	Prebióticos melhoram o déficit motor induzido pela rotenona.....	29
5.2	Prebióticos Atenuam Perda de Neurônios Dopaminérgicos e Acúmulo de α -sinucleína na Substância Negra.....	30
5.3	Prebióticos atenuam a reatividade microglial na substância negra.....	31
5.4	5.4 Prebióticos reestabelecem o equilíbrio de bactérias benéficas da microbiota intestinal.....	33
6	DISCUSSÃO.....	34

7	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	ANEXOS.....	43
	ANEXO A – Parecer do comitê de ética no uso de animais-	
	Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEUA/IAM).....	43

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum no mundo, com prevalência estimada de 1% na população acima dos 60 anos, sendo o primeiro, a doença de Alzheimer (Tysnes; Storstein, 2017). A DP é caracterizada pela presença de sintomas motores como o comprometimento progressivo da rigidez muscular, bradicinesia e tremores, e não-motores tais como depressão, déficit cognitivo, ansiedade e, mais frequente, sintomas gastrointestinais (Goldman; Postuma, 2014, Mendonça *et al.*, 2020). A DP é considerada uma doença de origem multifatorial, sendo o seu desenvolvimento favorecido por fatores como mutações genéticas, exposição a toxinas ambientais e envelhecimento (Olanow *et al.*, 2009).

A DP apresenta fisiopatogenia também diversa, sendo, principalmente, causada por mecanismos de neuroinflamação, acúmulo de agregados tóxicos de proteínas, estresse oxidativo e morte de neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra *pars compacta* (SNpc). (Pal *et al.*, 2016, Olanow *et al.*, 2019, Bhattarai *et al.*, 2021). Os tratamentos disponíveis atualmente para a DP incluem medicamentos que visam restituir a depleção de dopamina da SNpc a fim de tratar principalmente os sintomas motores. No entanto, tais medicamentos apresentam uma série de efeitos colaterais, além de limitada eficácia (Church, 2021).

As alterações gastrointestinais são os sintomas não motores mais frequentes na DP, cerca de 80% dos pacientes sofrem com algum distúrbio no trato gastrointestinal (TG). Segundo a teoria de Braak, o processo inflamatório relacionado à PD se inicia no TG e vai em direção ao cérebro por meio do sistema nervoso entérico (SNE) e sistema nervoso autônomo, via nervo vago, ao sistema nervoso central (SNC) em estágio prodrômico (Braak; Tredici, 2017, Brudek, 2019). Desta forma, alterações intestinais como desequilíbrio na microbiota intestinal, aumento da permeabilidade e inflamação intestinal também estão associadas a fatores de riscos para o desenvolvimento da DP (Clapp *et al.*, 2017, Johnson *et al.*, 2018)

Diante disso, devido a correlação entre a disbiose e a DP, a modulação da microbiota passou a ser de interesse terapêutico. Dessa forma, surgem os prebióticos que são fibras alimentares resistentes à acidez gástrica e à absorção gastrointestinal, sendo metabolizados apenas pela microbiota intestinal, onde estimulam aumento seletivo de bactérias intestinais benéficas conferindo benefícios à saúde do organismo (Holscher, 2017, Peterson, 2020).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sintomatologia e fisiopatologia da doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) ocupa a segunda posição em prevalência dentre os distúrbios neurodegenerativos, ficando em primeiro lugar, a Doença de Alzheimer (DA) (Tysnes; Storstein, 2017). Um dos fatores predisponentes à DP é o envelhecimento populacional, razão pela qual a doença é mais prevalente em pessoas acima de 60 anos. Segundo a Carga Global de Morbidade (CGM), em 2015, a população portadora da DP era de 7 milhões de pessoas, mostrando uma expectativa de aumento para 13 milhões de pessoas em 2040 (Dorsey *et al.*, 2018, Jankovic; Tan, 2020). A DP é caracterizada pela presença de sintomas motores tais como bradicinesia, rigidez muscular, queda de pressão e tremores, assim como os sintomas não-motores tais como depressão, ansiedade, déficit cognitivo, insônia, constipação, dismotilidade gastrointestinal e distúrbios urinários (Hilton *et al.*, 2014; Yemula *et al.*, 2021).

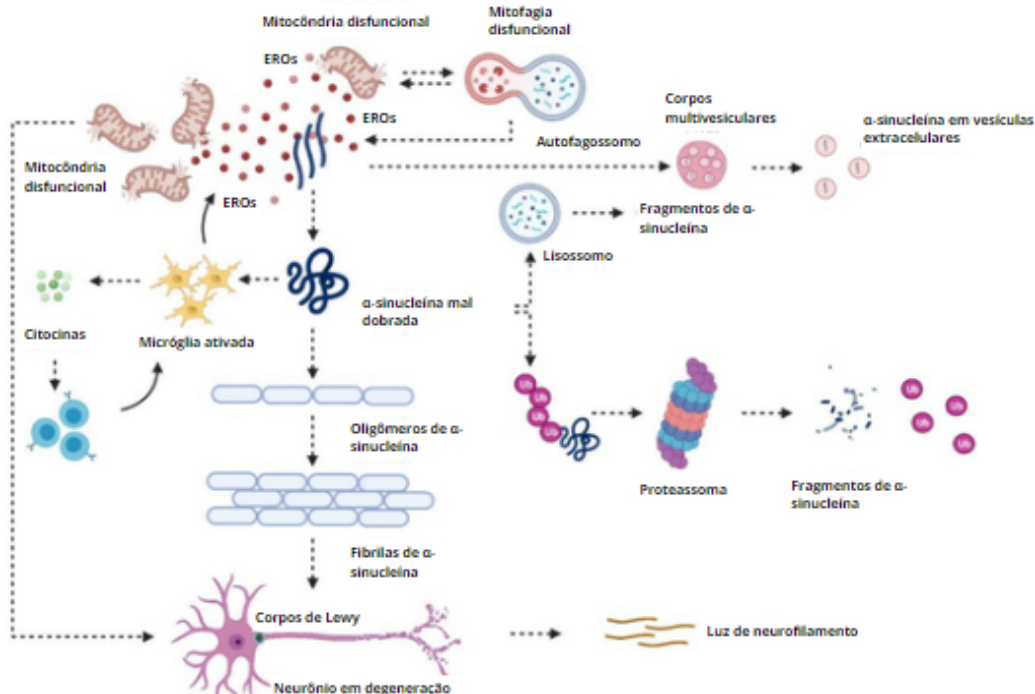
A etiopatogenia da DP se mantém obscura e tem sido objeto de estudos e investigações a fim de entender e desenvolver mecanismos profiláticos e terapêuticos para este distúrbio. Evidências científicas sugerem que os fatores ambientais e genéticos, e pré-condições como a Diabetes mellitus tipo 1, doenças autoimunes e obesidade, podem aumentar os riscos do desenvolvimento da DP (Brudek, 2019; Fiory *et al.*, 2019). Fisiologicamente, a DP é caracterizada pelo acúmulo de agregados de alfa-sinucleína (α -syn) citoplasmática na substância negra *pars compacta* (SNpc). A α -syn é uma proteína citoplasmática com função não totalmente conhecida, estudos sugerem que sua função fisiológica envolve a

formação e exocitose de vesículas sinápticas (Steiner *et al.*, 2018). No entanto, fatores diversos como mutações e alterações epigenéticas podem alterar a estrutura e função da α -syn, tornando-a disfuncional e promovendo seu acúmulo em oligômeros e fibrilas insolúveis que constituem estruturas intracelulares chamadas de Corpos de Lewy (CL), os quais podem levar à morte dos neurônios dopaminérgicos (Rocha *et al.*, 2018).

Além dos aglomerados de α -syn, outros processos celulares como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial também podem contribuir para a morte de neurônios. A disfunção mitocondrial está intimamente relacionada ao estresse oxidativo, que consiste no desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos antioxidantes presente nas células, causando um desequilíbrio mitocondrial nos neurônios (Picca *et al.*, 2021). Tais processos podem iniciar anos ou décadas antes do aparecimento dos sintomas motores (Beitz, 2014, Tarakad; Jankovic, 2020).

Além dos agrupamentos de α -syn e o estresse oxidativo, outro processo que está relacionado ao início e progressão da DP é a neuroinflamação. A reatividade de células da glia como astrócito e micróglia também são importantes no processo patológico da DP (Kam *et al.*, 2020). Vários estudos já observaram aumento de micróglia e astrócitos em modelos animais (Erny *et al.*, 2015) e em cérebros *post mortem* de pacientes com DP (Smajić *et al.*, 2022). Além disso, a microglia reativa pode produzir citocinas inflamatórias e EROs, exacerbando o processo degenerativo (Lazdon *et al.*, 2020).

Figura 1: Disfunção Mitocondrial na Doença de Parkinson



Fonte: Picca *et al.*, 2021 - modificado.

Legenda: Representação esquemática da disfunção mitocondrial para a neurodegeneração na doença de Parkinson. A disfunção mitocondrial decorrente de vias de controle de qualidade defeituosas (por exemplo, remoção e reciclagem de mitocôndrias danificadas) desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativa a cascata de agregação de α -sinucleína. O acúmulo de α -sinucleína mal dobrada ativa as células microgliais que atraem células da imunidade periférica dentro do sistema nervoso central por meio da liberação de citocinas.

Além disso, há estudos comprovando a influência de pesticidas como potencial causador de estresse oxidativo e metabólico nos animais, sendo a Rotenona um dos principais membros dessa classe (Innos; Hickey, 2021). A Rotenona atua como inibidor do complexo I da respiração celular e produtor de EROs, inibindo a transferência dos elétrons no complexo I na mitocôndria para a ubiquinona, bloqueando, assim, a fosforilação oxidativa e com síntese limitada de ATP submitocondrial, gerando EROs. A rotenona atua no processo inflamatório e neurodegenerativo relacionado à DP, ativando a microglia e, consequentemente, liberando as citocinas IL-1 β (Interleucina -1 β) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa). Além disso, ativa as vias de morte intracelular e inflamatórias como a JNK

(c-Jun N-terminal cinase), NF-kB (Fator Nuclear kappa B), Ciclooxygenase-2 (COX-2) e iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzível) (Radad *et al.*, 2019).

2.2 Envolvimento do eixo microbiota-intestino-cérebro na doença de Parkinson

A etiopatogenia da DP ainda não foi completamente elucidada. Contudo, diversos estudos têm explorado as possíveis causas dessa condição. Uma das hipóteses mais proeminentes é a hipótese de Braak, a qual envolve o eixo intestino-cérebro e afirma que o processo patológico característico da DP se inicia no TG, principalmente, pelo acúmulo de alfa-syn em células intestinais e glia entérica, e segue até o SNC, por meio do nervo vago (NV), e ativam células da microglia contribuindo para a morte neuronal. Recentemente, foi descrito que as células enteroendócrinas possuem propriedades semelhantes às dos neurônios, incluindo a expressão de alfa-syn (Braak; Tredici, 2017, Chandra *et al.*, 2017). O NV tem sua origem no núcleo motor dorsal da medula e se projeta, por meio do abdômen, às vísceras, possuindo fibras aferentes e eferentes. O NV participa do controle parassimpático primário na inervação do TG e atua também nos circuitos reflexos inflamatórios neuroimunes contribuindo para a regulação imunológica periférica, sendo assim, seu papel é fundamental para a comunicação intestino-cérebro (Houser; Tansey, 2017).

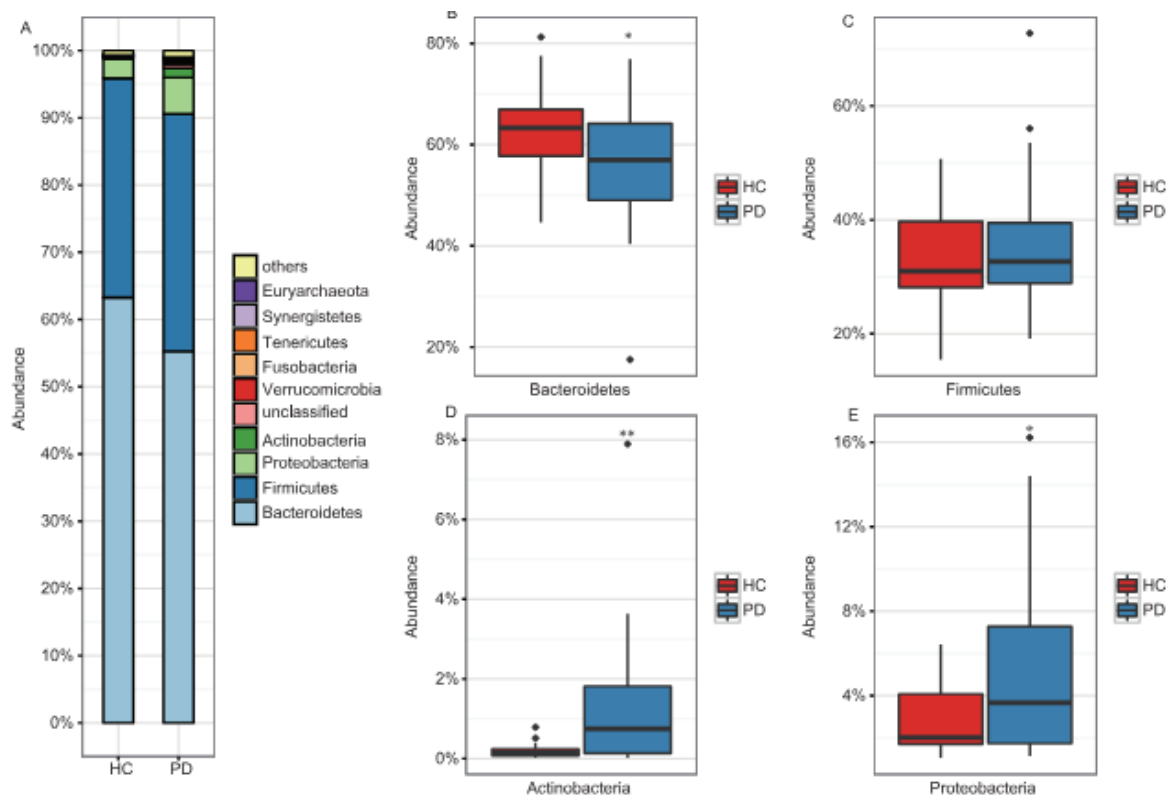
A microbiota intestinal representa um componente importante no eixo intestino-cérebro, tornando-o “eixo microbiota-intestino-cérebro”. Existem cerca de 100 trilhões de bactérias comensais habitando as mucosas intestinais, sendo os quatro filos que predominam na sua composição são o *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, os quais constituem quase 99% da diversidade das bactérias intestinais (Nishio; Honda, 2012, Li *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na metabolização de componentes não digeríveis, como certos polissacarídeos. No intestino distal, os microrganismos presentes fermentam esses carboidratos em etanol, gases (tais como H₂, CO₂, CH₄) e, principalmente, em SCFAs (Ácidos Graxos de Cadeia Curta, do inglês, Short-Chain Fatty Acid) (Miller; Wolin, 1996; Morrison; Preston, 2016; Ríos-Covián *et al.*, 2016). Os SCFAs principais são o acetato, propionato e butirato, que além de serem metabolizados pelos colonócitos, exercem importantes efeitos

metabólicos no organismo (Bloemen *et al.*, 2009). Esses ácidos graxos são capazes de regular o metabolismo hepático de lipídios e glicose (Den Besten *et al.*, 2013; Nishina; Freedland, 1990), bem como reduzir os níveis de insulina. Os SCFAs também podem exercer efeitos neuroendócrinos, contribuindo para o controle do apetite e do consumo alimentar (Morrison; Preston, 2016). Além disso, modulam o sistema imunológico e a resposta inflamatória através da inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B (Morrison; Preston, 2016; Hoyles *et al.*, 2018).

O desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, denominada disbiose, desempenha um importante papel no surgimento de várias doenças inflamatórias (Johnson *et al.*, 2018). Determinadas espécies de bactérias gram-negativas pertencentes aos filos Proteobacteria e Verrucomicrobiota apresentam em suas paredes celulares, os lipopolissacarídeos (LPS) que são endotoxinas bacterianas atuando como padrões moleculares associados a danos (DAMP). O LPS é reconhecido pelos Receptores Toll-Like 4 (TLR4) que são Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR), responsáveis pelo início do processo inflamatório. Por sua vez, a ativação dos receptores TLR4, pode ativar a via de sinalização do NF- κ B, contribuindo para a formação de citocinas pró-inflamatórias, como o IL-1 β e TNF- α , e, conseqüentemente, para o surgimento de várias doenças inflamatórias, síndrome do intestino irritável, diabetes, e doenças neurodegenerativas como a DP, sendo objeto de estudo em inúmeras pesquisas (Johnson *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2021; Esteves *et al.*, 2023; Proano *et al.*, 2023).

Figura 2: Comparação entre a composição da microbiota Intestinal entre pacientes com DP e indivíduos saudáveis



Fonte: Li *et al.*, 2017

Legenda: A: Comparação da abundância relativa de dez filos bacterianos mais abundantes nos grupos HC e PD; B-E: Comparação da abundância relativa dos quatro filos bacterianos dominantes: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria.

De acordo com estudo realizado por Li *et al.* (2017), a disbiose da microbiota intestinal está presente em pacientes com DP quando comparados ao grupo controle (Figura 2). Nos pacientes PD observa-se um aumento da abundância dos filos Actinobacteria e Proteobacteria, e uma redução da abundância do filo Bacteroidetes, apresentando, assim, uma diminuição quantitativa das bactérias benéficas ao microbioma intestinal e um aumento populacional de bactérias patogênicas, caracterizando assim a disbiose intestinal. Além disso, em estudos anteriores, percebe-se que há um aumento quantitativo da família *Enterobacteriaceae* e uma redução populacional da família *Prevotellaceae* nos grupos de pacientes acometidos com DP em comparação com grupos saudáveis favorecendo, assim, a diminuição dos níveis presentes de ácido graxos de cadeia curta e o aumento da produção de lipopolissacarídeos (LPS) (Alfonsetti *et al.*, 2022).

Portanto, a partir do processo inflamatório intestinal, há a formação de agrupamentos de α -syn no sistema nervoso entérico (SNE) que ascendem, fisiologicamente, e vão ao SNC através do NV. De acordo com Chen *et al.*, 2023 a α -syn tem comportamento semelhante aos príons, ou seja, transferem a outras proteínas a capacidade de formação de dobraduras incorretas, levando à alteração conformacional e agregação. Ao chegarem no SNC, os agregados de α -syn ativam células especializadas em defesa, como a micróglia, mudando seus respectivos formatos para forma ativa, amebóide, iniciando a liberação de fatores pró-inflamatórios, como a IL-1 β , o iNOS e a IBA-1, assim como outras citocinas e quimiocinas compatíveis com processos de estresse oxidativo, induzido a morte dos neurônios dopaminérgicos característicos da DP (Badanjak et al., 2021). Além disso, é importante destacar o papel atribuído à micróglia relacionado à disseminação do processo neuroinflamatório e neurodegenerativo, sendo fundamental para o entendimento da etiopatogenia da DP e sua respectiva importância para o desenvolvimento de fármacos e terapias para o combate à doença (Steiner *et al.*, 2018).

2.3 Terapêutica atual da doença de Parkinson: limitações e desafios

Em relação à DP, estima-se que há cerca de sete milhões de pessoas diagnosticadas com a DP globalmente, sendo mais comum em idosos acima de 60 anos de idade (Jankovic; Tan, 2020). Além disso, devido ao envelhecimento populacional, houve o interesse no desenvolvimento de terapias para o tratamento dos sintomas motores, tais como a discinesia, tremores, marcha lenta, instabilidade postural e rigidez, e não-motores, como a depressão, demência e constipação característicos da DP, a fim de melhorar a qualidade de vida da população acometida (Beitz, 2014, Hilton *et al.*, 2014). A DP é caracterizada como uma doença neurodegenerativa, onde há a morte de cerca de 60-80% dos neurônios dopaminérgicos pré-sinápticos, cujas estruturas são providas de proteínas transportadoras de dopamina que são responsáveis pela recaptação dopaminérgica na fenda sináptica. Estas refletem o grau neurodegenerativo e podem ser usados como marcador para a DP (Akdemir *et al.*, 2021).

As intervenções terapêuticas padrões para o tratamento sintomático da

disfunção psicomotora na DP incluem: farmacoterapia, estimulação cerebral e fisioterapia, que visam a atenuação dos sintomas motores e não motores, com destaque para a regulação do déficit dopaminérgico (Cacabelos, 2017). Entre os fármacos, destacam-se as terapias baseadas em agonistas da dopamina que mimetizam a dopamina se ligando aos seus receptores no SNC, e inibidores da monoamino oxidase B (MAO-B) que inativam enzimas que degradam a dopamina (Church, 2021). Além disso, a terapia de primeira escolha para o tratamento da DP é baseada na Levodopa (L-dopa), um precursor dopaminérgico que é convertida em dopamina por enzimas presentes no estriado (Nagatsu; Sawada, 2009).

A administração da L-dopa provou ser capaz de aliviar os sintomas iniciais da DP, mas, com o uso prolongado, há a diminuição da eficácia e surgem efeitos colaterais associados à aplicação deste fármaco (Alexander *et al.*, 1994). Dentre as adversidades observadas com o uso crônico da L-dopa, a literatura sugere o envolvimento de metabólitos da Levodopa no surgimento de sintomas tais como, a náusea, dor ortostática, hipotensão, sonolência diurna excessiva e distúrbios psiquiátricos (Bastide *et al.*, 2015). Para atenuar os sintomas, costuma-se associar a L-dopa a outros fármacos, como a inibidores da MAO-B, para aumentar a meia-vida e a biodisponibilidade na corrente sanguínea, ou ao aumento gradual das concentrações e aplicações das doses (Nonnekes *et al.*, 2016). Portanto, a L-dopa, mesmo sendo eficaz para o tratamento da DP inicial, apresenta desafios farmacodinâmicos que comprometem a administração a longo prazo (Lewitt, 2015), sendo necessário a busca por alternativas terapêuticas que auxiliem o tratamento para a DP na atenuação dos sintomas motores e não-motores.

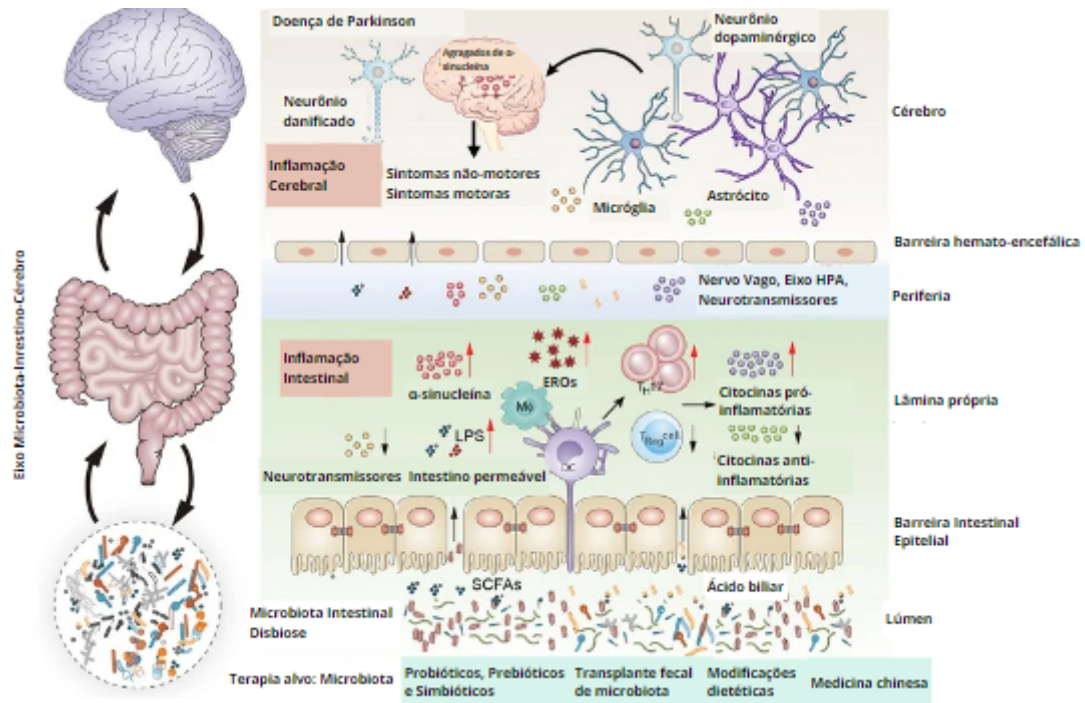
2.4 Prebióticos como potenciais nutracêuticos coadjuvantes no tratamento e prevenção da doença de Parkinson

A microbiota intestinal também desempenha um papel fundamental na modulação imunológica, metabólica e protetora para a saúde humana, sendo sua composição influenciada por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais do hospedeiro, como doenças pré-existentes, antibioticoterapias, idade, estresse e dietas (Holscher, 2017). Estudos demonstraram, recentemente, a influência de

componentes da dieta no desenvolvimento de doenças gastrointestinais, neurológicas e psiquiátricas. Dessa forma, surgem evidências que apoiam a tese que a dieta impacta, positivamente ou negativamente, o surgimento de doenças neurodegenerativas, como a DP (Jackson *et al.*, 2019, Knight *et al.*, 2022, Solch *et al.*, 2022). O aspecto dietético atua diretamente na qualidade nutricional do microbioma do hospedeiro, sendo objeto de estudo os nutrientes que compõem as duas dietas mais abundantes do mundo, a ocidental e a mediterrânea.

A dieta ocidental é caracterizada pelos elevados níveis de carboidratos refinados, gorduras saturadas, proteínas animais e excesso de sal, sendo um dos principais fatores para o desequilíbrio da microbiota intestinal e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade intestinal e produção de LPS por bactérias patogênicas para o organismo do hospedeiro (Ayten; Bilici, 2024). Em contraste, a dieta mediterrânea apresenta um perfil benéfico para o ser humano, sendo constituída por nozes, sementes, fibras, frutas e vegetais frescos, peixes, azeite de oliva, chás, ervas frescas e café. Nesse sentido, a dieta mediterrânea tem um papel importante na composição do microbioma, regulando a disbiose, na manutenção da integridade da barreira intestinal e na função gastrointestinal em pacientes acometidos com a DP, atenuando os sintomas de constipação (Salim *et al.*, 2023, Ayten; Bilici., 2024). Atualmente, pesquisas científicas propõem intervenções terapêuticas para a DP, na modulação da composição da microbiota intestinal, como a suplementação de prebióticos (Barichella *et al.*, 2016).

Figura 3: Mecanismos da microbiota intestinal na DP



Fonte: Zhu *et al.*, 2022. (modificado)

Legenda: A representação esquemática da disbiose da microbiota intestinal associada à doença de Parkinson. Várias terapias direcionadas à microbiota podem ser usadas para modificar a composição da microbiota intestinal para reverter uma condição disbiótica: probióticos, psicobióticos, prebióticos, simbióticos, pós-bióticos, transplante de microbiota fecal, modificações dietéticas e medicamentos chineses. .

Prebióticos são fibras alimentares que são resistentes à acidez gástrica, à hidrólise e à absorção gastrointestinal, portanto não são digeríveis, sendo metabolizados apenas pela microbiota intestinal, onde estimulam aumento seletivo de bactérias intestinais benéficas (Holscher, 2017). Entre os seus representantes, temos os frutooligossacarídeos (FOS) e os galactooligossacarídeos (GOS), que podem ser obtidos naturalmente, ao adicionar na dieta vegetais, como cebola, alho e aspargo, e frutas, como a banana, ou sinteticamente, por meio de fibras manipuladas farmacologicamente (Paiva *et al.*, 2020). A ingestão de prebióticos está relacionada ao aumento de atividade das bactérias produtoras de SCFAs, como a *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Akkermansia* sp., *Bacteroides* sp. e *Prevotella*, assim como, a diminuição de bactérias produtoras de LPS, como a

Enterobacteriaceae (Morrison; Preston, 2016). Além disso, fibras prebióticas podem auxiliar a atividade do sistema imune, mobilidade intestinal e constipação, sendo potenciais agentes terapêuticos para o tratamento dos sintomas não-motores cardinais da DP e modulação da neuroinflamação (Alfonsetti *et al.*, 2022, Zhu *et al.*, 2022).

3 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos terapêuticos dos prebióticos FOS e GOS em modelo experimental da Doença Parkinson.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os efeitos terapêuticos sobre o comprometimento motor em camundongos induzidos à DP com Rotenona;
- b) Avaliar a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos e o acúmulo de alfa-sinucleína na substância negra;
- c) Avaliar a neuroinflamação na substância negra por meio da análise dos marcadores (Iba-1, IL-1 β e iNOS);
- d) Avaliar as mudanças de composição da microbiota intestinal dos grupos de bactérias produtoras de SCFAs.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Camundongos machos de linhagem C57BL/6, com sete semanas de idade, foram adquiridos do biotério do Instituto Aggeu Magalhães (CEUA 169/2021). Os animais foram aclimatados à temperatura de 18-22°C em micro-isoladores, contendo 4 animais cada.

4.2 Delineamento experimental

Foram selecionados 30 animais subdivididos em 3 grupos experimentais (n = 10/grupo): (1) CONTROLE - Os animais foram submetidos à solução veículo por via subcutânea por 20 dias; (2) PD- Os animais foram induzidos com Rotenona (2,5mg/Kg) por via subcutânea por 20 dias; (3) PD+PREB - Os animais foram induzidos com Rotenona subcutânea (2,5mg/Kg) e tratados por gavagem com FOS e GOS, simultaneamente, por 20 dias. A Rotenona, foi diluída em solução veículo contendo 98% de óleo de girassol + 2% de DMSO, e administrada na dose de 2,5mg/Kg/dia por via subcutânea. Os prebióticos FOS e GOS foram diluídos em solução de água estéril e administrados nas doses de 3g/Kg/dia e 4g/Kg/dia, respectivamente por gavagem.

4.3 Teste motor 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; Mi-Ko, 2012). O protocolo utilizado neste 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).

4.4 Teste motor do Campo Aberto

O teste do campo aberto também representa uma avaliação motora do animal. Este teste consiste em uma caixa quadrada (45 cm x 45 cm) com paredes com 40 cm de altura que impedem a fuga do animal. O chão das caixas foi marcado com uma grade de linhas (separadas por 9 cm), sendo os camundongos colocados individualmente em um dos cantos do campo. O número de linhas cruzadas durante 5 minutos de sessão de teste foi registrado e posteriormente contabilizado como a distância total (Liu *et al.*, 2015). O teste do campo aberto foi realizado também no 20º dia de experimento.

4.5 Extração da substância negra e obtenção das proteínas

Um dia após o término do período de tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano (50mg/mL), decapitados e o cérebro foi coletado. Imediatamente, a SN foi extraída sobre uma superfície de gelo, e acondicionada a -80 °C. Posteriormente, as proteínas foram extraídas em tampão de lise (25mM de Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM de NaCl; 1% de Nonidet P-4; com 2mM de PMSF) e distribuídos em tubos de 1,5mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, e ao término da rotação, foi recolhido o sobrenadante e acondicionado a -80°C.

4.6 Análise da expressão proteica de marcadores na substância negra

As proteínas totais da substância negra dos animais foram extraídas, homogeneizadas, separadas em géis 6% –15% SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF e, em seguida, marcadas com os seguintes anticorpos: anti-IBA-1 (Wako 016-200001, 1:500), anti-IL1 β (Genway GWP-BPB232, 1:1000) e anti-iNOS (Abcam ab3523, 1:1000). Foram usados os anticorpos secundários de coelho (Sigma, A 9169, 1:400), conjugados com peroxidase. Bandas de proteína foram visualizadas pela incubação com Beyo ECL Plus (P0018, Beyotime, China) por 1 min e fotografado por um Gel Image System (Tanon, 5200, China). A densitometria foi realizada usando o software Image J.

4.7 Sequenciamento e identificação das principais espécies da microbiota intestinal

Após a eutanásia, amostras fecais (6 camundongos/grupo) foram coletadas e imediatamente colocadas a 4°C (no gelo) e posteriormente armazenadas a -80°C. A preparação da biblioteca de sequenciamento para identificação bacteriana foi preparada usando os primers V3/V4 16S rRNA gene 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (Qian *et al.*, 2018) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso *et al.*, 2012) e as amostras foram sequenciadas em um sistema MiSeq (Illumina, EUA), usando os primers Illumina padrão fornecidos pelo kit do fabricante. Os dados brutos do MiSeq foram processados usando um pipeline de propriedade da empresa Neopropecta (Christoff *et al.*, 2017). As classificações taxonômicas foram alocadas usando um banco de dados de sequência precisa de 16S rRNA definido em um nível de identidade de 99% (Christoff *et al.*, 2017) usando blastn v.2.6.0+ (Altschul *et al.*, 1990).

4.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio do ANOVA one-way, seguido de um teste a posteriori de Dunnett e Tukey, usando o GraphPad Prism v.07.

5 RESULTADOS

5.1 Prebióticos melhoram o déficit motor induzido pela rotenona

Nos testes motores rotarod e campo aberto, observou-se que o grupo PD apresentou déficits motores. No rotarod, o grupo DP apresentou menor tempo de latência para cair da plataforma cilíndrica rotatória (CONTROLE vs DP, $p = 0,0009$), indicando menor capacidade de locomoção em relação aos camundongos do grupo CONTROLE. Já os camundongos tratados com FOS e GOS do grupo DP+PREB apresentaram maior tempo de latência em relação ao grupo DP (DP+PREB vs DP, $p = 0,0071$), indicando maior capacidade motora. No teste do campo aberto, foi avaliado o parâmetro do número de cruzamentos. O número de cruzamentos foi reduzido nos animais do grupo DP em relação ao grupo CONTROLE (CONTROLE

vs DP, $p = 0,0002$), indicando que os animais apresentaram dificuldade para andar, ou bradicinesia. No entanto, o tratamento com prebióticos aumentou o número de cruzamentos (DP+PREB vs DP, $p = 0,0034$) no grupo DP+PREB em relação ao grupo DP, indicando uma melhora no comportamento exploratório e atenuação da bradicinesia.

Figura 4: Avaliação do comprometimento motor na DP

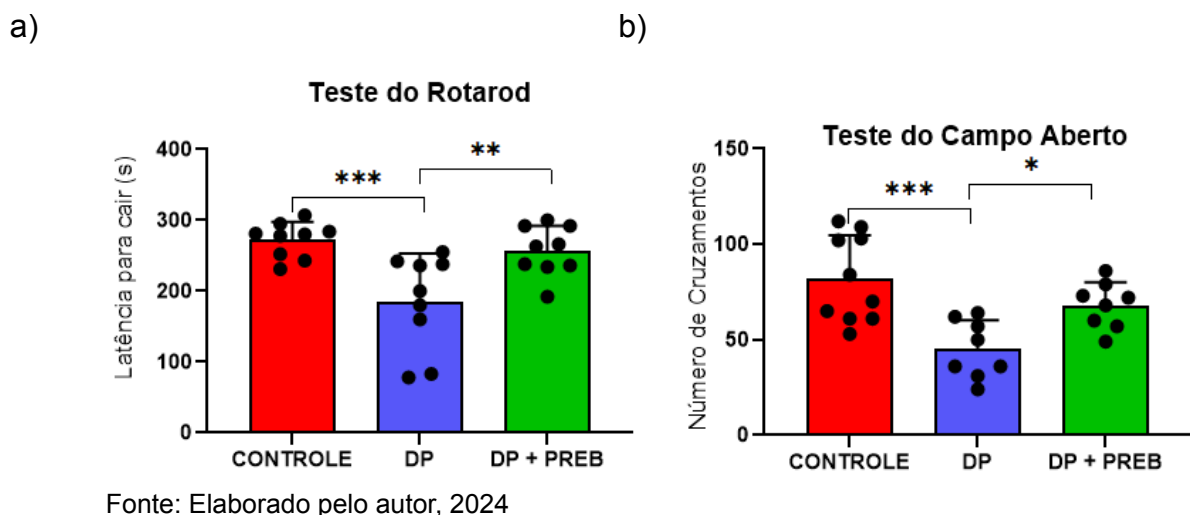


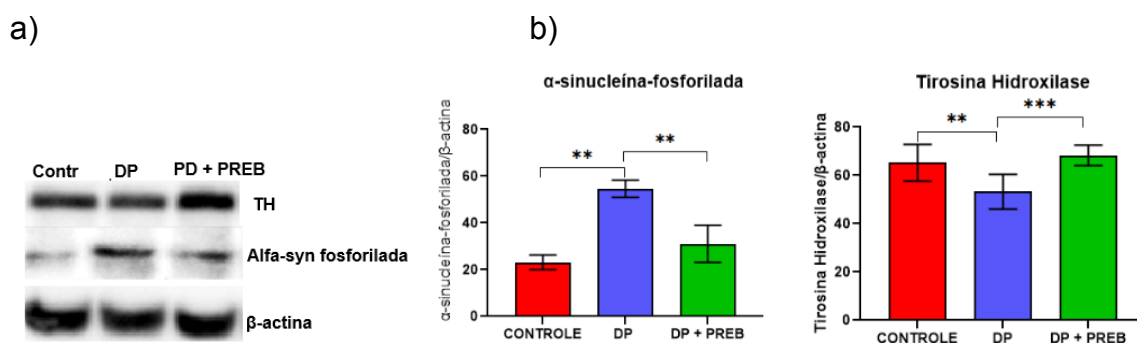
Figura 4 – a) Teste do rotarod: resultados expressos sob o parâmetro de latência para cair da plataforma cilíndrica rotatória, em segundos (s). ($p^{**}=0,0088$) ($p^{***}=0,0016$). b) Teste do campo aberto: resultados expressos sob os parâmetros de quantidade de movimentos de cruzamentos ($p^{*}=0,0421$) ($p^{***}=0,0006$); (ANOVA ONE WAY seguido de TUKEY A POSTERIORI)

5.2 Prebióticos atenuam perda de neurônios dopaminérgicos e acúmulo de α -sinucleína na substância negra

Os animais que receberam rotenona apresentaram a perda de neurônios dopaminérgicos, evidenciada pela diminuição da expressão da enzima tirosina

hidroxilase (TH) (DP vs CONTROLE, $p = 0,0038$) e aumento de alfa-sinucleína fosforilada nos animais induzidos à PD (DP vs CONTROLE, $p = 0,032$). No entanto, o tratamento com prebióticos foi capaz de atenuar a perda neuronal dopaminérgica (DP+PREB vs DP, $p = 0,0007$) e reduzir a expressão da α -sinucleína fosforilada (DP+PREB vs DP, $p = 0,0009$).

Figura 5: Dosagem de TH e alfa-sinucleína em western blotting



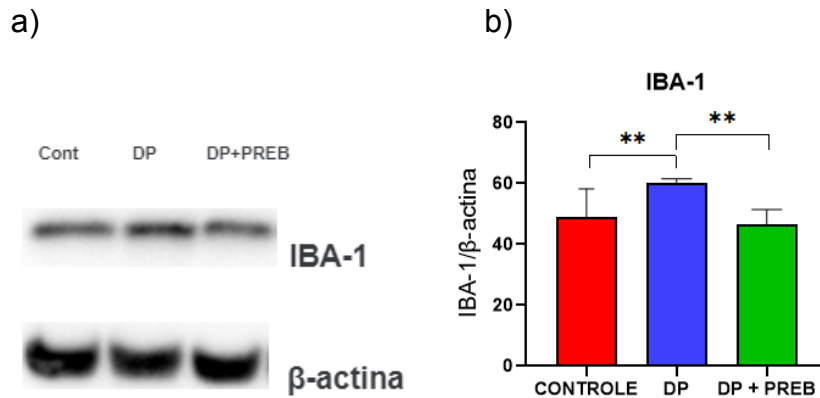
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Figura 5: a) Imagens representativas de Western blotting de TH e alfa-sinucleína na substância negra; b) Imagens gráficas de western blotting de alfa-sinucleína fosforilada (CONTROLE vs DP $p^{**}=0,032$, DP +PREB vs DP $p^{**}=0,0009$) e TH na substância negra. ($p^{**}=0,0038$), ($p^{***}=0,0007$). (ANOVA ONE WAY seguido de TUKEY A POSTERIORI)

5.3 Prebióticos atenuam a reatividade microglial e neuroinflamação na substância negra

A indução com rotenona causou aumento da expressão da proteína IBA-1, indicando aumento de micróglia reativa (DP vs CONTROLE, $p = 0,0070$). O tratamento com prebióticos atenuou este aumento, diminuindo a reatividade microglial através da redução dos níveis de IBA1 no grupo tratado em comparação ao grupo DP (DP+PREB vs DP, $p = 0,0012$).

Figura 6: Avaliação quantitativa de IBA-1 na substância negra

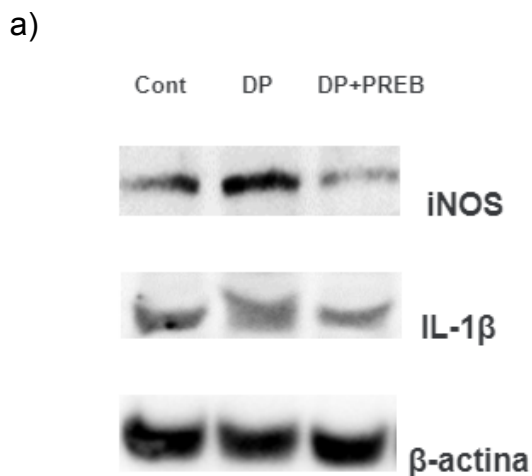


Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

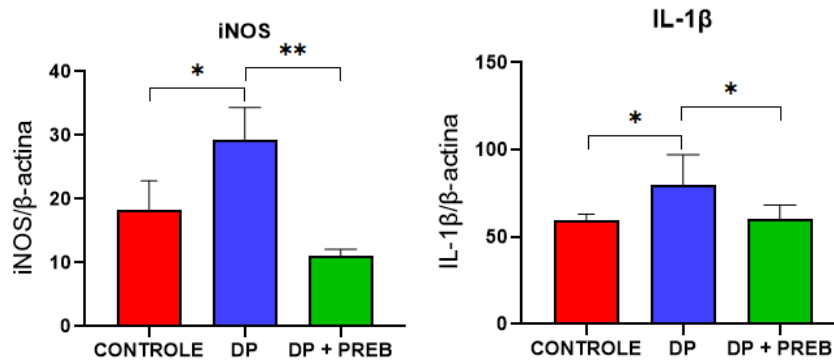
Figura 6 – a) Imagens representativas de Western blotting de IBA-1 e β-actina na substância negra; b) Imagens gráficas de Western blotting de IBA1 na substância negra. (CONTROLE vs DP $p^{**}=0,0070$; DP + PREB vs DP $p^{**}=0,0012$). (ANOVA ONE WAY seguido de TUKEY A POSTERIORI)

Além disso, a indução com rotenona causou aumento de vários mediadores tóxicos e neuroinflamatórios caracterizado pelo aumento de iNOS (DP vs CONTROLE, $p = 0,0468$) e IL-1β (DP vs CONTROLE, $p = 0,016$). O tratamento com prebióticos foi capaz de atenuar a expressão de iNOS (DP+PREB vs DP, $p = 0,0017$) e de IL-1β (DP+PREB vs DP, $p = 0,0214$).

Figura 7: Avaliação quantitativa de iNOS e IL-1β na substância negra



b)



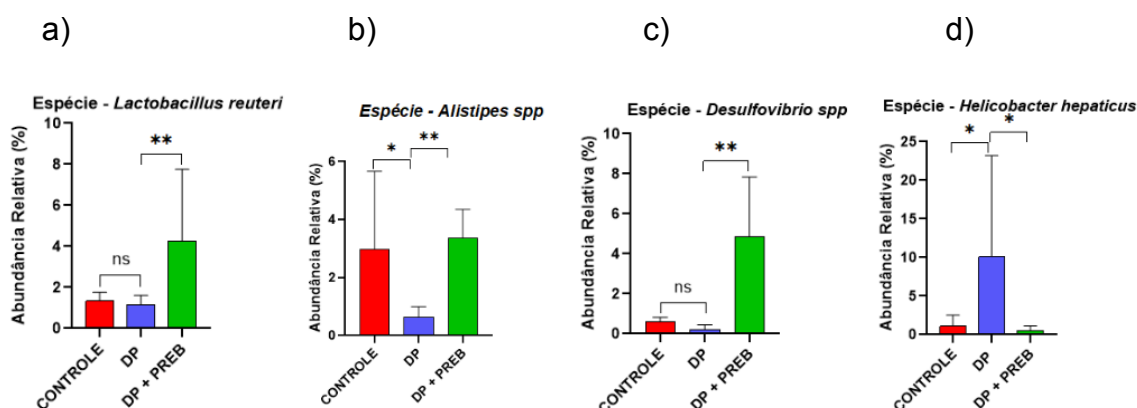
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Figura 7– a) Imagens representativas de western blotting de iNOS ($p^*=0,0468$), ($p^{**}=0,0017$) e IL-1 β (CONTROLE vs DP $p^*=0,016$; DP + PREB vs DP $p^*=0,0214$) na substância negra; b) Imagens gráficas de western blotting de iNOS e IL1- β na substância negra. (ANOVA ONE WAY seguido de TUKEY A POSTERIORI)

5.4 Prebióticos reestabelecem o equilíbrio de bactérias benéficas da microbiota intestinal

A indução com rotenona diminuiu abundância relativa das espécies *Alistipes ssp* (DP vs CONTROLE, $p = 0,03$), e aumentou *Helicobacter hepaticus* (DP vs CONTROLE, $p = 0,02$), porém não alterou significativamente a abundância das espécies *Lactobacillus reuteri* (DP vs CONTROLE, $p = 0,9$), e *Desulfovibrio ssp* (DP vs CONTROLE, $p = 0,9$). Entretanto, o tratamento com prebióticos aumentaram significativamente as espécies produtoras de SCFAs *Lactobacillus reuteri* (DP+PREB vs DP, $p = 0,0019$), *Desulfovibrio ssp* (DP+PREB vs DP, $p < 0,0001$) e *Alistipes ssp* (DP+PREB vs DP, $p = 0,007$), e diminuiram a quantidade da bactéria produtora de LPS *Helicobacter hepaticus* (DP+PREB vs DP, $p = 0,01$).

Figura 8: Sequenciamento de DNA bacteriano intestinal



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Figura 8 – Abundância relativa das espécies: a) *Lactobacillus reuteri* ($p^{**}=0,0019$), b) *Alistipes spp* ($p^{*}=0,03$) ($p^{**}=0,007$), c) *Desulfovibrio spp* ($p^{**}=0,0001$) e d) *Helicobacter hepaticus* (CONTROLE vs DP $p^{*}=0,02$; DP + PREB vs DP $p^{*}=0,01$). (ANOVA ONE WAY seguido de TUKEY A POSTERIORI)

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento combinado de frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS) melhorou os sintomas motores da DP experimental, conforme evidenciado pelo teste do rotarod em animais induzidos com rotenona crônica subcutânea. A bradicinesia, e a perda de equilíbrio evidenciados pelos testes do rotarod e campo aberto no modelo murino da DP, são características já reproduzidas em estudos anteriores (Mendonça *et al.*, 2022, Arab *et al.*, 2021). Estes testes visam validar o desenvolvimento de sintomas semelhantes à DP em humanos, nos quais a bradicinesia, perda de equilíbrio ou instabilidade postural são frequentes.

Além disso, foi demonstrado nesse estudo, que a rotenona promoveu diminuição da expressão da tirosina hidroxilase (TH), a enzima que participa da síntese de dopamina, na substância negra. A diminuição de TH reflete a morte de neurônios dopaminérgicos nesta região, que é um marcador neuropatológico da DP tal qual o acúmulo de alfa-sinucleína. Por sua vez, os aglomerados de alfa-sinucleína formam inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos e neuritos de Lewy dentro dos neurônios dopaminérgicos remanescentes da SNpc (Colla *et al.*,

2012, Rocha *et al.*, 2018.). Neste estudo, também foi evidenciado o aumento quantitativo da α -sinucleína fosforilada, indicando a presença de alfa-sinucleinopatia associada à DP corroborado nos achados de Kawahata *et al.*, 2022, e que foi atenuada através da administração dos prebióticos.

A micróglia é a célula residente do SNC que tem funções semelhantes às do macrófago. Em condições patológicas do SNC, a micróglia é ativada para um perfil pró inflamatório denominado de M1, responsável pela produção de mediadores inflamatórios. Neste perfil, a micróglia tem sua ativação avaliada por vários marcadores, incluindo a IBA-1 (Kustrimovic *et al.*, 2019, Zhao *et al.*, 2021). O presente estudo também mostrou um aumento na expressão de IBA-1 na substância negra dos animais que receberam a rotenona. Entretanto, nos animais tratados com prebióticos, houve uma redução significativa na microgliose, evidenciando uma diminuição do processo inflamatório induzido pela micróglia.

Além da ativação microglial, foi observado também que o modelo experimental causou uma neuroinflamação, decorrente do aumento dos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na substância negra (Thakur; Nehru, 2015, Ojha *et al.*, 2016, Zhao *et al.*, 2021, Mohamed *et al.*, 2023.). Em contrapartida, os prebióticos foram capazes de prevenir a inflamação induzida pela rotenona nesta região.

Além das alterações citadas, a rotenona também promoveu uma disbiose intestinal por alterar grupos de bactérias que desempenham funções na homeostase intestinal, ao passo que, o tratamento com prebióticos promoveu aumento de grupos bacterianos benéficos, cuja abundância promove uma microbiota equilibrada. As espécies de *Alistipes ssp*, *Desulfovibrio ssp* e *Lactobacillus reuteri* são conhecidas como grupos produtores de metabólitos importantes, SCFAs, e a diminuição da abundância relativa dessas espécies é relatada em modelos de DP (Hong *et al.*, 2021, Kessel; Aidy, 2019; Huang *et al.*, 2021, Stewart *et al.*, 2009). Esses metabólitos são responsáveis por manter a homeostase intestinal através da manutenção da integridade da barreira epitelial, através da regulação imunológica e são fontes de energia para os colonócitos (Roberfroid *et al.*, 2010, Morrison; Preston, 2016).

Assim, o presente trabalho trouxe novas perspectivas farmacológicas para o tratamento da DP, por meio do uso de prebióticos através da regulação do equilíbrio da microbiota intestinal e atenuação da neuroinflamação característica da DP via

eixo microbiota-intestino-cérebro.

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo sugerem um efeito terapêutico dos prebióticos como alternativa farmacológica às terapias atuais, observada pela aumento do tempo de latência e de cruzamentos dos camundongos do grupo tratado em relação ao grupo doente nos testes de Rotarod e Campo Aberto, respectivamente, demonstrando, assim, um efeito atenuador para o comprometimento motor, um dos sintomas cardinais da DP. Além disso, os resultados do experimento mostraram a eficácia do uso da associação de 3g/Kg/dia e 4g/Kg/dia de FOS e GOS, respectivamente, na redução dos valores dos marcadores IBA-1, IL-1 β e iNOS na SN, sugerindo um efeito anti-inflamatório. Em adição, evidenciou-se a morte dos neurônios dopaminérgicos na SN, avaliados por meio da enzima TH, e o aumento de alfa-sinucleína nos grupos doentes, e que estes foram atenuados com o uso dos prebióticos. A eficácia dos prebióticos nos resultados pode ser interpretada como uma regulação da disbiose intestinal causada pela DP, aumentando, assim, os números das espécies *Lactobacillus reuteri*, *Alistipes spp* e *Desulfovibrio spp*, sugerindo um papel importante na restauração do equilíbrio microbiótico, produzindo efeitos anti-inflamatórios na mucosa intestinal, reduzindo a permeabilidade intestinal e evitando a propagação neurológica da α -syn para o SNC. Entretanto, a literatura demonstra ser inconclusiva a respeito de quais bactérias são benéficas ou patogênicas e suas respectivas atuações no desenvolvimento das doenças neurológicas, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de ação dos SCFAs.

REFERÊNCIAS

- AKDEMİR, Ü. Ö.; BORA TOKÇAER, A.; ATAY, L. Ö. Dopamine transporter SPECT imaging in Parkinson's disease and parkinsonian disorders. *Turkish journal of medical sciences*, v. 51, n. 2, p. 400–410, 2021.
- ALEXANDER, G. M. et al. β 2 -Adrenergic agonist as adjunct therapy to levodopa in Parkinson's disease. *Neurology*, v. 44, n. 8, p. 1511–1511, 1994.
- ALFONSETTI, M.; CASTELLI, V.; D'ANGELO, M. Are we what we eat? Impact of diet on the gut–brain axis in Parkinson's disease. *Nutrients*, v. 14, n. 2, p. 380, 2022.
- ARAB, H. H.; SAFAR, M. M.; SHAHIN, N. N. Targeting ROS-dependent AKT/GSK-3 β /NF- κ B and DJ-1/Nrf2 pathways by dapagliflozin attenuates neuronal injury and motor dysfunction in rotenone-induced Parkinson's disease rat model. *ACS chemical neuroscience*, v. 12, n. 4, p. 689–703, 2021.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- AYTEN, Ş.; BILICI, S. Modulation of gut Microbiota through dietary intervention in neuroinflammation and Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Current nutrition reports*, v. 13, n. 2, p. 82–96, 2024.
- BADANJAK, K. et al. The contribution of microglia to neuroinflammation in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 9, p. 4676, 2021.
- BARICHELLA, M. et al. Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease: An RCT. *Neurology*, v. 87, n. 12, p. 1274–1280, 2016.
- BASTIDE, M. F. et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, v. 132, p. 96–168, 2015.
- BEITZ, J. M. Parkinson s disease a review. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, v. S6, n. 1, p. 65–74, 2014.
- BHATTARAI, Y. et al. Role of gut microbiota in regulating gastrointestinal dysfunction and motor symptoms in a mouse model of Parkinson's disease. *Gut microbes*, v. 13, n. 1, 2021.
- BLOEMEN, J. G. et al. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, v. 28, n. 6, p. 657–661, 2009.

- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Neuropathological staging of brain pathology in sporadic Parkinson's disease: Separating the wheat from the chaff. *Journal of Parkinson's disease*, v. 7, n. s1, p. S71–S85, 2017.
- BRUDEK, T. Inflammatory bowel diseases and Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, v. 9, n. s2, p. S331–S344, 2019.
- CACABELOS, R. Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 3, p. 551, 2017.
- CAPORASO, J. G. et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, v. 12, n. 5, p. R50, 2011.
- CHANDRA, R. et al. α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI insight*, v. 2, n. 12, 6 2017.
- CHEN, M.; MOR, D. E. Gut-to-brain α -synuclein transmission in Parkinson's disease: Evidence for prion-like mechanisms. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 8, p. 7205, 2023.
- CHRISTOFF, K. et al. Mind-wandering as spontaneous thought: a dynamic framework. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 17, n. 11, p. 718–731, 2016.
- CHURCH, F. C. Treatment options for motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Biomolecules*, v. 11, n. 4, p. 612, 2021.
- CLAPP, M. et al. Gut Microbiota's effect on mental health: The gut-brain axis. *Clinics and practice*, v. 7, n. 4, p. 987, 2017.
- COLLA, E. et al. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 32, n. 10, p. 3306–3320, 2012.
- DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *The Journal of Lipid Research*, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2013.
- DE RESENDE PINTO, W. B. V.; KO, G. M. TESTE DE ROTAROD: CONTRIBUIÇÕES NO ESTUDO DAS DOENÇAS NEUROMUSCULARES, DAS SÍNDROMES EXTRAPIRAMIDAIS E DAS ATAXIAS CEREBELARES. Disponível em: <<https://www.sbcal.org.br/old/upload/arqupload/artigo10volume2-a7d12.pdf>>. Acesso em: 10 aug. 2024.
- DORSEY, E. R. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet neurology*, v. 17, n. 11, p. 939–953, 2018.

- ERNY, D. et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*, v. 18, n. 7, p. 965–977, 2015.
- ESTEVEZ, A. R. et al. LPS-induced mitochondrial dysfunction regulates innate immunity activation and α -synuclein oligomerization in Parkinson's disease. *Redox biology*, v. 63, n. 102714, p. 102714, 2023.
- FIORY, F. et al. The relevance of insulin action in the dopaminergic system. *Frontiers in neuroscience*, v. 13, 2019.
- GOLDMAN, J. G.; POSTUMA, R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Current opinion in neurology*, v. 27, n. 4, p. 434–441, 2014.
- HILTON, D. et al. Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*, v. 127, n. 2, p. 235–241, 2014.
- HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut microbes*, v. 8, n. 2, p. 172–184, 2017.
- HONG, Y. et al. *Desulfovibrio vulgaris*, a potent acetic acid-producing bacterium, attenuates nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Gut microbes*, v. 13, n. 1, 2021.
- HOUSER, M. C.; TANSEY, M. G. The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinson's disease*, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017.
- HOYLES, L. et al. Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood–brain barrier. *Microbiome*, v. 6, n. 1, 2018.
- HUANG, G. et al. Lychee (*litchi chinensis* Sonn.) pulp phenolics activate the short-chain fatty acid-free fatty acid receptor anti-inflammatory pathway by regulating Microbiota and mitigate intestinal barrier damage in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 69, n. 11, p. 3326–3339, 2021.
- INNOS, J.; HICKEY, M. A. Using rotenone to model Parkinson's disease in mice: A review of the role of pharmacokinetics. *Chemical research in toxicology*, v. 34, n. 5, p. 1223–1239, 2021.
- JACKSON, A. et al. Diet in Parkinson's disease: Critical role for the microbiome. *Frontiers in neurology*, v. 10, 2019.
- JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 91, n. 8, p. 795–808, 2020.
- JOHNSON, M. E.; STRINGER, A.; BOBROVSKAYA, L. Rotenone induces

- gastrointestinal pathology and microbiota alterations in a rat model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, v. 65, p. 174–185, 2018.
- KAM, T.-I. et al. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, v. 144, n. 105028, p. 105028, 2020.
- KAWAHATA, I.; FINKELSTEIN, D. I.; FUKUNAGA, K. Pathogenic impact of α -synuclein phosphorylation and its kinases in α -synucleinopathies. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 11, p. 6216, 2022
- KNIGHT, E. et al. The role of diet and dietary patterns in Parkinson's disease. *Nutrients*, v. 14, n. 21, p. 4472, 2022.
- KUSTRIMOVIC, N.; MARINO, F.; COSENTINO, M. Peripheral immunity, immunoaging and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Current medicinal chemistry*, v. 26, n. 20, p. 3719–3753, 2019.
- LAZDON, E.; STOLERO, N.; FRENKEL, D. Microglia and Parkinson's disease: footprints to pathology. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria)*, v. 127, n. 2, p. 149–158, 2020.
- LEWITT, P. A. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 30, n. 1, p. 64–72, 2015.
- LI, W. et al. Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Science China. Life sciences*, v. 60, n. 11, p. 1223–1233, 2017.
- LIU, W. et al. Bilateral subthalamic stimulation improves gait initiation in patients with Parkinson's disease. *Gait & posture*, v. 23, n. 4, p. 492–498, 2006.
- MENDONÇA, I. P. et al. Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: A review. *International immunopharmacology*, v. 83, n. 106434, p. 106434, 2020.
- MENDONÇA, I. P. et al. Metformin improves depressive-like behavior in experimental Parkinson's disease by inducing autophagy in the substantia nigra and hippocampus. *Inflammopharmacology*, v. 30, n. 5, p. 1705–1716, 2022.
- MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1589–1592, 1996.
- MOHAMED, Y. T. et al. Neuroprotective effect of secukinumab against rotenone induced Parkinson's disease in rat model: Involvement of IL-17, HMGB-1/TLR4 axis

and BDNF/TrKB cascade. *International immunopharmacology*, v. 114, n. 109571, p. 109571, 2023.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016.

NAGATSU, T.; SAWADA, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. *Parkinsonism & related disorders*, v. 15, p. S3–S8, 2009.

NISHINA, P. M.; FREEDLAND, R. A. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *The journal of nutrition*, v. 120, n. 7, p. 668–673, 1990.

NISHIO, J.; HONDA, K. Immunoregulation by the gut microbiota. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 69, n. 21, p. 3635–3650, 2012.

NONNEKES, J. et al. Unmasking levodopa resistance in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 31, n. 11, p. 1602–1609, 2016.

OJHA, S. et al. Glycyrrhizic acid attenuates neuroinflammation and oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, v. 29, n. 2, p. 275–287, 2016.

OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*, v. 72, n. 21_supplement_4, 2009.

OLANOW, C. W. et al. Temporal evolution of microglia and α -synuclein accumulation following foetal grafting in Parkinson's disease. *Brain: a journal of neurology*, v. 142, n. 6, p. 1690–1700, 2019.

PAIVA, I. H. R.; DUARTE-SILVA, E.; PEIXOTO, C. A. The role of prebiotics in cognition, anxiety, and depression. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 34, p. 1–18, 2020.

PAL, P. et al. Research in Parkinson's disease in India: A review. *Annals of Indian Academy of Neurology*, v. 19, n. 1, p. 9, 2016.

PETERSON, C. T. Dysfunction of the Microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative disease: The promise of therapeutic modulation with prebiotics, medicinal herbs, probiotics, and synbiotics. *Journal of evidence-based integrative medicine*, v. 25, p. 2515690X2095722, 2020.

- PICCA, A. et al. Mitochondrial dysfunction, protein misfolding and neuroinflammation in Parkinson's disease: Roads to biomarker discovery. *Biomolecules*, v. 11, n. 10, p. 1508, 2021.
- PROANO, A. C. et al. Gut Microbiota and its repercussion in Parkinson's disease: A Systematic Review in occidental patients. *Neurology international*, v. 15, n. 2, p. 750–763, 2023.
- QIAN, Y. et al. Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain, behavior, and immunity*, v. 70, p. 194–202, 2018.
- RADAD, K. et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. *Folia neuropathologica*, v. 57, n. 4, p. 317–326, 2019.
- RÍOS-COVIÁN, D. et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, v. 7, 2016.
- ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The British journal of nutrition*, v. 104, n. S2, p. S1–S63, 2010.
- ROCHA, E. M.; DE MIRANDA, B.; SANDERS, L. H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, v. 109, p. 249–257, 2018.
- SALIM, S. et al. Gut microbiome and Parkinson's disease: Perspective on pathogenesis and treatment. *Journal of advanced research*, v. 50, p. 83–105, 2023.
- STEINER, J. A.; QUANSAH, E.; BRUNDIN, P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. *Cell and tissue research*, v. 373, n. 1, p. 161–173, 2018.
- STEWART, M. L.; SAVARINO, V.; SLAVIN, J. L. Assessment of dietary fiber fermentation: Effect of *Lactobacillus reuteri* and reproducibility of short-chain fatty acid concentrations. *Molecular nutrition & food research*, v. 53, n. S1, 2009.
- TANG, J. et al. Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *International immunopharmacology*, v. 91, n. 107272, p. 107272, 2021.
- TARAKAD, A.; JANKOVIC, J. Recent advances in understanding and treatment of Parkinson's disease. *Faculty reviews*, v. 9, 2020.
- THAKUR, P.; NEHRU, B. Inhibition of neuroinflammation and mitochondrial dysfunctions by carbenoxolone in the rotenone model of Parkinson's disease. *Molecular neurobiology*, v. 51, n. 1, p. 209–219, 2015.

- TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. Journal of neural transmission (Vienna, Austria), v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.
- VAN KESSEL, S. P.; EL AIDY, S. Bacterial metabolites mirror altered gut Microbiota composition in patients with Parkinson's disease. Journal of Parkinson's disease, v. 9, n. s2, p. S359–S370, 2019.
- YEMULA, N. et al. Parkinson's disease and the gut: Symptoms, nutrition, and Microbiota. Journal of Parkinson's disease, v. 11, n. 4, p. 1491–1505, 2021.
- ZHAO, Z. et al. Novel compound FLZ alleviates rotenone-induced PD mouse model by suppressing TLR4/MyD88/NF-κB pathway through microbiota–gut–brain axis. Acta pharmaceutica Sinica. B, v. 11, n. 9, p. 2859–2879, 2021.
- ZHU, M. et al. Gut Microbiota: A novel therapeutic target for Parkinson's disease. Frontiers in immunology, v. 13, 2022.

ANEXOS

ANEXO A

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) - INSTITUTO AGGEU

MAGALHÃES/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



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

Virgínia M. Barros de Lorena

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