



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Dayse Fabiane Machado de Melo

A influência do dimorfismo sexual sobre alterações comportamentais, neuroquímicas e intestinais observadas em um modelo experimental da doença de Parkinson

Florianópolis
2021

Dayse Fabiane Machado de Melo

A influência do dimorfismo sexual sobre alterações comportamentais, neuroquímicas e intestinais observadas em um modelo experimental da doença de Parkinson

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr Rui Daniel Prediger

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Melo, Dayse Fabiane Machado de

A influência do dimorfismo sexual sobre alterações comportamentais, neuroquímicas e intestinais observadas em um modelo experimental da doença de Parkinson / Dayse Fabiane Machado de Melo ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger, 2022.

149 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. MPTP intranasal. Sexo. Depressão. Ansiedade. Microbiota. Intestino. I. Prediger, Rui Daniel Schröder . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Dayse Fabiane Machado de Melo

A influência do dimorfismo sexual sobre alterações comportamentais, neuroquímicas e intestinais observadas em um modelo experimental da doença de Parkinson

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Livia Hecke Morais
California Institute Technology

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre esteve presente e apoiou incondicionalmente minha educação e escolhas durante todos esses anos;

Ao meu companheiro de vida, Marco, por trilhar esse caminho comigo e por dividir os mesmos sonhos e frustrações, por me incentivar todos os dias e me tranquilizar em todos os momentos difíceis;

Aos animais que deram a sua vida pela ciência;

Ao meu orientador professor Dr. Rui Daniel Prediger por ter me acolhido em seu laboratório e depositado tanta confiança em mim, por ter aceitado o desafio de trabalhar com microbiota e ter permitido minhas ideias malucas, por todo incentivo a fazer ciência no cenário atual e por todos os ensinamentos;

Aos meus queridos colegas do LEXDON pela convivência durante esses anos. À Nai, Nei e Kati por me auxiliarem com o modelo e pela paciência. À Cibele que me acompanhou nos experimentos e nas gordices. À Gisa que me ajudou na imunohistoquímica e sempre foi extremamente prestativa. À Samantha e Fernanda, que mudaram minha visão sobre ciência. À Bruna pelas discussões, ideias, risadas, coquinhas divididas depois do almoço no RU, por disponibilizar do seu tempo para me acompanhar no *vibratome*, por ser meu alicerce no laboratório durante a pandemia e que mesmo agora do outro lado do mundo continuou me incentivando e ouvindo meus áudios um tanto quanto apelativos. Obrigada a todos pelo conhecimento compartilhado, pelos cafés, chororôs, memes (especialmente ao Nei) e pelo apoio emocional. Foi uma honra conviver e aprender tanto com vocês;

À minha família em Floripa, Ju, Marina e óbvio, Júpiter, que compartilharam as felicidades e angústias não só na pós-graduação, mas no dia a dia. Obrigada pelas risadas de acordar os vizinhos, por dividirem tudo comigo, pelas reflexões e por cada brigadeiro que compartilhamos;

Aos meus amigos e colegas do Programa de Pós-graduação em Farmacologia e de corredores: Sther, Merita, Bruna, Ana Merian, Lu, Letícia, Roberta, Weilher e Ana Jesse. Foi incrível conhecer vocês! Obrigada pelos momentos que partilhamos e por deixarem meus dias mais leves. Com certeza irei lembrar de vocês com um sorriso no rosto.

A Dra. Lívia Budziarek Eslabão e ao professor Dr. Oscar Bruna-Romero por aceitarem nossa parceria e por todo o auxílio na realização do qPCR;

A professora Dr. Alexandra Latini e a Ma. Jennyffer Ione De Souza Silva pela colaboração com os experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência;

Ao professor Dr. José Eduardo Da Silva por abrir as portas do seu laboratório para mim e permitir nossa colaboração com os experimentos do íleo isolado. E principalmente, a Stherfanni Moura De Oliveira que aceitou compartilhar o mundo das “tripinhas” comigo, fez esse experimento ser tão divertido e por todo o auxílio prestado;

Ao professor Dr. Fernando Spiller pela confiança ao acreditar no nosso projeto, ser sempre solícito e por disponibilizar a estrutura do seu laboratório;

A Ma. Ariela Maína Boeder que me ajudou muito desde o momento que o projeto era apenas uma ideia. Por compartilhar tanto comigo, na bancada e nos corredores, pela paciência em me ensinar os mínimos detalhes quando recém havia chegado na UFSC e estava totalmente perdida. Muito obrigada!

Ao LAFEX pela disponibilidade dos animais e o livre acesso ao biotério e equipamentos. Em especial a Ma. Roberta, minha companheira na colônia e que independente do problema sempre estava lá para me socorrer. Obrigada por tudo;

A médica veterinária Luciana Honorato, por ser prestativa e atenciosa e pelo auxílio com os protocolos;

Ao professor Dr. Marcelo Farina por disponibilizar sua estante no Biotério setorial do Departamento de Bioquímica;

Ao LAMEB pela atenção, paciência e disponibilidade;

A todos os funcionários e professores do Departamento de Farmacologia;

À Universidade Federal de Santa Catarina;

Às agências de fomento à pesquisa CAPES e CNPq pelo suporte financeiro;

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, muito obrigada.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Skłodowska-Curie

(1867 – 1934)

RESUMO

Grande parte do conhecimento adquirido sobre a doença de Parkinson (DP) é baseado em estudos clínicos e em modelos animais que utilizaram, exclusivamente ou majoritariamente, sujeitos do sexo masculino. No entanto, grande parte da população acometida pela doença inclui mulheres, que experenciam a DP de forma distinta. Enquanto os homens tendem a apresentar os sintomas motores cardinais com maior ênfase, a depressão, ansiedade e a constipação são mais comuns em mulheres. Esses e outros sintomas não motores podem surgir até 20 anos antes do diagnóstico clínico e por isso acredita-se na forte associação destes com a progressão e a origem da DP. A administração intranasal de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) representa um modelo de exposição periférica que reproduz várias características observadas nas fases iniciais da DP, como a disfunção olfatória em camundongos machos e comportamento tipo-depressivo em camundongos fêmeas, além da progressão da neurodegeneração que se inicia no bulbo olfatório. Assim, o principal objetivo desse estudo foi investigar a influência do sexo biológico nas alterações comportamentais, neuroquímicas e intestinais induzidas pela administração intranasal de uma dose baixa de MPTP (0,5 mg/narina). Foram realizados dois protocolos comportamentais com camundongos machos e fêmeas de linhagem C57BL/6 avaliando a discriminação olfatória, motilidade fecal, respostas relacionadas à anedonia, depressão e ansiedade e atividade locomotora. Adicionalmente, foi avaliada a abundância dos principais filos bacterianos no conteúdo fecal e a resposta de contração à acetilcolina e à dopamina nos segmentos de íleo isolado destes animais. A administração intranasal de MPTP utilizando uma dose baixa (0,5 mg/narina) induziu um prejuízo na habilidade olfatória no dia 5, um comportamento do tipo-ansioso no dia 12 e do tipo-depressivo no dia 14, seletivamente em camundongos fêmeas. Ao mesmo tempo, ambos machos e fêmeas apresentaram redução nos níveis de dopamina no estriado após 16 dias da administração, mas nenhum comprometimento motor no campo aberto (dia 14 ou 15). Foi observado que as fêmeas apresentaram maior *turnover* de serotonina no hipocampo, além de um aumento na abundância do filo Bacteroidetes no conteúdo fecal após a administração intranasal de MPTP. Ainda, observamos que os segmentos isolados de íleo dos camundongos fêmeas exibem uma resposta de relaxamento maior frente à contração fásica de acetilcolina e às maiores concentrações de dopamina (100 e 300 μ M) após o tratamento. Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho indicam uma maior susceptibilidade de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 à administração intranasal de uma dose baixa de MPTP (0,5 mg/narina), reforçando a importância das diferenças sexuais nos estudos de comportamentos não motores associados a DP.

Palavras-chave: MPTP intranasal. Sexo. Depressão. Ansiedade. Microbiota. Intestino.

ABSTRACT

Most of our knowledge about Parkinson's disease (PD) is based on clinical studies and animal models that used, exclusively or mainly, male subjects. However, a large part of the population affected by the disease includes women, who experience PD differently. While men tend to have more prominent cardinal motor symptoms, depression, anxiety, and constipation are more common in women. These and other non-motor symptoms can appear as early as twenty years before clinical diagnosis. Therefore, it is believed that they are strongly associated with the progression and origins of PD. Intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) represents a model of peripheral exposure that reproduces several characteristics observed in the early stages of PD, such as olfactory dysfunction in male mice and depressive-like behavior in female mice, in addition to neurodegeneration progression that starts in the olfactory bulb. This study aimed to investigate the influence of biological sex on behavioral, neurochemical, and intestinal changes induced by intranasal administration of a low dose of MPTP (0.5 mg/nostril). Two behavioral protocols were carried out with male and female mice of the C57BL/6 strain, evaluating olfactory discrimination, fecal motility, responses related to anhedonia, depression, anxiety, and locomotor activity. Additionally, the abundance of the main bacterial phyla in fecal content and the contraction response to acetylcholine and dopamine in isolated ileum segments were evaluated. Intranasal administration of MPTP using a low dose (0.5 mg/nostril) induced impaired olfactory ability on day 5, anxious-like behavior on day 12, and depressive-like behavior on day 14 selectively in female mice. At the same time, both males and females showed a reduction of dopamine levels in striatum after 16 days of administration but no motor impairment in the open field (day 14 or 15). It was observed that females mice had higher serotonin turnover in hippocampus and an increase in abundance of the phylum Bacteroidetes on fecal content after intranasal administration of MPTP. Furthermore, we observed that isolated ileum segments from female mice exhibit a greater relaxation response to phasic contraction of acetylcholine and higher concentrations of dopamine (100 and 300 μ M) after treatment. Together, results obtained in this study indicate a greater susceptibility of female mice of C57BL/6 strain to intranasal administration of a low dose of MPTP (0.5 mg/nostril), reinforcing the importance of sex differences in non-motor behavior associated with PD.

Keywords: Intranasal MPTP. Sex. Depression. Anxiety. Microbiota. Gut.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquemática dos circuitos que integram os núcleos da base.....	28
Figura 2. Organização tecidual do intestino delgado e cólon.....	37
Figura 3. Comunicação entre microbiota, intestino e SNC	39
Figura 4. Representação esquematizada do tônus muscular liso.....	43
Figura 5. Ilustração da linha temporal referente ao primeiro bloco experimental.	63
Figura 6. Ilustração da linha temporal referente ao segundo bloco experimental.	64
Figura 7. Ilustração das coletas, divisão das amostras e análises realizadas	65
Figura 8. Avaliação da habilidade de discriminação olfatória em camundongos machos e fêmeas realizada 5 dias após a administração intranasal de MPTP.....	66
Figura 9. Avaliação da motilidade fecal em camundongos machos e fêmeas 7 e 13 dias após a administração intranasal de MPTP	68
Figura 10. Avaliação do comportamento tipo-hedônico em camundongos machos e fêmeas realizada 10 dias após a administração intranasal de MPTP no teste de preferência por sacarose	69
Figura 11. Avaliação do comportamento tipo-hedônico em camundongos machos e fêmeas realizada 12 dias após a administração intranasal de MPTP no teste da borrifagem com sacarose	70
Figura 12. Avaliação de parâmetros locomotores e de emocionalidade em camundongos machos e fêmeas realizada 14 dias após a administração intranasal de MPTP no teste do campo aberto	71
Figura 13. Avaliação do comportamento tipo-depressivo em camundongos machos e fêmeas realizada 14 dias após a administração intranasal de MPTP no teste da suspensão pela cauda	72
Figura 14. Avaliação da habilidade de discriminação olfatória em camundongos machos e fêmeas realizada 5 dias após a administração intranasal de MPTP.....	73
Figura 15. Avaliação da motilidade fecal em camundongos machos e fêmeas realizada 7 e 13 dias após a administração intranasal de MPTP	74
Figura 16. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em camundongos machos e fêmeas realizada 12 dias após a administração intranasal de MPTP.....	76

Figura 17. Avaliação de parâmetros locomotores e de emocionalidade em camundongos machos e fêmeas realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP no teste do campo aberto	77
Figura 18. Avaliação do comportamento tipo-depressivo em camundongos machos e fêmeas realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP no teste do nado forçado.....	78
Figura 19. Unidades formadoras de colônias bacterianas 2 dias antes e após 14 dias da administração de MPTP	78
Figura 20. Avaliação da abundância de bactérias e dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria antes da administração intranasal de MPTP	79
Figura 21. Avaliação da abundância de bactérias e dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria após 14 dias da administração intranasal de MPTP	80
Figura 22. Avaliação da frequência de contrações e da resposta contrátil ao KCl no íleo isolado de camundongos machos e fêmeas 16 dias após a administração intranasal de MPTP	82
Figura 23. Avaliação da resposta contrátil à 30 μ M de ACh nos segmentos de íleo isolado de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP.	83
Figura 24. Curvas de concentração-resposta não cumulativas à ACh em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP.....	85
Figura 25. Curvas de concentração resposta cumulativas à ACh em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP	86
Figura 26. Curvas concentração resposta de relaxamento de DA em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP.	87
Figura 27. Curvas de concentração resposta cumulativa à DA em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP	88
Figura 28. Dosagem das concentrações de monoaminas no estriado de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP.....	89
Figura 29. Dosagem das concentrações de serotonina e metabólito no hipocampo de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP	90
Figura 30. Dosagem das concentrações de DA, 5-HT e seus metabólitos no duodeno de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Escores utilizados no teste do ninho.....	56
Quadro 2. Descrição dos iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da habilidade de construção de ninhos por camundongos machos e fêmeas 10 dias após a administração intranasal de MPTP	75
Tabela 2 - Parâmetros da avaliação morfológica do duodeno em camundongos machos e fêmeas realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: Serotonina

ACh: Acetilcolina

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

ANOVA: Análise de Variância

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, "*Brain-derived neurotrophic factor*")

BHE: Barreira Hematoencefálica

CaM: Calmodulina

AMPc 3'5': Adenosina-monofosfato cíclico

CCVD: Canais de Ca²⁺ voltagem dependentes

CLMF: Cadeia leve de miosina fosfatase

CLMK: Quinase da cadeia leve de miosina

COMT: Catecolamina O-metiltransferase

C_T: *Cycle threshold*

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

DAT: Transportador de Dopamina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Discriminação Olfatória

DOPAC: Ácido 3,4-dihidróxifenilacético

DP: Doença de Parkinson

D_R: Receptor Dopaminérgico

DSM-5: 5ª Edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

GABA: Ácido gama-aminobutírico

Glu: Glutamato

GPe: Globo pálido externo

GPi: Globo pálido interno

HE: Hematoxilina e eosina

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

HVA: Ácido homovanílico

ICC: Células intersticiais de Cajal
IP: Intraperitoneal
IP3: Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP3R: Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato
ISRS: Inibidores seletivos da recaptção de 5-HT
LC: *Locus coeruleus*
LCE: Teste do Labirinto em Cruz Elevado
L-DOPA: Levodopa
MAO: Monoamina Oxidase
MH: Muller-Hinton
MM: Massa Molecular
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NaCl: Cloreto de Sódio
NbM: Núcleo basal de Meynert
NA: Noradrenalina
NO: Óxido nítrico
PFA: Paraformaldeído
PKC: Proteína quinase C
PKG: Proteína quinase dependente do cGMP
PLC β : Fosfolipase C
PPN: Núcleo pedunculopontino
qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
GPCR: Receptores acoplados a proteína G (do inglês, *G-protein-coupled receptors*)
RN: Núcleo da Rafe
RS: Retículo sarcoplasmático
SN: Substância Nigra
SNC: Sistema Nervoso Central
SNE: Sistema Nervoso Entérico
SNpc: Substância Nigra *pars compacta*
STN: Núcleo Subtalâmico
TBS: Teste de Borrifagem da Sacarose
TCA: Teste do Campo Aberto
TGI: Trato Gastrointestinal

TH: Tirosina Hidroxilase

TMF: Teste para avaliação da Motilidade Fecal

TNF: Teste do Nado forçado

TS: Teste de Preferência à Sacarose

TSC: Teste da Suspensão pela Cauda

UFC: Unidades formadoras de colônias

VMAT₂: Transportador vesicular de monoaminas do tipo 2

VTA: Área tegmental ventral

LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca registrada ou protegida por direitos autorais
- α Letra grega Alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1	ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	21
1.2	SINTOMAS NÃO MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON	23
1.3	ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS NA DOENÇA DE PARKINSON.....	26
1.3.1	A disfunção olfatória na doença de Parkinson	31
1.3.2	A depressão na doença de Parkinson	33
1.3.3	Os transtornos de ansiedade na doença de Parkinson.....	35
1.4	O SEGUNDO CÉREBRO: O PAPEL DO INTESTINO NA DOENÇA DE PARKINSON	36
1.4.1	Eixo Intestino-Encéfalo-Microbiota	38
1.4.2	Motilidade e contração do músculo liso	40
1.5	O TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	44
1.5.1	Tratamento dos sintomas motores.....	44
1.5.2	Tratamento dos sintomas não motores.....	45
1.6	DIFERENÇAS SEXUAIS NA DOENÇA DE PARKINSON.....	46
1.7	MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: FOCO NA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP	48
2.	JUSTIFICATIVA.....	51
3.	OBJETIVOS	52
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1.	ANIMAIS.....	53
4.2.	DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS.....	53
4.2.1.	Administração intranasal de MPTP	53

4.2.2. Testes comportamentais.....	54
4.2.2.1. <i>Discriminação olfatória (DO).....</i>	54
4.2.2.2. <i>Teste para avaliação da motilidade fecal (TMF).....</i>	54
4.2.2.3. <i>Teste de preferência por sacarose (TPS)</i>	54
4.2.2.4. <i>Teste da borrifagem de sacarose (TBS)</i>	55
4.2.2.5. <i>Teste da suspensão pela cauda (TSC).....</i>	55
4.2.2.6. <i>Teste do ninho</i>	55
4.2.2.7. <i>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....</i>	56
4.2.2.8. <i>Teste do nado forçado (TNF)</i>	56
4.2.2.9. <i>Teste do campo aberto (TCA)</i>	57
4.2.3. Contagem de colônias bacterianas.....	57
4.2.4. Extração de DNA total das amostras fecais	57
4.2.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)	58
4.2.6. Eutanásia.....	60
4.2.7. Avaliação morfológica do duodeno.....	60
4.2.8. Avaliação da função contrátil do íleo isolado	60
4.2.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	61
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	62
5 RESULTADOS.....	66
5.1 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	66
5.1.1 Primeiro Bloco Experimental.....	66
5.1.1.1. <i>Discriminação Olfatória</i>	66
5.1.1.2. <i>Teste para avaliação da motilidade fecal</i>	67
5.1.1.3. <i>Teste de preferência por sacarose.....</i>	69
5.1.1.4. <i>Teste da borrifagem com sacarose.....</i>	69
5.1.1.5. <i>Teste do campo aberto</i>	70

5.1.1.6. <i>Teste da suspensão pela cauda</i>	71
5.1.2 Segundo Bloco Experimental	72
5.1.2.1. <i>Discriminação olfatória</i>	72
5.1.2.2. <i>Teste para avaliação da motilidade fecal</i>	73
5.1.2.3. <i>Teste do ninho</i>	75
5.1.2.4. <i>Teste do labirinto em cruz elevado</i>	75
5.1.2.5. <i>Teste do campo aberto</i>	76
5.1.2.6. <i>Teste do nado forçado</i>	77
5.2 CONTAGEM DE COLÔNIAS BACTERIANAS.....	78
5.3 ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E DOS FILOS BACTEROIDETES, FIRMICUTES E ACTINOBACTERIA NO CONTEÚDO FECAL	79
5.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO DUODENO	81
5.5 RESPOSTA CONTRÁTIL À ACETILCOLINA E DOPAMINA NO ÍLEO ISOLADO.....	81
5.5.1 Avaliação da resposta à acetilcolina no íleo isolado de camundongos machos e fêmeas após a administração intranasal de MPTP	82
5.5.2 Avaliação da resposta à dopamina no íleo isolado de camundongos machos e fêmeas após a administração intranasal de MPTP	86
5.6 DOSAGEM DE MONOAMINAS NO ESTRIADO, HIPOCAMPO E DUODENO	88
5.6.1 Estriado	88
5.6.2 Hipocampo	90
5.6.3 Duodeno	91
6. DISCUSSÃO	92
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A	144

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

Uma doença de início insidioso, de caráter progressivo e incapacitante. Este foi o primeiro relato sobre uma “paralisia agitante”, publicado em 1817 pelo médico inglês James Parkinson (OBESO et al., 2017). Ele observou seis casos de pacientes com sintomas motores que incluíam tremor em repouso, lentidão ou ausência de movimentos voluntários, postura curvada e marcha festinante (PRZEDBORSKI, 2017). Passados aproximadamente meio século desta descrição original, o neurologista francês Jean-Martin Charcot propôs a nomenclatura “doença de Parkinson” para homenagear o pioneirismo de James Parkinson, além de descrever os sinais motores cardinais da doença: rigidez muscular, bradicinesia (lentidão de movimentos), tremor em repouso, instabilidade postural e alterações da marcha; o que foi essencial para distinguir a DP de outras alterações motoras semelhantes relatadas como parkinsonismos (GOETZ, 2011; PRZEDBORSKI, 2017).

Pouco mais de 100 anos após o registro de James Parkinson, o neuropatologista russo Konstantin Trétiakoff descreveu as características neuropatológicas mais marcantes da DP: a despigmentação da substância negra (SN) como consequência da perda de neurônios dopaminérgicos nesta região; e a presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas denominadas por ele como corpos de Lewy, em homenagem ao neuropatologista Friedrich Henrich Lewy, que relatou o mesmo achado histopatológico originalmente no núcleo dorsal do nervo vago (GOETZ, 2011; PRZEDBORSKI, 2017). Os principais componentes dos corpos de Lewy são agregados disfuncionais da proteína alfa-sinucleína (α -sinucleína) (POEWE et al., 2017).

O estudo acerca da DP permitiu o avanço do conhecimento sobre o SNC, como a existência da via nigroestriatal, o papel da dopamina (DA) como um neurotransmissor e a importância do estriado e da SN no controle motor (OBESO et al., 2017; POEWE et al., 2017). Arvid Carlsson e colaboradores foram os primeiros a sugerir o envolvimento da DA na DP, mostrando que a administração de um precursor de DA chamado de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) foi capaz de reverter o déficit na atividade motora induzida pela reserpina, uma substância que depleta os estoques vesiculares de monoaminas e permanece sendo usada até os dias atuais para a indução de modelos animais da DP (CARLSSON; LINDQVIST;

MAGNUSSON, 1957). Na década de 1960, novas evidências comprovaram uma redução nas concentrações de DA no estriado e na SN de pacientes com a DP (EHRINGER; HORNYKIEWICZ, 1960; SANO, 2000). Nesta mesma época foram realizados os primeiros estudos clínicos com a L-DOPA em pacientes e, desde então, ela se tornou o tratamento de primeira escolha para a DP (CHARVIN et al., 2018).

Apesar de muitos avanços desde a descrição de James Parkinson, a etiologia da DP permanece mal compreendida. Embora existam casos familiares (genéticos), a DP é majoritariamente idiopática¹ e de caráter multifatorial, sendo influenciada pela interação entre fatores genéticos e ambientais (KHAN et al., 2018; BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020). O envolvimento genético associado a DP hereditária é estabelecido por algumas mutações em genes que incluem *SNCA* (codifica a proteína α -sinucleína), *LRRK2* (codifica a proteína quinase rica em leucina de repetição 2), *Parkina* (codifica a proteína parkina), *PINK1* (codifica a proteína quinase 1 induzida por homólogo à fosfatase e tensina), dentre outros. Algumas dessas mutações já foram encontradas em casos de DP esporádica, apesar da ausência de histórico familiar (KALIA; LANG, 2015; PRZEDBORSKI, 2017). Um grande número de estudos epidemiológicos mostram uma alta incidência da DP em populações expostas à herbicidas, pesticidas, metais pesados e substâncias químicas industriais; ressaltando a contribuição de fatores ambientais para o desenvolvimento da DP (PRZEDBORSKI, 2017; BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020).

Outro fator de risco relevante para o desenvolvimento da DP é o envelhecimento. Com a progressão da idade, tanto a prevalência quanto a incidência da DP aumentam (POEWE et al., 2017). A estimativa para a população geral é de que 0,3% sejam afetados pela doença, enquanto que em pessoas acima de 80 anos esse número aumenta para 3% (DORSEY et al., 2007; ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Ambas, incidência e prevalência da doença, também são 1,5 a 2 vezes maiores em homens, embora as mulheres apresentem um diagnóstico em estágios mais avançados e maior taxa de mortalidade (DAHODWALA et al., 2018; CERRI; MUS; BLANDINI, 2019). Estima-se que 6,1 bilhões de pessoas tenham sido diagnosticadas com a DP até 2016, número 2,4 vezes maior do que as estimativas de 1990. Possivelmente, a maior exposição à fatores de risco ambientais devido à crescente industrialização, o crescimento

¹ *idiopático*, que tem causa desconhecida ou se manifesta espontaneamente.

da população idosa, o aumento da expectativa de vida e a maior acurácia do diagnóstico contribuem para a ascensão do número de casos da DP nos últimos anos (RAY DORSEY et al., 2018).

O diagnóstico da DP baseia-se no histórico familiar e na condição clínica dos pacientes, levando em consideração principalmente os sintomas motores clássicos da doença, que incluem a bradicinesia associada à tremores em repouso ou rigidez muscular, ou ambos. Entretanto, o conceito de diagnóstico na DP está em constante mudança e revisões de critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Distúrbios do Movimento em 2015 incluíram um conjunto de sintomas não motores como parte dos parâmetros centrais envolvidos na doença (RIZZO et al., 2016; POEWE et al., 2017; ARMSTRONG; OKUN, 2020).

1.2 SINTOMAS NÃO MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON

Apesar de o comprometimento motor ser a principal característica para o diagnóstico clínico da DP, estes sintomas somente se manifestam quando cerca de 60 a 80% dos neurônios dopaminérgicos da SN sofreram morte celular. Ou seja, no momento em que ocorre o diagnóstico, a doença já está em uma fase avançada (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015). Assim, acredita-se que as alterações neuropatológicas na DP se iniciam muito antes do diagnóstico clínico, sendo acompanhadas de sintomas não motores que caracterizam uma fase chamada de prodrômica. Alguns desses sintomas, como a hiposmia (diminuição do olfato), a depressão e a constipação intestinal, podem surgir cerca de 20 anos antes do diagnóstico clínico e serem agravados durante o curso da doença (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Essa hipótese foi postulada por Braak e colaboradores (2003), que com base na distribuição temporal e espacial dos corpos de Lewy propuseram seis estágios da DP. De acordo com os achados patológicos do estudo, o bulbo olfatório e o sistema nervoso entérico (SNE) são regiões nas quais há um acúmulo inicial de α -sinucleína, que é disseminada para o núcleo motor dorsal do nervo vago antes de expandir-se para áreas corticais. Logo, as primeiras manifestações clínicas (normalmente imperceptíveis ou desconsideradas pelos pacientes e médicos) seriam prejuízos olfatórios ou gastrointestinais (estágio I), seguido de distúrbios de humor e no sono, fadiga, dor, e prejuízos iniciais na memória (estágio II), até a degeneração chegar a um ponto crítico afetando as atividades motoras (estágios III e IV) e cognitivas (estágios V e VI) (BRAAK et al., 2004; SVEINBJORNSDOTTIR, 2016; KIM et al., 2019).

Estudos recentes corroboram a hipótese de Braak, mostrando que diversos pacientes já apresentavam estes sintomas não motores antes do diagnóstico clínico (PLOUVIER et al., 2014; SCHRAG et al., 2015; BANG; LIM; CHOI, 2021; BERG et al., 2021). Inclusive, Horsager e colaboradores (2020) sugeriram a existência de dois subtipos da DP que explicariam certa heterogeneidade da doença: (1) *body-first* (início no corpo), que diz respeito a patologia que inicia-se no SNE ou no sistema nervoso autônomo, ascende via nervo vago e atinge o SNC; e (2) *brain-first* (início no encéfalo), referente à patologia que surge no encéfalo ou inicia-se no bulbo olfatório devido fatores externos, e por consequência da progressão alcança a periferia e o intestino.

Em particular, as alterações olfatórias envolvem déficits na detecção, discriminação, identificação e memória de odores, afetando cerca de 70 a 90% dos pacientes com DP (MEISSNER, 2012). A disfunção olfatória é um forte candidato para biomarcador de fases iniciais da DP (FULLARD et al., 2016). Uma pesquisa que está continuamente estudando indivíduos incluindo parentes e não parentes com DP demonstrou que até agora, 67% dos sujeitos que apresentavam hiposmia e alterações na ligação do transportador de dopamina (DAT) foram posteriormente diagnosticados com DP (SIDEROWF et al., 2020). Em outro estudo, esses pesquisadores buscaram correlacionar a atividade do DAT e da hiposmia com outros sinais prodrômicos da DP. Curiosamente, os indivíduos que apresentam hiposmia acompanhada por constipação exibem o maior déficit de atividade de DAT (43%), em comparação com os demais sintomas avaliados (JENNINGS et al., 2014).

Em sua totalidade, as queixas gastrointestinais na DP vão muito além da constipação, visto que os pacientes relatam disfagia, dor abdominal, náuseas e motilidade reduzida (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). A prevalência desses sintomas varia de 28% a 80% nos pacientes e parece estar correlacionada com a duração e severidade da DP, mas não com a dieta ou tratamento. A constipação na DP pode ser classificada como “de trânsito lento”, causada por uma passagem intestinal prolongada. Há grande variação nos estudos, mas a maioria demonstra que os pacientes apresentam um tempo de trânsito colônico mais longo do que os controles (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015; TRAVAGLI; BROWNING; CAMILLERI, 2020).

Dentre os sintomas não motores destaca-se também a depressão, que atinge cerca de 50% dos pacientes com a DP (WEINTRAUB; MAMIKONYAN, 2019). Em cerca de 30%, o

diagnóstico de depressão pode preceder o diagnóstico da DP, entretanto, o início dos sintomas depressivos pode ocorrer e se agravar em qualquer momento da doença (LINTEL et al., 2021). Segundo a 5ª Edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o transtorno depressivo maior é definido pela presença de cinco sintomas quase diariamente por pelo menos duas semanas, que podem incluir: humor deprimido, perda de interesse e de apetite, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, capacidade diminuída de pensar ou se concentrar e desejos de morte recorrentes ou tentativas de suicídio (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Existem algumas diferenças peculiares na depressão observada em indivíduos com diagnóstico da DP em relação à população em geral, como redução de pensamentos de culpa ou sensação de fracasso e menor índice de tentativas de suicídio. Por outro lado, os sintomas apáticos e anedônicos, assim como a fadiga, perda de energia, agitação e sonolência durante o dia são mais frequentes na depressão em pacientes com a DP (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; BERG et al., 2021; LINTEL et al., 2021).

Distúrbios de sono, fadiga e comprometimento cognitivo também se sobrepõem com sintomas de ansiedade. De fato, cerca de 67% dos pacientes com a DP apresentam um diagnóstico de ansiedade de acordo com o DSM-5, que inclui não apenas a ansiedade generalizada, mas também transtorno de pânico e fobia. Em especial, os transtornos de ansiedade generalizada são caracterizados por preocupação excessiva, não realista e inespecífica sobre uma variedade de eventos futuros que são difíceis de controlar pela pessoa afetada, além de inquietação, hiperatividade, distúrbios do sono e tensão muscular (KHATRI et al., 2020). No entanto, alguns casos apresentam ansiedade clinicamente significativa, mas não se encaixam nesses critérios típicos da DSM-5 e são descritos na literatura como “Distúrbio de Ansiedade Inespecíficos”. Estima-se que até 25% dos pacientes com a DP estejam nessa classificação e que 70% deles não recebam tratamento (DISSANAYAKA et al., 2014; FORBES et al., 2021; LINTEL et al., 2021). Isso ocorre devido a complexa sintomatologia da ansiedade relacionada as flutuações motoras² na DP resultante da medicação dopaminérgica. Muitos pacientes apresentam sintomas de ansiedade durante os estados “*on*” e “*off*”, que pode resultar

² Oscilação dos sintomas motores devido a variação da concentração plasmática da medicação dopaminérgica.

em sintomas cíclicos e que estariam classificados como uma manifestação atípica em pacientes com DP (FORBES et al., 2021; LINTEL et al., 2021).

Além disso, os sintomas também podem ser confundidos com outras situações comuns na DP, como o efeito colateral de medicamentos, a agitação e incapacidade de concentração devido ao declínio cognitivo, sintomas de depressão, entre outros (LINTEL et al., 2021). Assim como os distúrbios olfatórios, gastrointestinais e a própria depressão, a ansiedade também pode preceder os sintomas motores da DP ou coexistir com esses outros sintomas, dificultando seu diagnóstico (DISSANAYAKA et al., 2016; LANDAU et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

1.3 ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS NA DOENÇA DE PARKINSON

Após as descrições pioneiras de Trétiakoff sobre a despigmentação da SN na DP, estudos subsequentes indicaram um acometimento marcante da substância negra *pars compacta* (SNpc) e do estriado dorsolateral, região que recebe a maior parte das projeções dopaminérgicas da SNpc (via nigroestriatal), sendo estas as estruturas mais afetadas pela doença. O estriado (núcleos caudado e putâmem) juntamente com o globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), a SN (SNpc e SN pars reticulada) e o núcleo subtalâmico (STN) formam os núcleos da base, cuja circuitaria controla diversas funções motoras, cognitivas e emocionais (SONNE; REDDY; BEATO, 2020).

Até então, acreditava-se que a DA era apenas um precursor de adrenalina e noradrenalina (NA), e em 1957 houve a primeira demonstração de que as maiores concentrações de DA eram encontradas no estriado (OBESO et al., 2017; PRZEDBORSKI, 2017). Em conjunto com as descobertas de Carlsson, a junção das peças desse quebra-cabeça foi essencial para o conhecimento da sinalização dopaminérgica e da via nigroestriatal. Atualmente está bem caracterizado que a DA é um neurotransmissor sintetizado a partir da hidroxilação de L-tirosina pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH), e armazenado em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VMAT₂) (MEISER; WEINDL; HILLER, 2013). Quando a DA é exocitada nos terminais sinápticos, ela pode ligar-se aos diversos receptores dopaminérgicos acoplados à proteína G (GPCR, *G-protein-coupled receptors*) presentes a nível pré e pós-sináptico.

Existem duas grandes famílias de receptores dopaminérgicos, denominadas D1 e D2. A família dos receptores D1 inclui os receptores dopaminérgicos (D_R) do tipo D1 e D5 (D_{1R} e D_{5R}), enquanto a família dos receptores D2 é composta pelos tipos D_{2R} , D_{3R} e D_{4R} . Esta classificação foi inicialmente baseada na variação de sinalização dos respectivos receptores (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Os receptores pertencentes a família D1 podem ser acoplados às proteínas G estimulatórias (G_s) e estimular a formação de 3'5'-adenosina-monofosfato cíclico (AMPc) através da ativação de adenilato ciclase, ou acoplados às proteínas G regulatórias (G_q) e estimular a formação de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). Já os receptores da família D2 são acoplados a proteínas G inibitórias (G_i), provocando a inibição da adenilato ciclase e redução na produção de AMPc. Além disso, eles também se diferenciam em relação à afinidade, estrutura e expressão (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; MASATO et al., 2019; MISGANAW, 2021).

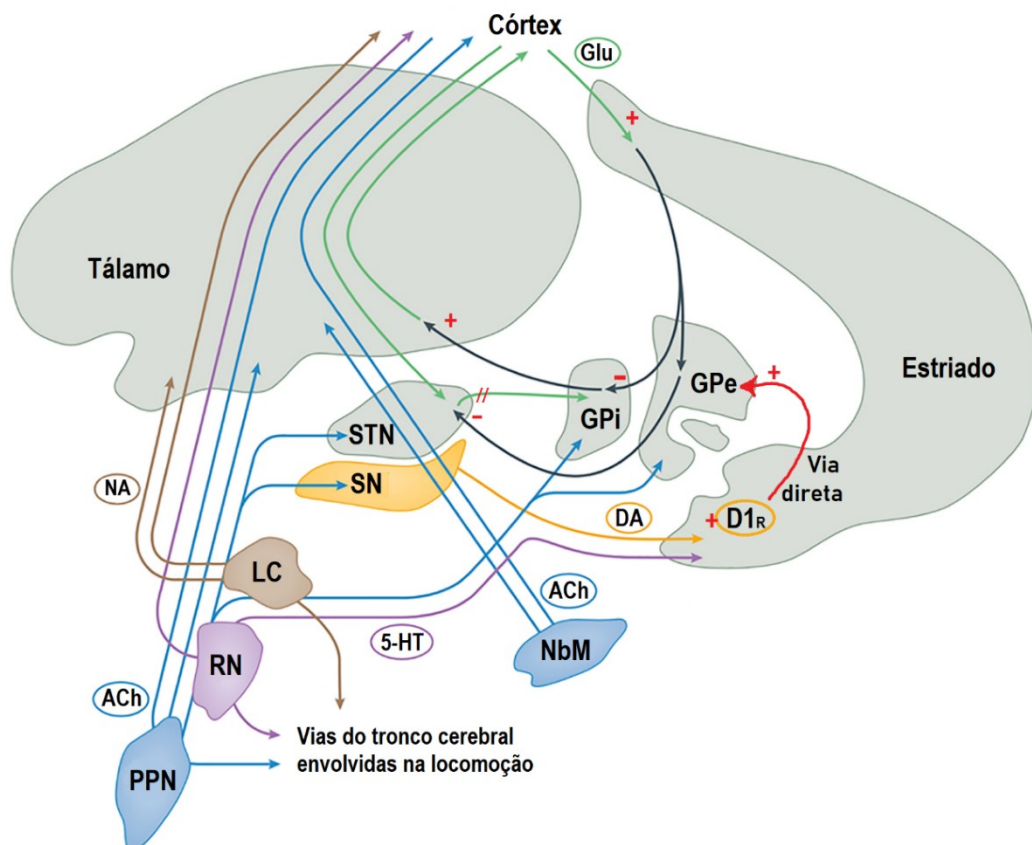
Após a excitação neuronal, a interrupção da sinalização de DA pode ocorrer pela degradação em células da glia ou em neurônios, pela recaptção mediada por DAT. A DA recaptada pelos neurônios é novamente armazenada em vesículas sinápticas e o excesso de neurotransmissor acumulado no citosol é degradado pela enzima monoamina oxidase (MAO), gerando como produto peróxido de hidrogênio e ácido 3,4-dihidróxifenilacético (DOPAC). Em astrócitos, a DA é degradada não somente pela MAO, mas também pela catecolamina O-metiltransferase (COMT), sendo os principais produtos o DOPAC e o ácido homovanílico (HVA) (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; MEISER; WEINDL; HILLER, 2013).

As projeções dopaminérgicas originadas da SNpc formam sinapses com neurônios que apresentam duas populações de receptores abundantes no estriado: os D_{1R} que ativam a via direta, e os D_{2R} que ativam a via indireta. Resumidamente, uma vez que a via direta é ativada, ela inibe o GPi, enquanto a via indireta inibe o GPe, que por sua vez inibe o STN e assim estimula o GPi. Acredita-se que a via direta favorece os movimentos, enquanto a via indireta atua suprimindo-os. O equilíbrio entre a atividade das duas vias no GPi é essencial para a função motora, permitindo que as projeções do tálamo estimulem o córtex motor (Figura 1). Assim, a neurodegeneração na SN e conseqüente redução da neurotransmissão dopaminérgica no estriado leva a uma desregulação na atividade de todo o circuito motor (POEWE et al., 2017; PRZEDBORSKI, 2017; SONNE; REDDY; BEATO, 2020).

De fato, o sistema dopaminérgico é muito mais complexo do que a via nigroestriatal *per se*. Existem outras três vias integrando o sistema: a túbero-hipofisário, a mesolímbica e a

mesocortical, sendo as duas últimas também referidas como sistema mesocorticolímbico. A via túbero-hipofisário projeta neurônios dos núcleos periventriculares e arqueados do hipotálamo para a eminência mediana, liberando DA no sistema portal hipofisário e inibindo a liberação de prolactina (GUDELSKY, 1981). Corpos celulares de neurônios na área tegmental ventral (VTA) do mesencéfalo inervam o estriado ventral, o tubérculo olfatório, o núcleo *accumbens*, o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal, formando as vias mesolímbica e mesocortical. Os neurônios dessas vias estão envolvidos na motivação e recompensa, assim como nos comportamentos emocionais. Dessa forma, a degeneração dopaminérgica na VTA pode contribuir para o desenvolvimento da depressão e da anedonia em pacientes com a DP (IKEMOTO, 2007; MASATO et al., 2019; IARKOV et al., 2020).

Figura 1. Esquemática dos circuitos que integram os núcleos da base



Legenda: Ilustração dos núcleos da base e suas conexões. Neurônios da SN liberam DA no estriado. A via direta inibe o globo pálido interno (GPi), que permite a ativação do tálamo e liberação de glutamato (Glu) pelo córtex. Neurônios originados no núcleo pedunculopontino (PPN) e no núcleo basal de Meynert (NbM) disparam

acetilcolina (ACh) no córtex, neurônios do núcleo da rafe (RN) liberam 5-HT no talâmo e córtex e o *locus coeruleus* (LC) projeta noradrenalina (NA) para o talâmo e o córtex. Fonte: Adaptado de Elkouzi et al. (2019).

Por muito tempo a neuropatologia da DP foi resumida pela perda dopaminérgica na SNpc, mas levando em consideração as variações fenotípicas, terapêuticas e a hipótese de Braak, não seria coerente limitar a DP a uma única estrutura neuronal ou a perda isolada no sistema dopaminérgico (TITOVA et al., 2017). Neurotransmissores como a acetilcolina, serotonina (5-hidroxitriptofano, 5-HT), NA, ácido gama-aminobutírico (GABA), e glutamato também estão envolvidos nos circuitos dos núcleos da base (Figura 1) e desempenham um papel importante na sintomatologia da DP (ELKOUZI et al., 2019). Hoje sabemos que a neurodegeneração também afeta células noradrenérgicas do *locus coeruleus* (LC), células colinérgicas no núcleo pedunculopontino (PPN) e células serotoninérgicas dos núcleos da rafe. Essas alterações são implicadas nos distúrbios da marcha, no tremor clássico e em alguns dos sintomas não motores da DP (BONNET, 2012; ELKOUZI et al., 2019).

Em especial, os neurônios serotoninérgicos também se projetam para o sistema límbico e para o estriado. Acredita-se que esse sistema esteja envolvido na modulação de vários processos cognitivos, como humor, emoção, sono e apetite; assim, é provável que a neurotransmissão serotoninérgica alterada esteja implicada em distúrbios motores e não motores observados na DP (POLITIS; NICCOLINI, 2015). Níveis reduzidos do principal metabólito de 5-HT, o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) foram identificados no estriado e no plasma de pacientes com DP (KISH et al., 2008; TONG et al., 2015).

Outro marcador extremamente relevante na DP, a α -sinucleína, afeta potencialmente diversas regiões não dopaminérgicas, incluindo o bulbo olfatório, SNE, LC e os núcleos da rafe antes de qualquer envolvimento da SN (BRAAK et al., 2004). Normalmente, essa proteína está envolvida em alguns processos celulares, que incluem a degradação de proteínas, manutenção de vesículas sinápticas, autofagia e até mesmo a regulação do transporte e liberação de DA (VILLAR-PIQUÉ; FONSECA; OUTEIRO, 2016; MASATO et al., 2019). Na DP, a α -sinucleína pode formar diferentes arranjos fibrilares desde dímeros até inclusões, sendo a principal constituinte dos corpos de Lewy. A α -sinucleína desempenha um papel importante no processo degenerativo, podendo levar à disfunção celular e impactar principalmente a função mitocondrial, dobramento e degradação de outras proteínas, transporte axonal e atividade sináptica (OZANSOY; BAŞAK, 2012; POEWE et al., 2017; TITOVA et al., 2017; BERG et al., 2021). Ainda, os oligômeros de α -sinucleína são transportados de célula para célula de

forma semelhante a príons, o que justifica a disseminação progressiva ao longo de anos ou décadas, de acordo com a hipótese de Braak (POEWE et al., 2017; TITOVA et al., 2017; BERG et al., 2021).

A nível celular, os processos de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo se destacam não só na DP, mas também em outros distúrbios não motores associados, como a depressão e os transtornos de ansiedade (HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010; MOYLAN et al., 2014; LIU et al., 2017; WEINTRAUB; MAMIKONYAN, 2019). Tanto a exposição a xenobióticos³ quanto mutações genéticas podem comprometer a atividade dos complexos mitocondriais em neurônios, levando a um aumento na produção de radicais livres, capazes de causar danos celulares e até mesmo ativar apoptose. Em tecidos isolados de pacientes com DP, a atividade do complexo I mitocondrial encontra-se reduzida (OZANSOY; BAŞAK, 2012; POEWE et al., 2017). A agregação de α -sinucleína e a disfunção mitocondrial se exacerbam mutuamente, sendo difícil determinar o que é causa ou efeito.

Os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, o que poderia explicar o motivo da degeneração afetar predominantemente a SNpc e permanecer sendo um dos principais marcadores da DP (SURMEIER; OBESO; HALLIDAY, 2017). Esses neurônios possuem axônios longos, não-mielinizados e um enorme número de sinapses, o que demanda maior gasto energético. Por último, a própria metabolização de DA pela MAO produz EROs, que em excesso podem contribuir para o estresse oxidativo (POEWE et al., 2017; SURMEIER; OBESO; HALLIDAY, 2017; TITOVA et al., 2017; MASATO et al., 2019).

A morte celular desencadeada pelo estresse oxidativo induz a ativação de astrócitos e micróglia. A micróglia é o principal macrófago no SNC e, quando ativada, sua morfologia é alterada para permitir a fagocitose e a liberação de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF), superóxidos, óxidos de nitrogênio, entre outros fatores que levam a inflamação tecidual (KHAN et al., 2018). Não se sabe se a neuroinflamação é desencadeada apenas pelo estresse oxidativo, ou se a própria resposta inflamatória induz um ciclo vicioso entre ambos. Até mesmo a neuromelanina dos neurônios dopaminérgicos pode induzir a neuroinflamação, assim como os agregados de α -sinucleína (BARNUM; TANSEY, 2012; POEWE et al., 2017; HIRSCH; STANDAERT, 2021). Além da importância na patogênese da

³ Substâncias químicas consideradas estranhas ao organismo.

DP, a neuroinflamação também é um potencial responsável pelo gatilho inicial da doença. Uma hipótese que vem se destacando é de que alterações na microbiota intestinal seriam capazes de induzir uma inflamação a nível periférico, o que desencadearia a DP a nível central (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015; SANTOS et al., 2019).

No espectro dos sintomas não motores, um estudo mostrou que os níveis de TNF estão correlacionados com o humor deprimido, a disfunção cognitiva e os distúrbios de sono em pacientes com a DP. Neste sentido, já foi sugerido que a inflamação no sistema olfatório ou no intestino seria responsável pelo dobramento incorreto de α -sinucleína devido ao escape dos mecanismos normais de degradação (BARNUM; TANSEY, 2012; TITOVA et al., 2017; KHAN et al., 2018).

Ainda não foi identificado o que de fato causa a neuroinflamação na DP, tampouco a origem da doença. Se há um mecanismo ou um conjunto de fatores, ou se é uma consequência da degeneração permanece uma incógnita. Sabe-se que a neuroinflamação persiste e se torna crônica, o que está intimamente relacionado com a progressão da doença (HIRSCH; STANDAERT, 2021).

1.3.1 A disfunção olfatória na doença de Parkinson

O sistema olfatório permeia a interface entre o meio ambiente e o SNC. Na cavidade nasal, o epitélio olfatório presente na extremidade posterior do nariz é capaz de detectar diversas moléculas provenientes do ambiente e traduzir essa informação para o bulbo e para o córtex olfatório, tornando esse sistema uma ponte de acesso direta ao SNC, contornando a barreira hematoencefálica (BHE) (BELL et al., 2019). Isso só é possível devido a neurônios sensoriais presentes no neuroepitélio que invadem o revestimento da cavidade nasal. As moléculas de odores se ligam aos GPCR nos dendritos desses neurônios e geram a transdução do sinal. Os axônios das células sensoriais projetam-se para o bulbo olfatório, onde neurônios secundários emitem suas fibras para as estruturas do córtex olfatório. Por fim, a informação olfativa é finalmente transmitida para o neocórtex através do tálamo (FIRESTEIN, 2001; LLEDO; GHEUSI; VINCENT, 2005; SUH; DENG; GAGE, 2009).

Os receptores olfatórios presentes na cavidade nasal são extremamente suscetíveis a invasão e ao dano de agentes xenobióticos, o que, segundo a hipótese da vetorização olfatória, poderia representar a porta de entrada de agentes envolvidos na etiologia da DP, como metais, vírus, pesticidas e herbicidas (DOTY, 2012). Em 2020, foi amplamente relatado o impacto da

exposição viral ao SARS-CoV-2 e seus efeitos a nível central, principalmente a anosmia e cefaleia precedentes ao desenvolvimento de sintomas respiratórios da COVID-19. Devido a esse neurotropismo do vírus e suas consequências no sistema olfatório, há uma expectativa no aumento de sequelas neuropsiquiátricas e na incidência de doenças neurodegenerativas nos próximos anos (ERAUSQUIN et al., 2021).

Há poucas evidências que suportam alterações significativas no epitélio olfatório de pacientes com a DP (BANG; LIM; CHOI, 2021). Por outro lado, a presença de agregados de α -sinucleína no bulbo e no córtex olfatório é bem estabelecida. Sugere-se que as áreas do bulbo olfatório são primeiramente afetadas, transmitindo os agregados de α -sinucleína para regiões do córtex e para o núcleo cortical da amígdala (DOTY, 2012; UBEDA-BAÑÓN et al., 2020). Essas alterações corroboram com a hipótese do primeiro estágio de Braak, na qual a degeneração de neurônios no bulbo olfatório seria a responsável pelos distúrbios olfatórios observados nas fases prodrômicas da DP (BRAAK et al., 2004).

Curiosamente, ao contrário do que ocorre nas vias dopaminérgicas mesocortical e mesolímbica, alguns achados sugerem que interneurônios dopaminérgicos presentes no bulbo olfatório seriam resistentes a neurodegeneração (DOTY, 2012; PIFL et al., 2017; BANG; LIM; CHOI, 2021). Na verdade, eles aumentam em número, especialmente em mulheres (TONG; KINGSBURY; FOSTER, 2000). Acredita-se que esse aumento se deve a um mecanismo compensatório induzido pela degeneração precoce de outros sistemas de neurotransmissão (MUNDIÑANO et al., 2011). O bulbo olfatório recebe uma grande quantidade de aferências noradrenérgicas, serotoninérgicas e colinérgicas. Todas essas vias estão implicadas na fisiopatologia da DP e desempenham papel importante na modulação da habituação, discriminação, memória e detecção de odores (GUERIN et al., 2008; PETZOLD; HAGIWARA; MURTHY, 2009; BANG; LIM; CHOI, 2021). Por exemplo, um déficit colinérgico no córtex límbico de pacientes com DP sem demência foi associado à disfunção olfatória (PEREZ-LLORET; BARRANTES, 2016).

Contudo, a hiposmia também pode ser uma consequência de outros sintomas não motores comuns à DP, como o prejuízo cognitivo e a depressão. Inclusive, a bulbectomia olfatória em ratos tem sido implementada como um modelo experimental confiável para o estudo de comportamentos semelhantes aos da depressão (ILKIW; LIMA, 2019).

1.3.2 A depressão na doença de Parkinson

Assim como a DP, a depressão é um distúrbio de caráter multifatorial, na qual mecanismos genéticos, epigenéticos e ambientais estão envolvidos (DUMAN et al., 2016). Muitas das alterações neuropatológicas presentes na DP são comuns à depressão. A desregulação de monoaminas é uma delas. A hipótese monoaminérgica postula que a depressão seria originada por uma diminuição ou deficiência nos níveis dos neurotransmissores 5-HT, DA e NA. As medicações antidepressivas utilizadas atualmente na clínica atuam quase que exclusivamente através de mecanismos monoaminérgicos (HILLHOUSE; PORTER, 2015).

A depressão na DP também tem sido associada a alterações dopaminérgicas na VTA, serotoninérgicas nos núcleos da rafe e noradrenérgicas no LC, que desequilibram a transmissão monoaminérgica nos córtices límbico, temporal e frontal (MENDONÇA et al., 2020). A gravidade da depressão em pacientes com DP já foi correlacionada com lesões dopaminérgicas mesolímbicas (WEI et al., 2018), enquanto a perda neuronal no LC foi cerca de sete vezes maior em pacientes depressivos com DP do que em pacientes com a DP sem depressão (FRISINA; HAROUTUNIAN; LIBOW, 2009). Ademais, uma redução mais acentuada nos níveis do principal metabólito de 5-HT, o 5HIAA, foi identificada no líquido cefalorraquidiano (MAYEUX et al., 1984) e no plasma (TONG et al., 2015) de pacientes com depressão associada à DP.

Em 1995, um modelo que unificava a neurodegeneração da DP com a depressão sugeriu que a degeneração primária de neurônios dopaminérgicos mesocorticais e mesolímbicos provocava a disfunção inicialmente no córtex orbitofrontal e, secundariamente, em neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe (AARSLAND et al., 2011). Outros circuitos propostos atualmente incluem o circuito límbico basotemporal e os circuitos frontoestriatais (córtex orbitofrontal, núcleos da base, córtex temporal, amígdala basolateral), visto que alterações nas áreas límbicas do córtex pré-frontal e estriado ocorrem na depressão. Apoiando essas hipóteses, há estudos demonstrando perda de substância branca em regiões córtico-límbicas em pacientes com depressão na DP (MATSUI et al., 2007; KOSTIĆ et al., 2010). Além disso, sintomas depressivos na DP se correlacionam com a atividade reduzida de transportadores de 5-HT nos núcleos da rafe, amígdala e hipotálamo (POLITIS et al., 2010), além da perda de inervação dopaminérgica e noradrenérgica no estriado ventral e amígdala de pacientes (REMY et al., 2005).

Além da hipótese monoaminérgica da depressão, algumas evidências apontam que também há um processo inflamatório envolvido, combinado com estresse oxidativo e um déficit de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês “*brain-derived neurotrophic factor*”), implicado na redução da neurogênese hipocampal e atrofia neuronal (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017; LI et al., 2021; LINTEL et al., 2021). Adicionalmente, regiões como a SNpc, hipocampo, tálamo e córtex pré-frontal apresentam uma maior ativação de micróglia em autópsias de pacientes com a DP (IMAMURA et al., 2003). O perfil pró-inflamatório dessas células parece estar relacionado a neurodegeneração na DP, e também envolvido com a fisiopatologia da depressão (MENDONÇA et al., 2020). Pacientes com sintomas não motores da DP, incluindo a depressão, apresentam níveis elevados de marcadores pró-inflamatórios, o que também é observado em pacientes com depressão não associada a DP (MENZA et al., 2010; LINDQVIST et al., 2013; BAKUNINA; PARIANTE; ZUNZAIN, 2015). Em modelos animais de DP, um aumento da população de micróglia é encontrado no hipocampo de ratos, acompanhado de comportamento tipo-depressivo e redução da neurogênese hipocampal (BONATO et al., 2018).

Além da resposta inflamatória, a micróglia tem um papel essencial na plasticidade sináptica, promovendo a sobrevivência neuronal, atuando na formação e manutenção de novas sinapses e novos neurônios (TROUBAT et al., 2021). Acredita-se que na depressão os mecanismos envolvidos na neuroplasticidade encontram-se alterados, desencadeando a atrofia neuronal no córtex pré-frontal e no hipocampo (DUMAN et al., 2016). A hipótese neurotrófica da depressão é fundamentada pela redução da neurogênese, dos espinhos dendríticos e da arborização dendrítica, em consequência da diminuição de fatores neurotróficos, como o BDNF. De fato, os níveis de BDNF estão diminuídos na SN de pacientes com DP, bem como no hipocampo e no soro de indivíduos deprimidos na população geral (BAQUET; BICKFORD; JONES, 2005; MATRISCIANO et al., 2009; LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017). Ainda, um estudo observou que pacientes parkinsonianos com depressão apresentam níveis plasmáticos de BDNF mais baixos do que pacientes não deprimidos com a DP ou indivíduos saudáveis (WANG et al., 2017). A redução da neurogênese é um possível mecanismo subjacente aos sintomas depressivos na DP. As autópsias de pacientes com a DP mostraram uma diminuição da proliferação celular no hipocampo (HÖGLINGER et al., 2004; WINNER et al., 2012), o mesmo é observado em modelos animais da DP (BONATO et al., 2018).

1.3.3 Os transtornos de ansiedade na doença de Parkinson

Os transtornos de ansiedade estão diretamente associados a um reflexo comportamental ao medo e a ameaça. Medo é caracterizado como uma resposta emocional a uma ameaça iminente real e percebida pelo indivíduo, que dispara uma reação de ataque ou fuga e na maioria das vezes cessa assim que a ameaça é retirada. Já a ansiedade é a antecipação de uma ameaça futura, normalmente devido a pistas distantes ou incertas que tendem a durar mais do que as respostas baseadas no medo. A ansiedade e o medo são reações normais e não patológicas, no entanto, quando tornam-se recorrentes, persistentes e interferem na qualidade de vida, então existe um transtorno de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; HORWITZ, 2013; OVERTON; COIZET, 2020).

Os três tipos de transtornos de ansiedade relatados na DP (ansiedade generalizada, fobias e transtorno de pânico) são fenotipicamente diferentes, mas todos apresentam alterações no circuito responsável pela detecção e reação de ameaças (OVERTON; COIZET, 2020; CAREY et al., 2021). Uma das principais estruturas envolvida neste circuito é a amígdala, que coordena as informações de um perigo ou ameaça. Ela recebe aferências excitatórias do tálamo após a detecção de uma ameaça, e em conjunto com hipocampo e córtex pré-frontal avaliam a gravidade do perigo. A atividade coordenada dessas estruturas pode iniciar a vigilância e os comportamentos defensivos através da ativação de núcleos hipotalâmicos e do tronco encefálico. Ainda, o córtex pré-frontal é capaz de conduzir mudanças entre comportamentos motivados por ansiedade e por recompensa, criando um microcircuito entre amígdala e núcleo *accumbens* que determina a valência emocional dos eventos (CALHOON; TYE, 2015). Hipotetiza-se que o aumento da excitabilidade neuronal nesse circuito se correlacione com o comportamento ansioso em humanos e em modelos animais (FELIX-ORTIZ et al., 2016; SAH, 2017). Inclusive, fármacos que reduzem o limiar excitatório dos neurônios no SNC, como os agonistas alostéricos de receptores GABAérgicos (ex: benzodiazepínicos) são utilizados para o tratamento de transtornos de ansiedade (DISSANAYAKA et al., 2015).

A transmissão glutamatérgica e GABAérgica é predominante, contudo também existe influência monoaminérgica nos circuitos relacionados a ansiedade, devido as projeções de neurônios da VTA, do LC e dos núcleos da rafe para as estruturas dessa rede (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Uma revisão sistemática recente mostrou que a severidade da ansiedade na DP está associada a redução da atividade dopaminérgica e noradrenérgica no

estriado, tálamo e LC; e uma redução da atividade serotoninérgica no tálamo (CAREY et al., 2021).

Levando em consideração a hipótese monoaminérgica da depressão, a coexistência dos sintomas de ansiedade e depressão na DP e a semelhança de estruturas envolvidas na fisiopatologia entre ambas, alguns autores sugerem que a expressão desses comportamentos está associada a comorbidade e progressão da DP, enquanto outros acreditam que a depressão ansiosa representa um subtipo depressivo comum na DP (BROWN et al., 2011).

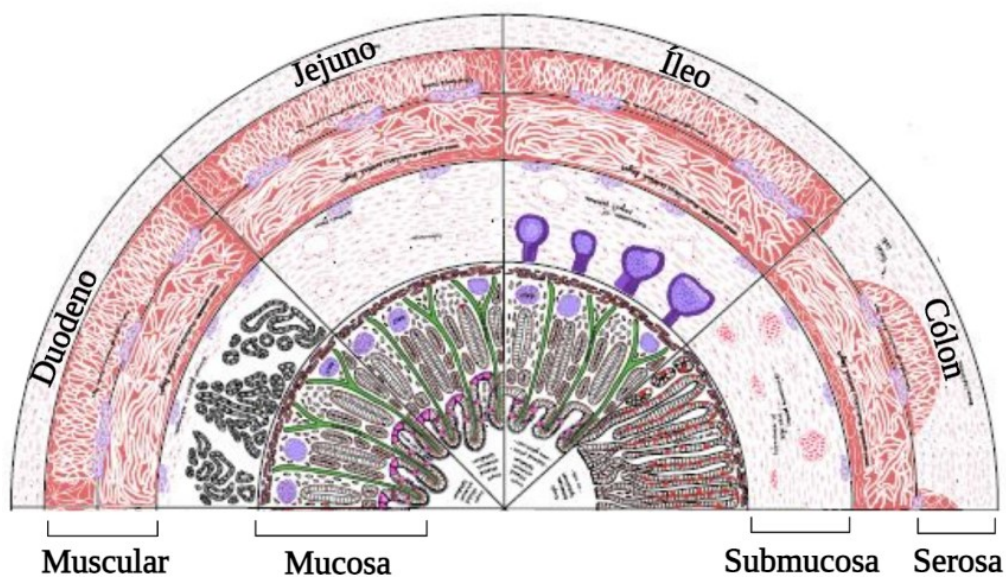
1.4 O SEGUNDO CÉREBRO: O PAPEL DO INTESTINO NA DOENÇA DE PARKINSON

O trato gastrointestinal (TGI) é composto por uma série de órgãos tubulares responsáveis pelo processamento e absorção de alimentos, água e nutrientes. Pode ser dividido em TGI superior, incluindo a boca, esôfago, estômago, duodeno, jejuno e íleo; e em TGI inferior, que compreende o cólon, reto e o ânus (GREENWOOD-VAN MEERVELD; JOHNSON; GRUNDY, 2017). Esse sistema está em constante contato com o ambiente externo e apresenta uma barreira física e imune que desempenha uma das principais linhas de defesa do organismo (TAKIISHI; FENERO; CÂMARA, 2017).

O intestino delgado, destaque nesse trabalho, se inicia no piloro do estômago e termina na válvula ileocecal. Ele é composto por quatro camadas de tecido: mucosa, submucosa, músculo e serosa, representadas na Figura 2. A primeira é formada pelo epitélio que está em contato direto com o lúmen, a lâmina própria e a muscular da mucosa. As células epiteliais ou enterócitos são repletos de microvilosidades para aumentar a absorção intestinal e podem ser diferenciadas em sete tipos celulares (VOLK; LACY, 2017). Células de Paneth, por exemplo, secretam peptídeos antimicrobianos, enquanto células caliciformes secretam mucinas que lubrificam a superfície epitelial e participam da apresentação de antígenos (TAKIISHI; FENERO; CÂMARA, 2017). A lâmina própria fornece sustentação para o epitélio e comporta linfócitos, células dendríticas e mastócitos que formam o tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês *gut associated lymphoid tissue*) que é mais frequente no íleo. Abaixo da lâmina própria está a muscular da mucosa, uma fina camada de músculo liso (TAKIISHI; FENERO; CÂMARA, 2017; VOLK; LACY, 2017).

A barreira intestinal formada pelas células epiteliais é mantida por junções celulares, como zonas de adesão, oclusão e desmossomos. Essas proteínas garantem a comunicação entre as células e regulam a permeabilidade da mucosa (CAMILLERI, 2019). O rompimento dessa barreira e o aumento da permeabilidade intestinal é associado a processos inflamatórios, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e agregação de α -sinucleína, além de estar presente em indivíduos com a DP (IJZENDOORN; DERKINDEREN, 2019; YANG et al., 2019).

Figura 2. Organização tecidual do intestino delgado e cólon



Legenda: Estrutura histológica da parede intestinal em corte longitudinal. Fonte: Adaptado de Wilk-Blaszczak (2021).

Logo abaixo da camada mucosa, encontra-se a camada submucosa, constituída por tecido conjuntivo no qual residem células nervosas, formando o plexo submucoso, e vasos sanguíneos e linfáticos comunicando-se tanto com a mucosa adjacente quanto com a camada muscular externa. Esta, por sua vez, é responsável pela contração do intestino delgado e dispõe-se em uma camada de músculo liso circular interna, que produz a contração de estreitamento do lúmen, e uma camada longitudinal externa, cuja contração reduz o comprimento do tubo. Entre essas duas divisões musculares, encontra-se o plexo mioentérico, formado por neurônios e gânglios simpáticos e parassimpáticos, responsável pelo controle da contração e do

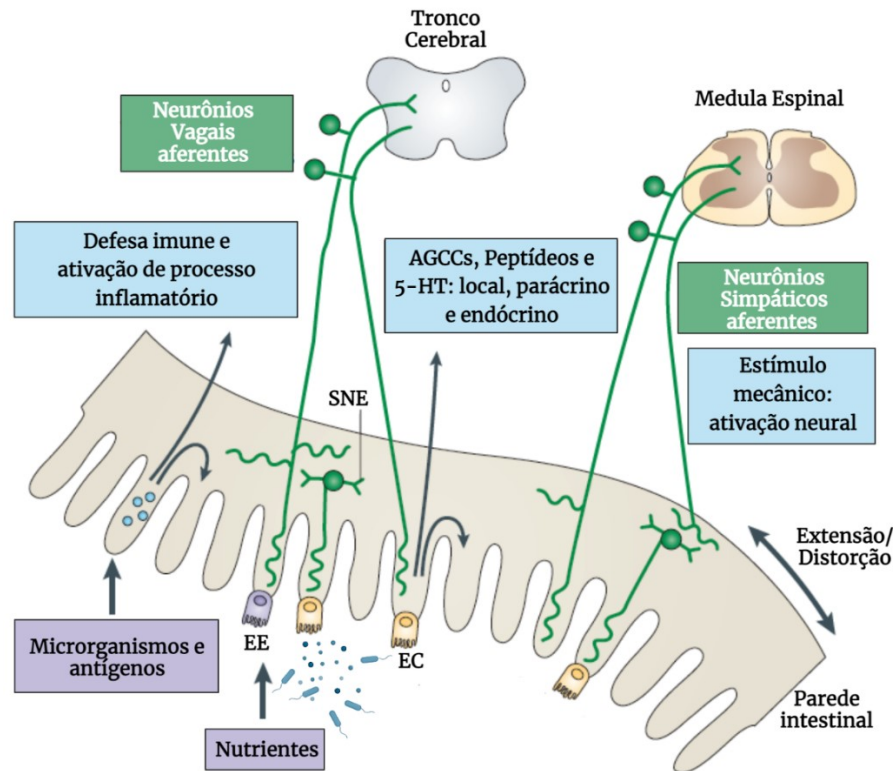
peristaltismo. Por fim, temos a serosa, composta por tecido conjuntivo que sustenta o TGI na cavidade abdominal (HALL; C., 2017; VOLK; LACY, 2017).

1.4.1 Eixo Intestino-Encéfalo-Microbiota

Naturalmente ouvimos expressões que remetem o TGI às emoções do cotidiano, como “isso é de embrulhar o estômago” ou “sentimento de frio na barriga”. Não por coincidência, o intestino tem sido chamado de “segundo cérebro” devido à complexidade de neurônios e neurotransmissores presentes no SNE, além da intensa comunicação bidirecional com o SNC (MAYER, 2011; FÜLLING; DINAN; CRYAN, 2019). Reforçando esse eixo, existem trilhões de microrganismos presentes no TGI compondo a microbiota gastrointestinal, que, segundo pesquisas recentes, parecem influenciar no comportamento, na imunidade e no sistema endócrino. Leveduras, vírus e protozoários fazem parte da gama de microrganismos residentes no intestino, mas a maior parte dessa população é formada por bactérias. Os filos mais relevantes são Firmicutes e Bacteroidetes, que representam cerca de 90% da microbiota, além dos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia (RINNINELLA et al., 2019).

Existem muitas vias de comunicação entre a microbiota intestinal e o encéfalo, desde vias neuronais aferentes e eferentes até sistemas de mensagens de pequenas moléculas. Metabólitos produzidos pelos microrganismos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), precursores de hormônios e neurotransmissores podem desencadear uma resposta nos enterócitos seguida pela comunicação com o nervo vago ou atravessar a barreira intestinal, percorrer a circulação e atravessar a BHE (THURSBY; JUGE, 2017; VUONG et al., 2017; CRYAN et al., 2019). Constituinte do sistema nervoso parassimpático, o nervo vago é a via mais direta entre o intestino e o SNC, com 80% das fibras aferentes e 20% de fibras eferentes. Essas fibras não cruzam o epitélio, nem possuem contato direto com a microbiota, como ilustra a Figura 3. Contudo, as células enteroendócrinas interagem diretamente com as aferências vagais através da liberação de 5-HT estimulada pelos metabólitos citados anteriormente (HOUSER; TANSEY, 2017; GENEROSO et al., 2020).

Figura 3. Comunicação entre microbiota, intestino e SNC



Legenda: Estímulos mecânicos (estiramento, pressão, distorção e forças de cisalhamento) podem ativar as aferências espinhais, vagais e o SNE diretamente. Moléculas de sinalização (incluindo 5-HT, citocinas e AGCC) que são produzidas por enteroendócrinas (EE), células imunes ou pela microbiota podem ativar seus respectivos receptores em aferentes vagais e espinhais. Da mesma forma, neuropeptídeos e hormônios que são liberados das células EE em resposta a outros fatores luminiais, como nutrientes, toxinas ou antígenos, podem atuar também de forma endócrina, atingindo a circulação e alvos no encéfalo. Fonte: Adaptado de Mayer (2011).

Já foi demonstrado que a α -sinucleína é transportada como um príon pelo nervo vago até atingir o SNC; fato que corrobora com a hipótese de que a DP se iniciaria periféricamente (BRAAK et al., 2004; ULUSOY et al., 2017; KIM et al., 2019). Chen e colaboradores (2016) mostraram que o acúmulo de α -sinucleína no SNE, e posteriormente no SNC, pode ser induzido através de modificações na microbiota intestinal. Já em um modelo geneticamente modificado para superexpressar α -sinucleína humana, a ausência de microbiota suprimiu o aparecimento de déficits motores comumente observados no modelo. Além disso, o transplante de microbiota de pacientes com a DP nos mesmos animais prejudicou a função motora (SAMPSON et al., 2016).

Em humanos com a DP, existem relatos mostrando alterações na diversidade, composição e abundância da microbiota intestinal (DINAN; CRYAN, 2017a). Pacientes com a

DP apresentam redução nos níveis de Prevotellaceae e abundância de Enterobacteriaceae, Bifidobacterium e Firmicutes (SNIGDHA et al., 2021). Um estudo clínico observou que uma maior abundância de enterobactérias é observada em pacientes com sintomas predominantemente não motores, que estão associados à uma progressão clínica mais rápida e a um pior prognóstico (SCHEPERJANS et al., 2015). Da mesma forma, alterações na composição e na diversidade da microbiota intestinal de indivíduos depressivos já foram descritas (JIANG et al., 2015; SIMPSON et al., 2021). Até o momento, um único estudo associou alterações na microbiota de pacientes com depressão comórbida a DP, demonstrando níveis aumentados de *Christensenella minuta*, *Clostridium disporicum* e *Oscillibacter valericigenes* nesses indivíduos (ALIFIROVA et al., 2016).

Sugere-se que a microbiota também pode interferir na disponibilidade de L-DOPA. Em pacientes com a DP, níveis reduzidos de L-DOPA estão correlacionados a uma abundância de tirosina descarboxilase bacteriana intestinal. Essa enzima converte L-DOPA em DA no intestino, mesmo na presença de inibidores da DOPA-descarboxilase, diminuindo a absorção de L-DOPA e impactando na concentração deste fármaco que chega ao SNC (KESSEL et al., 2019). No entanto, permanece incerto se as alterações no microbioma intestinal são um fator de risco ou uma consequência da DP (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015).

1.4.2 Motilidade e contração do músculo liso

Com exceção dos primeiros dois terços do esôfago e do esfíncter anal externo, a camada muscular do TGI é formada por células musculares lisas (SANDERS et al., 2012). Ao contrário do músculo estriado, essas células não possuem estrias e geralmente necessitam de segundos mensageiros para a abertura dos canais de cálcio. O músculo liso desenvolve contrações tônicas (mantidas) ou fásicas, o que é essencial para o peristaltismo. Assim, as contrações são intercaladas com relaxamento e, especialmente no intestino delgado, são rítmicas e impulsionadas por ciclos de ondas lentas (MURTHY, 2006; KUO; EHRLICH, 2015).

Devido à autonomia do músculo liso no TGI, esses ciclos são originados por uma atividade de marcapasso, independentemente de *inputs* neuronais ou hormonais. As células intersticiais de Cajal (IC) são as responsáveis pela contração espontânea do músculo, mas sozinhas não são suficientes para constituir a motilidade do TGI. Por isso, as entradas neurais

inibitórias ou excitatórias modulam a amplitude das contrações durante cada ciclo (SANDERS et al., 2012; KUO; EHRLICH, 2015). A atividade neural deve-se principalmente pelos neurônios que constituem o SNE que, em conjunto das células IC, podem controlar a motilidade intestinal independentemente do SNC. Diante disso, segmentos intestinais removidos de vertebrados e estudados isoladamente *ex vivo* continuam a gerar contrações, apesar de todos os nervos extrínsecos terem sido cortados (SPENCER; HU, 2020).

O SNE é uma rede expansiva de células presentes nos plexos submucoso e mioentérico. Elas podem ser neurônios sensoriais (também chamados de neurônios aferentes primários intrínsecos), interneurônios ou neurônios motores (tanto excitatórios, quando inibitórios). A comunicação bidirecional entre SNC e SNE ocorre através da conectividade dos neurônios intrínsecos com os nervos simpáticos e parassimpáticos extrínsecos (FURNESS, 2012; VOLK; LACY, 2017). Enquanto os neurônios do SNE projetam-se para os gânglios simpáticos, medula espinhal e tronco encefálico; nervos simpáticos que se originam na medula espinhal fazem sinapses diretamente nos gânglios mioentéricos, músculo liso e mucosa (FURNESS, 2012; SPENCER; HU, 2020).

A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor excitatório no TGI, sendo produzida por neurônios sensoriais, interneurônios e, principalmente, neurônios motores excitatórios. Uma pequena porção desses neurônios também produz DA, 5-HT e GABA. A DA é majoritariamente inibitória e parece atuar como um modulador ao inibir a liberação de ACh pelos neurônios colinérgicos que expressam D_{2R} (COLUCCI et al., 2012; SANDERS et al., 2012; GREENWOOD-VAN MEERVELD; JOHNSON; GRUNDY, 2017).

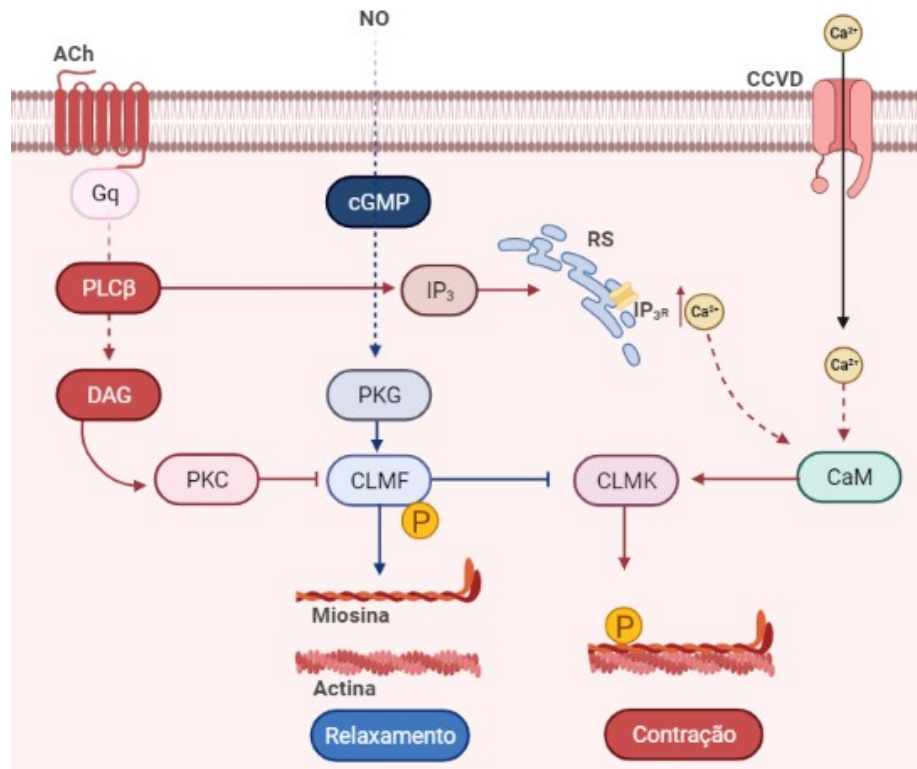
Existe uma grande variedade de receptores e subtipos de receptores capazes de mediar a contração do músculo liso. Os receptores muscarínicos M₂ e M₃ são os predominantes (MURTHY, 2006). Ambos são responsáveis pelas contrações colinérgicas, mas os receptores M₃ parecem ter uma contribuição maior (TANAHASHI et al., 2013; MUISE et al., 2017). Os receptores muscarínicos pertencem a família de GPCRs e possuem 5 subtipos conhecidos (M₁-M₅). Os M_{1R}, M_{3R} e M_{5R} são acoplados à subunidade G_q enquanto os M_{2R} e M_{4R} são acoplados a subunidade G_i (CAULFIELD, 1993).

A contração no músculo liso é iniciada pelo influxo de Ca²⁺, que pode ser decorrente de um estímulo extracelular, intracelular ou a combinação de ambos. A despolarização das células, por exemplo, induz a abertura de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem. O influxo de Ca²⁺ também pode ocorrer através de canais não seletivos que são ativados por agonistas ou

pela extensão do músculo. Já a ativação de GPCRs acoplados à subunidade G_q ativa a fosfolipase C, formando dois mensageiros secundários: o diacilglicerol (DAG) e o IP_3 . Este liga-se a receptores (IP_{3R}) no retículo sarcoplasmático e conseqüentemente promove a liberação de Ca^{2+} intracelular (Figura 4).

O aumento do íon no interior da célula e sua interação com a calmodulina ativa a quinase da cadeia leve de miosina (CLMK), que fosforila a cadeia leve de miosina (CLM) e permite sua interação com a actina, conseqüentemente a contração. O relaxamento ocorre quando esse estímulo é inibido pela atividade da enzima fosfatase da cadeia leve de miosina (CLMF), responsável pela desfosforilação da CLM (Figura 4). Em conjunto com o Ca^{2+} , o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) responsável pela fosforilação de proteínas, em especial a CLMF. A ativação de PKC inibe a atividade da CLMF, permitindo a fosforilação da CLM e a contração muscular (MURTHY, 2006; SANDERS et al., 2012; KUO; EHRLICH, 2015). Por outro lado, mecanismos que permitem a atividade da CLMF, assim como a remoção do estímulo contrátil, induzem o relaxamento (KUO; EHRLICH, 2015). É o caso do NO, que se liga à guanilato ciclase, ativando a proteína quinase dependente do cGMP (PKG), reduzindo a sensibilização de Ca^{2+} e inibindo a ativação da CLMK (SANDERS et al., 2012). A ativação da proteína quinase A tem efeitos similares. À medida que os receptores da família D_1 ativam a adenilato ciclase, espera-se uma indução do relaxamento do músculo liso (KIRSCHSTEIN et al., 2009; SANDERS et al., 2012; ZIZZO et al., 2016).

Figura 4. Representação esquematizada do tônus muscular liso



Legenda: Fatores que levam a inibição da CLMF, como a ativação da proteína quinase C (PKC) através da ligação de receptores acoplados à proteína G. Fatores que estimulam a enzima CLMF, como a ativação da proteína quinase dependente do cGMP (PKG), induzem o relaxamento. Abreviações: CCVD, canais de Ca²⁺ voltagem dependentes; RS, retículo sarcoplasmático; ACh, acetilcolina; NO, óxido nítrico; CaM, calmodulina; CLMK, quinase da cadeia leve de miosina; CLMF, cadeia leve de miosina fosfatase; PKC, proteína quinase C; PKG, proteína quinase dependente do cGMP; PLCβ, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; IP3, inositol trifosfato 1,4,5-trisfosfato; IP3R, receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato. Fonte: Elaborado pela autora com BioRender.com (2021).

Ainda se discute se a constipação associada à DP é consequência da morte de neurônios do SNE ou o resultado de alterações no eixo intestino-encéfalo. Vários modelos experimentais mostram a perda de neurônios entéricos, enquanto a minoria observa alterações de neurotransmissores (ANDERSON et al., 2007; COLUCCI et al., 2012). Utilizando um modelo de neurodegeneração central, Fornai et al. (2016) mostraram que a perda dopaminérgica nigroestriatal resultou no prejuízo da neurotransmissão excitatória mioentérica e aumento da expressão de M₂R e M₃R no colón de ratos. Já em primatas, a perda de neurônios da via nigroestriatal foi associada à alterações no relaxamento mediado pelo NO em segmentos de íleo, assim como perda de neurônios entéricos colinérgicos, mas não dopaminérgicos (COLETTI et al., 2019).

1.5 O TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE PARKINSON

1.5.1 Tratamento dos sintomas motores

Cerca de 150 anos após a publicação de James Parkinson, as descobertas de Carlsson e colaboradores deixaram evidente que a reposição dopaminérgica era um mecanismo terapêutico relevante na DP. Após alguns ensaios clínicos, o uso da L-DOPA, um precursor da síntese de DA, mostrou melhora significativa em pacientes e permanece até hoje como o tratamento mais eficaz para os sintomas motores relacionados à DP (OBESO et al., 2017; IARKOV et al., 2020). De tal modo, o tratamento farmacológico para os sintomas motores ainda se baseia principalmente em drogas que aumentam as concentrações encefálicas de DA ou estimulam os receptores dopaminérgicos nos núcleos da base. Além da L-DOPA, agonistas de DA e inibidores da MAO-B são terapias iniciais comumente utilizadas (KALIA; LANG, 2015; ARMSTRONG; OKUN, 2020).

A L-DOPA é administrada por via oral, atravessa a barreira hematoencefálica e é convertida em DA nos neurônios que ainda não sofreram neurodegeneração. Ela causa alguns efeitos colaterais periféricos, como náuseas e hipotensão, que podem ser evitados com a associação de inibidores das descarboxilases que degradam a L-DOPA no intestino (carbidopa ou benserazida) (KALIA; LANG, 2015; BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020). Outros efeitos colaterais incluem sonolência, confusão, alucinações e distúrbios de controle de impulso. Entretanto, a limitação mais importante é o desenvolvimento de complicações motoras (como as discinesias e flutuações *on-off*) após o tratamento crônico.

Conforme a doença progride, os indivíduos perdem a capacidade de armazenar DA e, diante disso, há uma diminuição na resposta de longa duração à medicação. Com o tempo, o paciente requer um regime de doses mais frequentes de L-DOPA e adição de um agonista ou inibidor da metabolização de dopamina para o tratamento (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Os agonistas dopaminérgicos (ex: pramipexol e bromocriptina) atuam diretamente nos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos, sem a necessidade do metabolismo neuronal. Já os inibidores da MAO-B (ex: selegilina e rasgailina) reduzem a metabolização de DA e assim prolongam e potencializam a estimulação dopaminérgica, assim como os inibidores da enzima COMT (ex: tolcapona e entacapona) (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020).

Embora os medicamentos disponíveis aliviem os sintomas motores da DP, essa estratégia é meramente paliativa, visto que essas drogas não são capazes de desacelerar ou interromper o processo neurodegenerativo (KALIA; LANG, 2015). Além disso, estas medicações possuem eficácia limitada sobre os sintomas não motores da DP.

1.5.2 Tratamento dos sintomas não motores

A maior parte dos fármacos utilizados para tratar os sintomas não motores da DP são semelhantes aos tratamentos para esses sintomas na população em geral. Desta forma, o sistema dopaminérgico raramente é um alvo farmacológico (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Contudo, como a depressão e ansiedade podem estar correlacionados com as flutuações motoras, o ajuste da medicação dopaminérgica pode ser útil nesses casos (SAUERBIER et al., 2017).

Quando não relacionada às flutuações motoras, a depressão pode ser tratada pela otimização da posologia de L-DOPA através da associação com agonistas de dopamina e inibidores da MAO-B. O pramipexol, um agonista de dopamina seletivo para D₃R, mostrou a melhor eficácia para depressão na DP até o momento (RANA et al., 2015). Os subtipos dos D₃R estão distribuídos em regiões do sistema límbico, incluindo o núcleo *accumbens*, sendo a expressão desses receptores no estriado regulada pelo BDNF (LEGGIO et al., 2013). Entretanto, falhas metodológicas e falta de significância clínica já foram implicadas nesses estudos, e alguns autores acreditam que não há evidências suficientes para apoiar o uso dos agonistas dopaminérgicos para sintomas depressivos na DP (LEENTJENS, 2012; RYAN; EATMON; SLEVIN, 2019).

Na prática clínica, é comum a utilização de antidepressivos, especialmente inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS), além de antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação da 5-HT e NA (ISRSN) (KALIA; LANG, 2015; ARMSTRONG; OKUN, 2020). O uso desses medicamentos apresenta um efeito moderado na redução da sintomatologia, mas uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados mostrou que apenas os ISRS apresentam um tamanho de efeito estatisticamente significativo nos escores de depressão na DP (BOMASANG-LAYNO et al., 2015). Não há nenhum ensaio clínico randomizado para o tratamento da ansiedade na DP, mas medidas de ansiedade secundárias a depressão parecem ser reduzidas com o uso de fármacos ISRSs, ISRSNs e antidepressivos tricíclicos (LINTEL et al., 2021). Esses fármacos são recomendados para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico na população em geral (STRAWN et al., 2018).

Fadiga, distúrbios do sono e hiposmia são alguns dos sintomas não motores que também permanecem sem um tratamento farmacológico específico. Abordagens para insônia são as mesmas para a população em geral, que inclui o uso de melatonina e clonazepam (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Da mesma forma, outros benzodiazepínicos podem auxiliar no sono e na ansiedade, embora não sejam preferencialmente empregados devido ao maior risco de disfunção autonômica e cognitiva (ARMSTRONG; OKUN, 2020; LINTEL et al., 2021).

Em relação à constipação gastrointestinal observada na DP, quando as estratégias não farmacológicas de manejo da alimentação não são suficientes, é comum o uso de laxantes osmóticos (SAUERBIER et al., 2017; ARMSTRONG; OKUN, 2020). Ademais, existem alguns estudos demonstrando eficácia no uso de probióticos e prebióticos⁴ para alterações gastrointestinais não relacionadas à DP (BARICHELLA et al., 2016). Existem diversos ensaios clínicos utilizando esses recursos para o tratamento da DP, apostando que a alteração da composição da microbiota além de melhorar a função GI, pode reduzir a permeabilidade intestinal e a neuroinflamação (GAZERANI, 2019).

1.6 DIFERENÇAS SEXUAIS NA DOENÇA DE PARKINSON

O sexo biológico parece ser um fator importante no desenvolvimento da DP. Observamos diferenças nítidas nas características epidemiológicas, sendo a doença mais comum em homens. Entretanto, as mulheres são diagnosticadas mais tardiamente e apresentam predominância de tremores em relação aos outros sintomas motores, o que pode dificultar o diagnóstico (CERRI; MUS; BLANDINI, 2019).

Em particular, o sexo feminino é um fator de risco conhecido para o prejuízo da qualidade de vida na doença, uma vez que está associado a maior prevalência de transtornos de humor (PICILLO et al., 2017; BALASH et al., 2019). Enquanto os sintomas motores são mais evidentes nos homens, a perda de interesse, falta de motivação, sensação de nervosismo, dificuldade em experimentar prazer, constipação e dor têm sido relatados com maior frequência e gravidade em mulheres diagnosticadas com a DP (PERRIN et al., 2017; SAUERBIER et al., 2017). Ainda, o sexo feminino está associado a ansiedade mais grave, persistente e episódica e

⁴ Probióticos são definidos como microorganismos vivos, enquanto prebióticos são fibras insolúveis que estimulam a atividade da microbiota intestinal.

a depressão profunda, enquanto os transtornos de controle de impulso são mais comuns no sexo masculino com a DP (CERRI; MUS; BLANDINI, 2019).

Acredita-se que os sintomas não motores se desenvolvem de maneiras distintas entre homens e mulheres conforme a progressão da doença. Durante o estágio prodrômico, é mais comum homens relatarem dificuldades de paladar e olfato, enquanto mulheres relatam com maior frequência sintomas de ansiedade e depressão (NICOLETTI et al., 2017). Durante o curso da doença, os sintomas não motores aparecem na forma de flutuações com mais frequência em mulheres. Picillo et al. (2016) relataram que após 4 anos desde o início da terapia dopaminérgica, pacientes do sexo feminino estavam mais propensas a apresentar flutuações não motoras relacionadas ao humor. Também associada ao tratamento, as mulheres tendem a ter um início mais precoce dos períodos de “*on-off*” e um risco maior de desenvolver discinesias induzidas por L-DOPA. Em contrapartida, os homens parecem ter características motoras mais graves ao longo do curso da doença (OLANOW et al., 2013).

As diferenças sexuais observadas na DP são influenciadas por fatores genéticos, ambientais, hormonais, estilo de vida, efeitos culturais e sociais (MEONI; MACEROLLO; MORO, 2020). O gene que codifica a enzima MAO, por exemplo, está presente no cromossomo X e homens que carregam o alelo G apresentam um risco maior de desenvolver complicações motoras quando tratados com altas doses de L-DOPA (SAMPAIO et al., 2018). Já um polimorfismo no gene que codifica o D_{2R} mostrou um efeito protetor à suscetibilidade de desenvolver discinesias em homens, mas não em mulheres (DOS SANTOS et al., 2019).

Como a maioria das mulheres é diagnosticada após a menopausa, acredita-se que a redução hormonal tem um papel importante na patogênese da DP. Algumas evidências apontam que os estrógenos são responsáveis por atividades neuromodulatórias e neuroprotetoras no estriado e na SN (PICILLO et al., 2017). O estrogênio ativa vias que protegem contra a toxicidade glutamatérgica e de EROs, aumenta a expressão de fatores neurotróficos como o BDNF, reduz a ativação de micróglia e o recrutamento de monócitos periféricos para o encéfalo (VAIDYA et al., 2021). Em comparação, os níveis de testosterona em homens foram correlacionados a melhora dos sintomas motores. Ao mesmo tempo, há relatos de que a testosterona pode aumentar a neurotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos (AVSAR, 2018).

Curiosamente, os hormônios sexuais também modulam a microbiota intestinal. Na infância não há diferenças na composição entre os sexos, mas na vida adulta as mulheres férteis

apresentam maior diversidade de bactérias intestinais do que os homens (TETEL et al., 2018; JAGGAR et al., 2020). Ainda, a abundância de bactérias produtoras de AGCC é maior nas mulheres na fase de pré-menopausa, em comparação com a pós-menopausa e homens da mesma idade (SANTOS-MARCOS et al., 2018). Até o momento não existem muitas descrições de diferenças na microbiota entre os sexos biológicos na DP, sendo raro os artigos que comparam ambos. Baldini et al. (2020) realizaram um estudo de caso recente em amostras de pacientes de Luxemburgo e observou que o índice de Pielou⁵ foi reduzido em mulheres com a DP, mas aumentou no sexo masculino. Isso indica que há maior desigualdade na distribuição da população microbiana em mulheres com a DP (FINOTELLO; MASTRORILLI; DI CAMILLO, 2018). Ainda, o mesmo estudo encontrou redução do gênero *Paraprevotella* (*familia* Prevotellaceae) exclusivamente no sexo feminino.

Esses achados indicam a necessidade de estudos que investiguem o papel do sexo biológico na progressão dos sintomas não motores e motores da DP, podendo fornecer informações valiosas sobre a fisiopatologia da doença.

1.7 MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: FOCO NA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE MPTP

Grande parte do conhecimento adquirido nas últimas quatro décadas em relação a fisiopatologia da DP se deve à existência de modelos animais. Modelos experimentais da DP são amplamente utilizados para investigar os mecanismos envolvidos no processo neurodegenerativo, bem como para testar novas estratégias terapêuticas (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Os modelos clássicos incluem o uso de neurotoxinas, como o MPTP, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona e paraquat, que mimetizam a degeneração dopaminérgica em animais, reproduzindo alterações neuroquímicas e comportamentais similares às que são observadas em pacientes com a DP (GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015).

O MPTP foi descoberto acidentalmente em meados dos anos 1980 quando usuários de heroína subitamente apresentaram sintomas motores característicos da DP. Neste caso, os pacientes utilizaram um análogo da droga contaminado com o MPTP, e a exposição ocasionou sintomatologia quase indistinguível da DP idiopática (LANGSTON, 2017). Com essa

⁵ Representa a uniformidade de distribuição dos indivíduos entre as espécies.

descoberta, muitos pesquisadores começaram a estudar a toxina, e descobriram que o MPTP por si só não apresenta toxicidade, mas quando metabolizado nos astrócitos pela MAO-B produz a toxina ativa MPP+, que é então transportada para o interior dos neurônios dopaminérgicos através do DAT. O acúmulo de MPP+ nos neurônios dopaminérgicos resulta no bloqueio do complexo I mitocondrial e consequente geração de EROs, que em conjunto com oxidação excessiva de DA causa danos celulares, ativação de micróglia, inflamação e uma cascata de eventos que culminam na morte neuronal (PREDIGER et al., 2010; PREDIGER et al., 2011; SAMPAIO et al., 2017).

Existem diversos protocolos de administração dessa toxina, geralmente sistemicamente via intraperitoneal (ip) ou subcutânea (sc) e com administrações consecutivas. Um regime de administração agudo leva a uma perda de 40–50% dos neurônios do mesencéfalo e mais de 80% de DA estriatal, enquanto a distribuição por vários dias (uma ou duas injeções diárias) induz uma menor degeneração da SN (MEREDITH; RADEMACHER, 2011).

Considerando: (1) a prevalência de sintomas olfatórios durante a fase prodrômica da DP; (2) a exposição ambiental a xenobióticos como um fator de risco da doença, (3) as evidências de que o bulbo olfatório é uma das primeiras estruturas afetadas na DP; e (4) a hipótese de que a DP teria origem periférica, Prediger et al. (2006) desenvolveram o modelo de administração intranasal de MPTP em roedores. Este modelo induz a neurodegeneração inicialmente no bulbo olfatório, expandindo-se para outras estruturas e reproduzindo algumas características observadas nas fases iniciais da DP, como disfunção olfatória, comportamento tipo-depressivo, tipo-anedônico e prejuízos de memória e aprendizagem em ratos e camundongos (PREDIGER et al., 2010; PREDIGER et al., 2011; SAMPAIO et al., 2017).

Estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório indicaram que apenas camundongos fêmeas administrados com MPTP pela via intranasal (1 mg/narina) apresentam comportamentos tipo-anedônicos e tipo-depressivos, assim como uma depleção mais pronunciada de neurotrofinas no córtex pré-frontal e hipocampo. Ainda, mesmo após a ovariectomia dos animais, as diferenças observadas entre os sexos são mantidas (SCHAMNE et al., 2018). Nos modelos de administração sistêmica (ip ou sc) de MPTP, são escassos os estudos que avaliaram possíveis diferenças de sensibilidade quanto ao sexo. Ookubo et al. (2009) relataram que não há diferenças sexuais quanto aos déficits motores, enquanto no estudo de Antzoulatos et al. (2010) as fêmeas tratadas com MPTP apresentam maior prejuízo motor do que os machos. Além de reproduzir comportamentos motores, o modelo ip causa perda de

neurônios dopaminérgicos no SNE (ANDERSON et al., 2007) e altera a composição da microbiota em machos (XIE et al., 2020).

Um único artigo publicado em 2020 comparou a microbiota de fêmeas e machos no modelo do MPTP (ip) em primatas não humanos (JOERS et al., 2020). Os autores descreveram diferenças na diversidade tanto antes como após a administração de MPTP, com a abundância relativa de *Blautia* e *Prevotella* maior no sexo feminino.

2. JUSTIFICATIVA

O sexo representa um fator importante na epidemiologia da DP. Os seis primeiros pacientes com DP relatados por James Parkinson eram homens, os primeiros estudos clínicos mostrando a eficácia da L-DOPA foram realizados com o sexo masculino e a maior parte do que conhecemos sobre a fisiopatologia da DP é devido a estudos em modelos animais utilizando majoritariamente animais machos. De fato, existe uma prevalência maior da DP no sexo masculino, mas uma considerável parte da população feminina também é afetada pela doença. Dos 6,1 milhões de indivíduos diagnosticados até 2016, cerca de 2,9 milhões eram mulheres (47,5%) (RAY DORSEY et al., 2018).

Além de homens e mulheres experienciarem a DP de forma distinta, o sexo biológico tem influência nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na patogênese da doença, sendo de grande valor científico a comparação entre eles. Entretanto, os estudos na área são sub-representados tanto do ponto de vista clínico quanto nos estudos pré-clínicos. Até o momento, a interação do intestino-encéfalo-microbiota na DP se restringe ao estudo de comportamentos motores em modelos animais, os quais majoritariamente utilizam roedores machos (SAMPSON et al., 2016; SUN et al., 2018; JAGGAR et al., 2020; XIE et al., 2020).

Considerando a maior prevalência de sintomas como depressão e constipação em mulheres, o modelo da administração intranasal de MPTP, que reproduz sintomas não motores característicos da fase inicial da DP, pode auxiliar no entendimento de aspectos fisiopatológicos iniciais da doença, bem como investigar possíveis diferenças sexuais (PREDIGER et al., 2011; PERRIN et al., 2017; SCHAMNE et al., 2018; BALASH et al., 2019). Ainda, a associação desses sintomas com a disbiose intestinal em pacientes sem a DP vem mostrando o potencial da microbiota no comportamento e na resposta a doenças inflamatórias.

Diante do exposto, hipotetizamos que as diferenças sexuais estão relacionadas à maior susceptibilidade de camundongos fêmeas aos efeitos comportamentais, neuroquímicos e intestinais da administração intranasal do MPTP.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo principal investigar a influência do sexo biológico nas alterações comportamentais, neuroquímicas e intestinais induzidas pela administração intranasal de MPTP, utilizado como modelo animal para o estudo dos sintomas não motores da DP.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar os comportamentos não motores associados à DP em camundongos machos e fêmeas após a administração intranasal de uma dose baixa de MPTP (0,5 mg/narina);
- b) Verificar a influência da administração intranasal de MPTP (0,5 mg/narina) sobre a abundância dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Eubacteria e das unidades formadoras de colônias no conteúdo fecal de camundongos machos e fêmeas.
- c) Avaliar a morfologia duodenal e a resposta à ACh e DA em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas tratados com MPTP pela via intranasal (0,5 mg/narina).
- d) Avaliar as concentrações de DA, DOPAC, 5-HT e 5HIAA no estriado, hipocampo e duodeno de camundongos machos e fêmeas tratados com MPTP pela via intranasal (0,5 mg/narina).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 64 camundongos (32 machos e 32 fêmeas) isogênicos da linhagem C57bl/6 com 3 a 4 meses e peso médio de 20-40 g, provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental (Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC). Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério setorial do Departamento de Bioquímica, em gabinetes à temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ com água e comida *ad libidum*, em um ciclo claro/escuro 12:12 h. As caixas, grades, maravalha, bebedouros e água disponibilizados para os animais foram autoclavados, reduzindo o risco contaminação. Os experimentos foram realizados durante o ciclo claro (entre 8:00 e 16:00 h). Após o término do protocolo comportamental, todos os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia através de decapitação ou perfusão transcardíaca. Os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.), 2011), com as normas do CONCEA e CEUA UFSC (protocolo nº 5097220420).

4.2. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

4.2.1. Administração intranasal de MPTP

A administração intranasal de MPTP (*Sigma Chemical Co.*) foi realizada de acordo com o procedimentos padronizados em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2010; PREDIGER et al., 2011; SCHAMNE et al., 2018). O MPTP foi diluído em uma solução NaCl 0,9% (salina) estéril na concentração de 100 mg/mL e a dose utilizada em todos os protocolos foi de 0,5 mg/narina (ROVERSI, 2019). Os animais foram anestesiados com isoflurano 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil) e em seguida foi inserido cerca de 7 mm de um tubo de polietileno (PE-10) na narina dos animais. O fluxo de administração (10 uL/min durante 30 segundos por narina) foi controlado através de uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Os animais do grupo controle receberam uma única administração intranasal de salina, utilizando o mesmo protocolo descrito. Os animais receberam a primeira administração na narina direita e após um intervalo de cinco minutos de recuperação da função respiratória, o procedimento foi repetido na narina esquerda.

4.2.2. Testes comportamentais

4.2.2.1. Discriminação olfatória (DO)

O teste de discriminação olfatória foi realizado durante 5 minutos, no qual cada animal foi colocado individualmente em um aparato dividido em duas áreas: o compartimento familiar, forrado com a serragem proveniente da caixa destes animais; e um compartimento não familiar, forrado com serragem nova. Os animais que discriminam os dois compartimentos geralmente permanecem mais tempo no compartimento familiar que contém o seu próprio odor. Para assegurar a impregnação do odor familiar, a serragem dos animais não foi trocada nas 72 horas precedentes ao experimento. Durante o teste, foi contabilizado o tempo que o animal permaneceu em cada compartimento e o número de cruzamentos entre eles (PREDIGER et al., 2010).

4.2.2.2. Teste para avaliação da motilidade fecal (TMF)

Os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 4 horas na manhã do teste, com livre acesso à água. Ao fim do jejum, todos os animais tiveram acesso à ração por 2 horas precedentes ao teste. Em seguida, cada animal foi colocado individualmente em uma caixa idêntica à caixa de moradia, autoclavada, sem maravalha e com acesso a ração e água por 1 hora, na qual os bolos fecais foram contados, coletados e pesados (MARKS et al., 2013; GE et al., 2017). Foram avaliados a média de peso por bolo fecal e a quantidade de bolos fecais excretados por hora (XIE et al., 2020).

4.2.2.3. Teste de preferência por sacarose (TPS)

O TPS foi utilizado como um dos parâmetros para avaliar o comportamento tipohedônico. Os animais foram isolados em caixas de moradia com livre acesso a ração e água. No primeiro dia de experimento, os animais tiveram acesso a duas garrafas com água, para adaptação e treino. Após 24 h, uma das garrafas foi substituída por outra contendo uma solução de sacarose a 2% para habituação à sacarose e 24 h após, a posição das garrafas foi invertida. A variação do peso das garrafas foi calculada para obtenção do consumo dos animais. Por sua vez, a preferência à sacarose foi calculada através da razão entre o consumo da solução de sacarose e o consumo total de líquidos (SCHAMNE et al., 2018).

4.2.2.4. Teste da borrifagem de sacarose (TBS)

O TBS também é utilizado para avaliar um comportamento tipo-hedônico dos animais, após o esguicho de uma solução de sacarose (10%) no dorso dos animais. A viscosidade da sacarose desencadeia a autolimpeza dos animais, representando um comportamento de autocuidado. Desta forma, o TBS avalia um índice motivacional que está relacionado à alguns sintomas de depressão, como a anedonia (WILLNER, 2005; NEIS et al., 2016). Seguiu-se o protocolo descrito por Schamne et al. (2018), na qual a solução de sacarose (10%) foi borrifada no dorso de cada animal individualmente em um cilindro transparente, sendo registrados durante 5 minutos o tempo total de autolimpeza e a latência para iniciar este comportamento.

4.2.2.5. Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O TSC baseia-se na observação de que após movimentos iniciais de agitação, os animais desenvolvem uma postura imóvel quando colocados em uma situação estressante e inevitável. Neste caso, a situação envolve o estresse hemodinâmico do animal ser pendurado pela cauda de forma inescapável (STERU et al., 1985). Os animais foram suspensos 50 cm de altura, presos pela cauda com uma fita adesiva. Os camundongos foram considerados imóveis quando permaneciam completamente parados, sendo este parâmetro registrado durante um período de 6 minutos (CASTAGNÉ et al., 2011).

4.2.2.6. Teste do ninho

A construção de ninhos é um comportamento inato em roedores machos e fêmeas, que envolve processos de atenção do córtex pré-frontal e hipocampo (FILALI; LALONDE, 2009). É importante não somente para reprodução, mas também para construção de um abrigo contra predadores e conservação do calor (DEACON, 2006). Alguns autores utilizam esse teste para avaliar o bem estar animal, assim como um comportamento hedônico em modelos de transtornos neuropsiquiátricos (FILALI; LALONDE, 2009; JIRKOF, 2014; OTABI; OKAYAMA; TOYODA, 2020). Seguindo a metodologia de Deacon (2006), os animais foram separados individualmente e transferidos para uma caixa contendo maravalha e cerca de 5 g de quadrados de algodão 1 hora antes do início da fase escura. Na manhã seguinte, os ninhos foram avaliados conforme escores do Quadro 1.

Quadro 1. Escores utilizados no teste do ninho

Escore	Definição
1	Mais de 90% do ninho intacto.
2	Tecido parcialmente rasgado (50 a 90% intacto).
3	Maior parte do tecido rasgado (<50% intacto), porém o algodão não está recolhido e com um ninho identificável.
4	Um ninho plano é identificado (<10% intacto) e até 50% das paredes do ninho são maiores que o camundongo.
5	Um ninho perfeito: mais de 90% estão rasgados, formando uma cratera com mais de 50% das paredes ultrapassando a altura do camundongo.

Fonte: DEACON, 2006.

4.2.2.7. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do LCE foi utilizado para avaliar respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade, seguindo protocolo descrito por PELLOW et al. (1985). O aparato consiste em um labirinto com 4 braços: dois braços abertos (30 x 5 cm) que ficam opostos a dois braços fechados (cercados por paredes) (30 x 5 x 12 cm); elevados à 40 cm do chão. Os animais foram colocados no labirinto em uma região central que fica na intersecção dos quatro braços. O teste foi realizado durante 5 minutos numa sala com baixa luminosidade vermelha (12 lux), sendo registrados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados (WALF; FRYE, 2007).

4.2.2.8. Teste do nado forçado (TNF)

Com base no protocolo descrito originalmente por PORSOLT et al. (1978), o teste foi aplicado em camundongos separadamente, forçados a nadar em um espaço restrito do qual não podem escapar. Após serem expostos a esta situação aversiva, os animais passam por um período de agitação (nadam e escalam as paredes do aparato) seguido por uma postura de imobilidade, sendo este considerado um comportamento do tipo-depressivo (SCHAMNE et al., 2018).

O teste foi realizado em um cilindro de vidro com 24 cm de altura, 10 cm de diâmetro e com um nível de 19 cm de água a 25°C, e o tempo de imobilidade cronometrado e registrado em sessões de 6 minutos. Considera-se imóvel o animal que flutua ou faz apenas os movimentos necessários para que sua cabeça se mantenha acima da água; enquanto na ausência de

imobilidade ocorrem comportamentos orientados para a fuga, como nadar, saltar, escalar ou mergulhar (ECKELI; DACH; RODRIGUES, 2000; ZOMKOWSKI et al., 2004).

4.2.2.9. *Teste do campo aberto (TCA)*

O teste consistiu em colocar cada animal no centro de um aparato quadrado (40 x 40 x 40), durante 5 minutos e observar a sua atividade locomotora e exploratória. Como os animais têm uma tendência de evitar espaços abertos e iluminados, o centro do aparato é considerado uma zona mais aversiva, sendo comum a maior parte da exploração na zona periférica (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). Para avaliar a atividade locomotora dos animais e um comportamento ansiogênico, a distância total percorrida, a distância e o tempo na área central do aparato foram avaliados pelo software *AnyMaze*®.

4.2.3. **Contagem de colônias bacterianas**

As amostras fecais dos camundongos foram coletadas dois dias antes do início do protocolo experimental e no dia 14 após a administração intranasal do MPTP e armazenadas em microtúbulos estéreis e pré-pesados. Imediatamente após a coleta, os tubos com os bolos fecais foram pesados e mantidos em gelo. Em seguida, foram suspensos em solução salina estéril (100 mg/mL), centrifugados a 3000 RPM por 1 minuto a 4 °C e o sobrenadante foi diluído em razão de 10. A solução fecal foi semeada em ágar Muller Hinton (MH) e posteriormente incubadas a 37 °C por 48 h. As colônias foram quantificadas e expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes.

4.2.4. **Extração de DNA total das amostras fecais**

As amostras fecais foram coletadas dois dias antes do início do protocolo experimental e no dia 14 após a administração intranasal do MPTP e congeladas a -80 °C até o momento da extração. A extração de DNA total foi realizada com o kit FastDNA® Spin (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. O DNA foi quantificado através de fluorimetria com o Qubit® (Thermo Fisher Scientific) utilizando o Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific). A leitura das curvas foi realizada para estabelecer a concentração de DNA contido em cada amostra, que foram armazenadas em -20 °C.

4.2.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)

A qPCR foi realizada em uma reação de 10 μL por amostra contendo 5 μL de SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific), 0,8 μL de iniciador *forward* (10 μM), 0,8 μL de iniciador *reverse* (10 μM), 1 μL com 1 ng de amostra de DNA e 2,4 μL de água ultrapura. Os parâmetros utilizados para a reação foram: 1 ciclo a 50 °C por 1 minutos; 1 ciclo a 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, seguido por anelamento a 60 °C por 120 segundos. Os iniciadores utilizados na quantificação estão descritos no Quadro 2.

O qPCR foi realizado no sistema 7900HT *Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems). Foram utilizados iniciadores com sequências padronizadas para identificar bactérias totais na amostra, além de 3 filos de bactérias: Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria. Os ensaios quantitativos do PCR em tempo real foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Fierer et al. (2005).

Quadro 2. Descrição dos iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR.

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Tamanho do produto (pb)	Referência
Eubacteria	Eub338	Eub518	200	(GUO et al., 2008)
Firmicutes	Firm934	Firm1060	126	(GUO et al., 2008)
Bacteroidetes	Bact934	Bact1060	126	(GUO et al., 2008)
Actinobacteria	Actino235	Eub518	300	(FIERER et al., 2005)

Fonte: Fonte: Elaborado pela Autora (2021).

Para a quantificação absoluta das amostras foram produzidas curvas de padrões para o domínio Eubacteria e cada filo alvo a partir do DNA previamente amplificado de amostras fecais de camundongos. Uma qPCR preliminar foi realizada com o material coletado e com os iniciadores específicos para cada alvo, as amostras que apresentaram curva de dissociação com pico único e bem delineado foram selecionadas e um pool amostral foi preparado. Foi realizada uma diluição inicial das amostras para uma concentração final de 1 ng/ μL . A diluição seriada para a geração da curva padrão se deu a partir da diluição inicial a 1 ng/ μL , a qual foi novamente

diluída nas razões 1:25, 1:250, 1:2500, 1:25000, 1:250000, 1:2500000, 1:25000000, 1:250000000. A concentração de DNA obtida foi, então, transformada da unidade ng/ μ L para a unidade g/ μ L. O cálculo do número de mol presente em cada diluição foi realizado conforme demonstrado na equação 1.

$$(1) n \text{ de mol} = \frac{\text{massa (g)}}{MM}$$

Onde: *n de mol* refere-se ao número de mol da amostra;
massa refere-se à massa em gramas de DNA na amostra;
MM refere-se à massa molecular da amostra.

A massa molecular (MM) aproximada foi calculada com base na equação 2.

$$(2) MM = (pb \times 607,4) + 157,9$$

Onde: *MM* refere-se à massa molecular;
pb refere-se ao tamanho do fragmento de DNA amplificado em pares de base;
a multiplicação por 607,4 refere-se ao cálculo aproximado da massa molecular dos nucleotídeos presentes no fragmento amplificado;
a adição por 157,9 refere-se a massa molecular de um 5' trifosfato.

Com o valor do número de mol de cada amostra da diluição foi possível calcular o número de moléculas como demonstra a equação 3.

$$(3) n \text{ de moléculas} = 6,023 \times 10^{23} \times n \text{ de mol}$$

Onde: *n de moléculas* refere-se ao número total de moléculas de DNA presentes na amostra;
 $6,023 \times 10^{23}$ refere-se à constante de Avogadro;
n de mol refere-se ao número de mol da amostra.

Cada curva padrão domínio-específica e filo-específica foi aplicada em todas as reações de qPCR relacionadas ao domínio ou ao filo alvo a fim de permitir a criação de um gráfico de dispersão entre os ciclos C_t (*Cycle threshold*) detectados nas diluições e seus correspondentes números de moléculas, gerando uma linha de tendência logarítmica com sua

correspondente equação da reta. A equação da reta gerada permitiu atribuir os números de moléculas existentes em cada amostra a partir da informação do C_t delas.

4.2.6. Eutanásia

Após a realização dos protocolos comportamentais, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina e eutanasiados por decapitação, ou perfundidos transcardialmente com cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) seguido por paraformaldeído a 4% (PFA). O encéfalo e segmentos de intestino delgado foram rapidamente dissecados e fixados em PFA (n=6) para posterior avaliação histológica. As estruturas coletadas dos animais eutanasiados por decapitação foram congeladas a -80°C e os segmentos de íleo foram isolados em solução de Krebs–Henseleit para análise *in vitro*.

4.2.7. Avaliação morfológica do duodeno

Imediatamente após a perfusão, os tecidos foram fixados em PFA (pH 7,2) por 48 horas. Em seguida, o material foi desidratado com banhos crescentes de álcool (70%, 80% e 100%); diafanizados em xilol, incluídos e emblocados em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo (Leica® RM2255) e distendidos em banho-maria (37°C) para serem colocados sobre lâminas de vidro. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE). Cada lâmina recebeu 3 cortes diferentes do mesmo tecido e a análise foi realizada selecionando 3 regiões aleatórias em cada um dos cortes. Todas as lâminas foram digitalizadas utilizando o equipamento Axio Scan (ZEISS®) e analisadas de maneira cega no software Zen ZEISS®. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a altura e largura das vilosidades, além do número de vilosidades por milímetro em todas as regiões. O valor atribuído para cada lâmina corresponde à média de regiões (3) e de cortes (3), totalizando 9 regiões analisadas por animal.

4.2.8. Avaliação da função contrátil do íleo isolado

Após a eutanásia, dois segmentos de íleo distal de cada animal foram coletados e inseridos em sistema de banho de órgãos acoplados a transdutores de força (modelo MLT0201) e amplificador (modelo ML228); conectado a um polígrafo computadorizado (PowerLab8/30®, modelo ML870) com software de integração e registro (LabChart® Pro v. 7.3.3, ambos da AD

Instruments, Austrália). Todas as preparações foram submetidas a uma tensão inicial de 0,5 g, seguidas de um período de estabilização de 30 minutos, com troca de solução a cada 15 minutos. Após esse período de equilíbrio, os segmentos foram submetidos a uma solução contendo 120 mM de KCl, seguido de lavagem das preparações por três vezes, novo intervalo de estabilização de 15 minutos e da adição de acetilcolina na concentração de 30 μ M por 5 minutos. Foi realizada a média dos dados coletados dos dois segmentos de íleo (n=6).

Após 1 hora de estabilização, os segmentos de íleo foram aleatoriamente divididos para avaliar a resposta à ACh ou à DA separadamente, tentando evitar interferências na mesma preparação. As preparações de um dos segmentos foram expostas a concentrações não cumulativas de ACh (10 nM a 300 μ M), até obtenção da resposta máxima. Após 1 hora de estabilização, as preparações foram novamente expostas às mesmas concentrações de ACh de forma cumulativa, ou seja, sem lavagens entre as concentrações.

As preparações restantes foram novamente expostas a 30 μ M de ACh para contração do tecido e em seguida às concentrações cumulativas de DA (1 nM a 300 μ M), a fim de avaliar a porcentagem de relaxamento frente à DA. Após 1 hora de estabilização, as mesmas preparações foram expostas a concentrações cumulativas de DA (1 nM a 300 μ M). Os dados foram expressos por força ou frequência de contração e porcentagem de relaxamento.

4.2.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Após a eutanásia, o hipocampo, o estriado e o duodeno foram dissecados e armazenados em freezer -80°C. Os níveis teciduais de DA, 5-HT e seus metabólitos foram determinados por um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Waters, Milford, EUA; modelo Alliance e2695), acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, EUA).

Para a extração, as estruturas foram homogeneizadas em uma solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina (DHBA), como padrão interno. Após, as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom de 40 kHz por 20 min seguidas de centrifugação a 16.000 RPM durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante (20 μ L) de cada amostra foi analisado em uma coluna C18 (150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com 19 partículas de 4 μ m de diâmetro). As amostras foram carregadas pela fase móvel composta por 90 mM de fosfato de sódio dibásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,7 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 2 mM de

cloreto de sódio, 50 μ M de EDTA dissódico, 10% de acetonitrila e água ultrapura (Milli-Q, Millipore), pH = 3,0, filtrada através de uma membrana de acetato de celulose (0,45 μ M, Millipore) e degaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos. O programa computacional Empower 2 [®] (Waters Co.) foi utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados, os quais foram mensurados de acordo com as curvas de calibração de cada analito (10 – 1000 ng/ml) e expressos em ng de analito por mg de proteínas. O conteúdo proteico das amostras foi mensurado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros avaliados passaram por análise de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi realizado o teste de Grubbs para remoção de possíveis *outliers*. Os resultados com duas variáveis independentes (sexo e administração de MPTP) foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias. Foi realizado o teste *t* contra o valor teórico de 50% nos testes DO e TPS. Foi realizado ANOVA com medidas repetidas no TMF e na contagem de colônias bacterianas. Os dados obtidos do experimento de avaliação contrátil do íleo isolado foram analisados com uma ANOVA de três vias (variáveis independentes: concentração, sexo e administração de MPTP). Quando ANOVAs indicavam diferenças significativas, a análise foi seguida pelo teste post-hoc de múltiplas comparações de Newman-Keuls. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$. Os escores obtidos no teste do ninho, assim como os resultados que não passaram no teste de normalidade foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

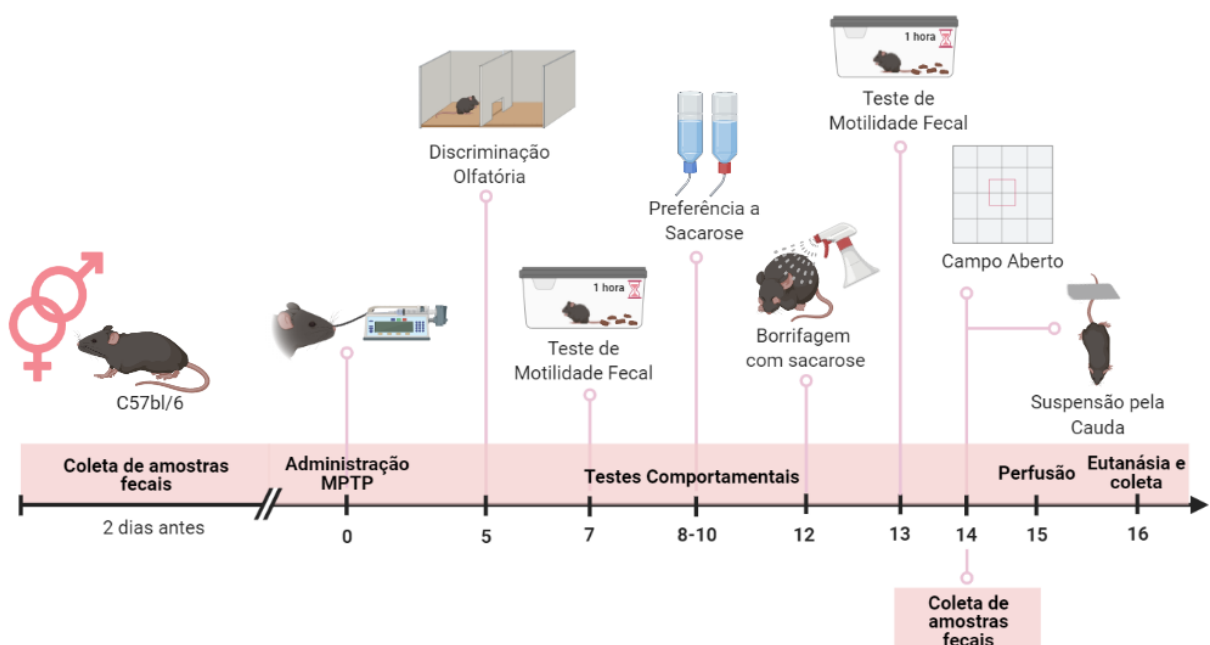
4.2.1. Primeiro bloco experimental

Este primeiro bloco de experimentos consistiu em caracterizar e padronizar as alterações comportamentais, neuroquímicas e no trato gastrointestinal no modelo do MPTP intranasal utilizando uma dose baixa (0,5 mg/narina). Esta dose foi selecionada por apresentar níveis reduzidos de letalidade, além de permitir a avaliação de possíveis diferenças de sensibilidade entre camundongo machos e fêmeas à toxicidade induzida pela administração intranasal do

MPTP. Para isso, os animais foram divididos em 4 grupos (n=8): Veículo Fêmeas, Veículo Machos, MPTP Fêmeas e MPTP Machos, totalizando 32 animais. Após a administração intranasal de MPTP foram realizados os seguintes testes: teste de discriminação olfatória (dia 5), teste para avaliação da motilidade fecal (dias 7 e 13), teste de preferência por sacarose (dias 8-10), teste da borrifagem de sacarose (dia 12), teste do campo aberto e teste da suspensão pela cauda (dia 14), como ilustrado na Figura 6. Dois dias anteriores e 14 dias após a administração intranasal de MPTP, as amostras fecais dos animais foram coletadas para realização da técnica de qPCR e para contagem de colônias bacterianas.

No dia seguinte ao último teste comportamental, alguns animais de cada grupo (n=6/grupo) foram randomicamente selecionados e perfundidos transcardiacamente com solução salina seguida de solução de PFA. O encéfalo foi coletado para a realização da técnica de imuno-histoquímica (dados não finalizados), enquanto o duodeno foi corado em HE. O restante dos animais (n=2/grupo) foram anestesiados com cetamina e xilazina e em seguida decapitados para a dissecação do bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e duodeno, armazenados no -80°C , além da dissecação do íleo para os experimentos com o órgão isolado, no dia 16.

Figura 5. Ilustração da linha temporal referente ao primeiro bloco experimental.



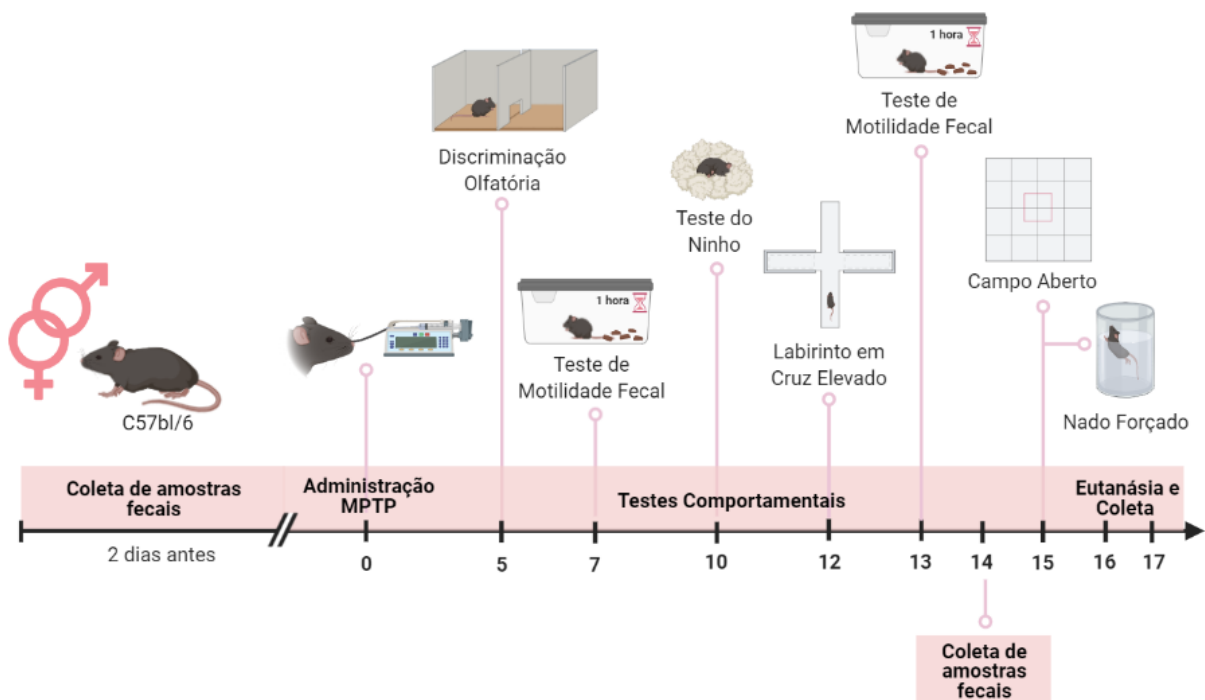
Legenda: Administração intranasal de MPTP foi realizada no dia 0, em camundongos machos e fêmeas da linhagem C57bl/6. Dois dias antes, foi realizada a coleta de amostras fecais destes animais. Foi realizado o teste

de discriminação olfatória (dia 5), teste para avaliação da motilidade fecal (dias 7 e 13), teste de preferência por sacarose (dias 8-10), teste da borrifagem de sacarose (dia 12), teste do campo aberto e teste da suspensão pela cauda (dia 14). Após os testes comportamentais, foi realizada nova coleta de amostras fecais dos mesmos animais. No dia 15 foi realizada a perfusão e no dia 16 os animais foram eutanasiados para a coleta das estruturas e órgãos. Fonte: Elaborado pela Autora com BioRender.com (2021).

4.2.2. Segundo bloco experimental

Na segunda bateria foram realizados os seguintes testes: teste de discriminação olfatória (dia 5), teste para avaliação da motilidade fecal (dia 7 e 13), teste do ninho (dia 10), teste do labirinto em cruz elevado (dia 12), teste do campo aberto e teste do nado forçado (dia 15), como demonstrado na Figura 7. Dois dias anteriores à administração e 14 dias após a administração intranasal de MPTP as amostras fecais dos animais foram coletadas para análise por qPCR e para contagem de colônias bacterianas.

Figura 6. Ilustração da linha temporal referente ao segundo bloco experimental.

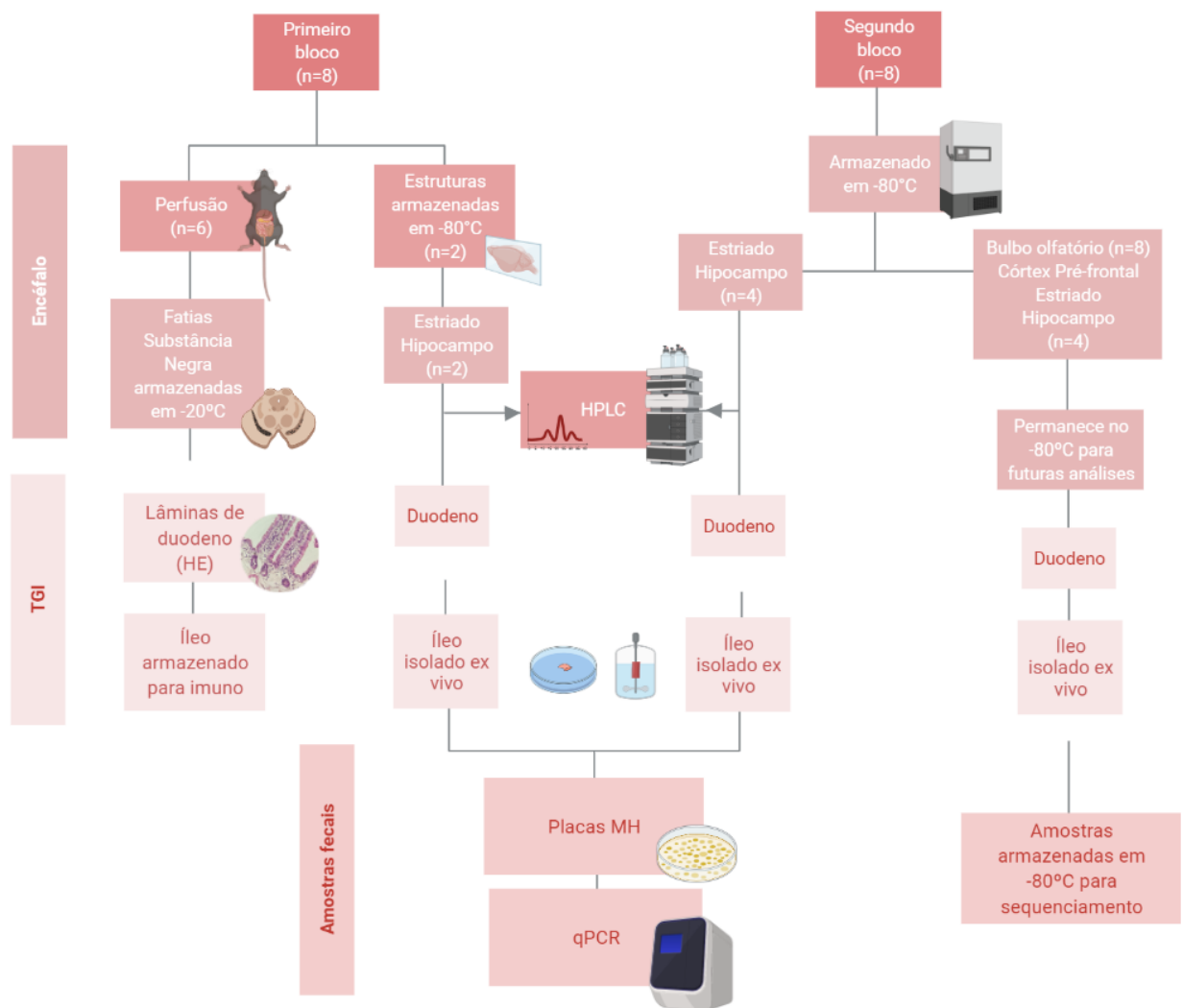


Legenda: Administração intranasal de MPTP foi realizada no dia 0, em camundongos machos e fêmeas da linhagem C57bl/6. Dois dias antes, foi realizada a coleta de amostras fecais destes animais. Foi realizado o teste de discriminação olfatória (dia 5), teste para avaliação da motilidade fecal (dias 7 e 13), teste do ninho (dia 10), teste do labirinto em cruz elevado (dia 12), teste do campo aberto e teste da suspensão pela cauda (dia 15). No dia 14, assim como no primeiro protocolo, foi realizada nova coleta de amostras fecais dos animais. No dia 16 foi os

animais foram eutanasiados para a coleta das estruturas e órgãos. Fonte: Elaborado pela Autora com BioRender.com (2021).

Nos dias 16 e 17 após a administração intranasal de MPTP, os animais (n=8/grupo) foram anestesiados com cetamina e xilazina e em seguida decapitados para a dissecação do bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e duodeno, sendo estas amostras armazenadas no freezer -80 °C, além da dissecação do íleo para a realização dos experimentos com o órgão isolado (n=8/grupo). As amostras coletadas nos dois blocos foram utilizadas para as análises, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7. Ilustração das coletas, divisão das amostras e análises realizadas



Fonte: Elaborado pela Autora com BioRender.com (2021).

5 RESULTADOS

5.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

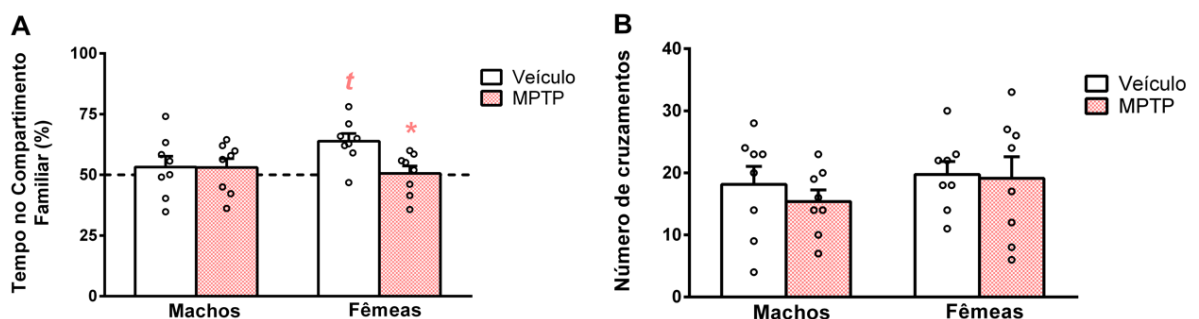
5.1.1 Primeiro Bloco Experimental

5.1.1.1. Discriminação Olfatória

A Figura 9 apresenta os efeitos da administração intranasal de MPTP sobre a habilidade de discriminação entre o compartimento familiar (serragem proveniente da caixa de moradia dos animais) e o compartimento não familiar (serragem nova e autoclavada). O teste *t* de Student contra o valor teórico de 50% indicou que apenas as fêmeas tratadas com veículo apresentaram preferência pelo compartimento familiar, sendo o único grupo capaz de discriminar os dois compartimentos ($t=4,325$; $df=7$; $p=0,0035$). A ANOVA de duas vias indicou efeitos significantes do fator tratamento [$F(1,28) = 5,2490$; $p=0,0296$] e da interação entre os fatores sexo e tratamento [$F(1,28) = 5,0136$; $p=0,0332$]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls revelou que a administração intranasal de MPTP em fêmeas diminuiu o tempo de permanência no compartimento familiar em comparação ao grupo veículo do mesmo sexo, indicando um prejuízo na habilidade olfatória desses camundongos.

Referente a locomoção dos animais durante o teste, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significantes para nenhum dos fatores em relação ao número de cruzamentos entre os compartimentos (Figura 9B).

Figura 8. Avaliação da habilidade de discriminação olfatória em camundongos machos e fêmeas realizada 5 dias após a administração intranasal de MPTP



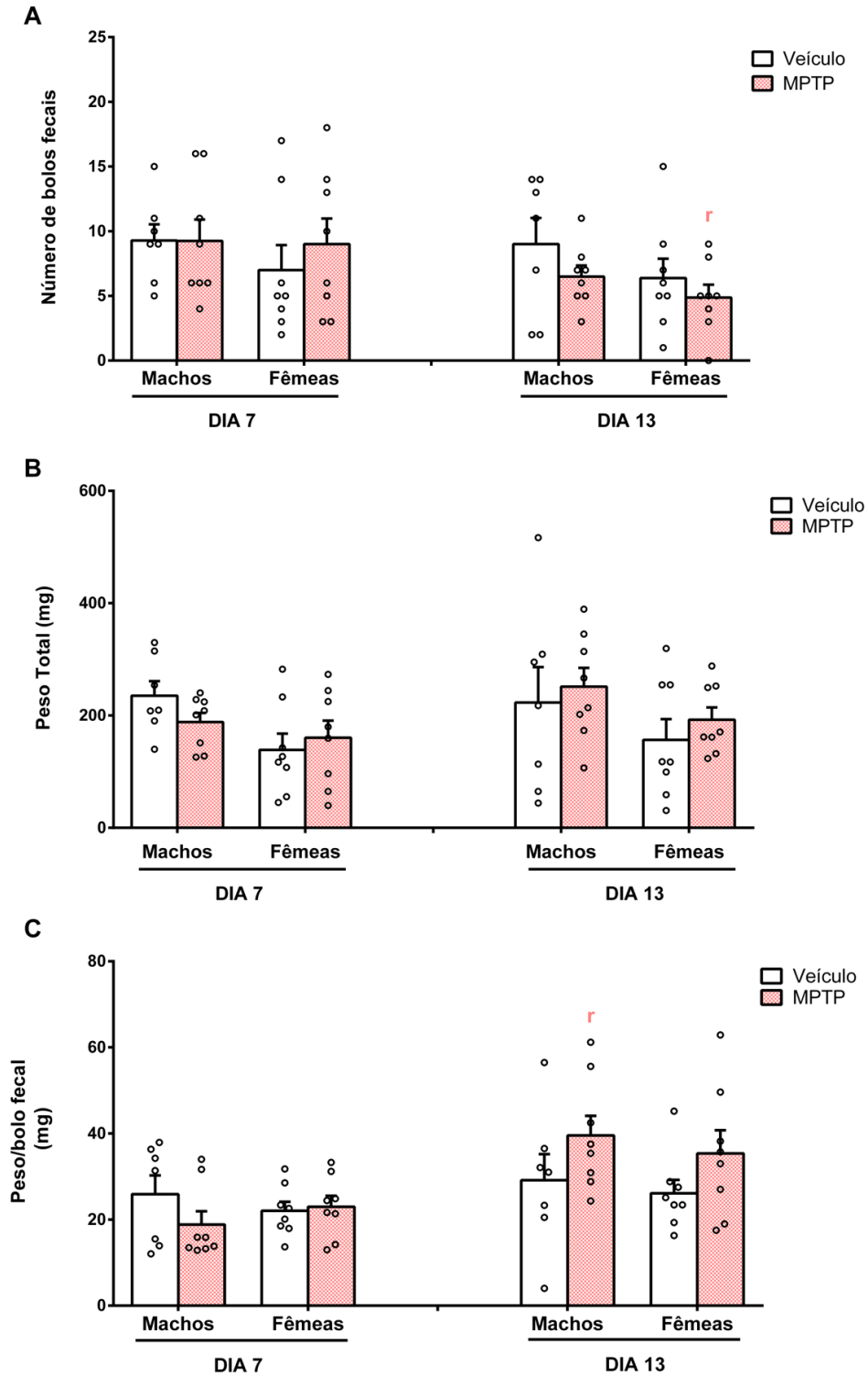
Legenda: Tempo de permanência no compartimento familiar em relação ao tempo total de teste (A). Número total de cruzamentos entre os compartimentos familiar e não familiar (B). As barras representam a média \pm erro padrão

da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=8). $t_p < 0,05$ vs valor teórico de 50%, segundo teste *t* de Student; $*p < 0,05$ vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.1.1.2. Teste para avaliação da motilidade fecal

A ANOVA com medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento no número de bolos fecais [$F(1,27)=8,2804$; $p=0,0077$] e na razão peso por bolo fecal [$F(1,27)=13,0309$; $p=0,0012$]. Adicionalmente, foi observado um efeito significativo da interação entre os fatores tratamento*repetição no número de bolos fecais [$F(1,27)=4,8593$; $p=0,0362$] e na razão peso por bolo fecal [$F(1,27)=5,3115$; $p=0,0291$]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls indicou que o tratamento intranasal com MPTP reduziu significativamente o número de bolos fecais nas fêmeas no dia 13 em comparação ao dia 7 (Figura 9A). Por outro lado, nos machos o tratamento intranasal com MPTP aumentou significativamente o peso por bolo fecal no dia 13 em comparação ao dia 7 (Figura 9C).

Figura 9. Avaliação da motilidade fecal em camundongos machos e fêmeas 7 e 13 dias após a administração intranasal de MPTP



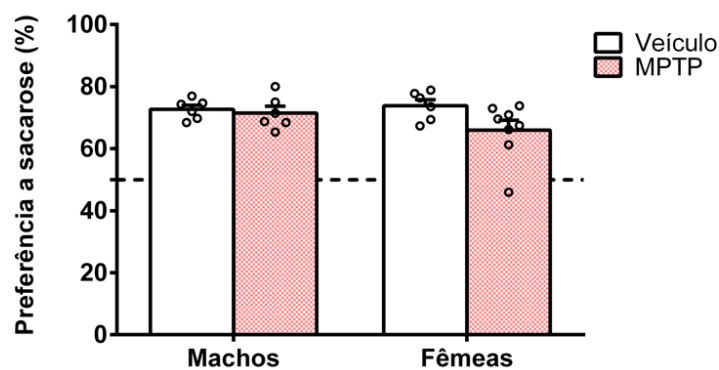
Legenda: Número de bolos fecais coletados após o término do teste (A). Peso total das amostras coletadas (B). Razão entre peso e bolo fecal (C). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam

cada animal individualmente (n=7-8). $rp < 0,05$ vs dia 7, segundo ANOVA de medidas repetidas seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

5.1.1.3. Teste de preferência por sacarose

O teste *t* de Student contra o valor teórico de 50% indicou que todos os grupos apresentaram preferência pela sacarose. A ANOVA de duas vias revelou que a administração intranasal de MPTP não interfere na preferência à sacarose em camundongos machos [$F(1,22) = 3,300$; $p=0,0829$] ou fêmeas [$F(1,22) = 0,745$; $p=0,3974$], indicando que todos os grupos apresentam preferência pelo consumo de sacarose após 10 dias da administração intranasal de MPTP (0,5 mg por narina) (Figura 10).

Figura 10. Avaliação do comportamento tipo-hedônico em camundongos machos e fêmeas realizada 10 dias após a administração intranasal de MPTP no teste de preferência por sacarose

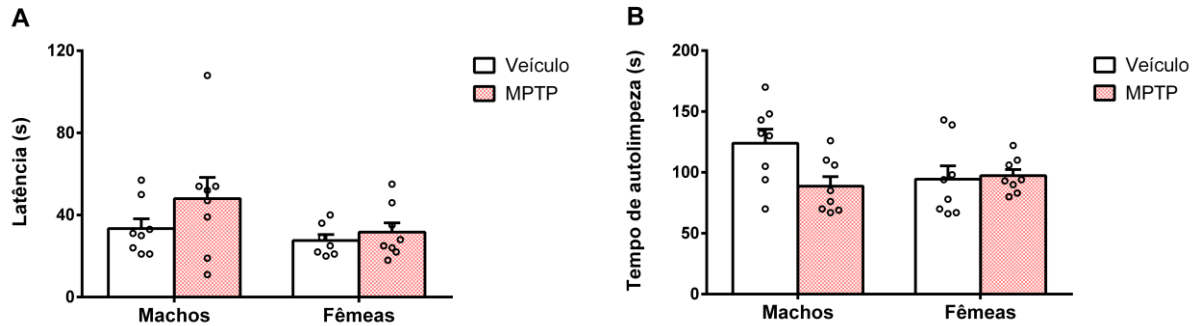


Legenda: Percentual de consumo da sacarose em relação ao total de líquidos consumidos. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=6-8).

5.1.1.4. Teste da borrarifagem com sacarose

A ANOVA de duas vias não indicou diferenças significantes no fator tratamento [$F(1,28) = 0,3619$; $p=0,5522$] ou no fator sexo [$F(1,28) = 0,6827$; $p=0,4156$] na latência para iniciar o comportamento de autolimpeza (Figura 11A). Em relação ao tempo total de autolimpeza, a ANOVA indicou um efeito significativo para a interação entre os fatores tratamento*sexo [$F(1,28) = 4,2947$; $p=0,0475$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou uma tendência ($p=0,052$) de redução no tempo de autolimpeza nos machos tratados com MPTP, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 11B).

Figura 11. Avaliação do comportamento tipo-hedônico em camundongos machos e fêmeas realizada 12 dias após a administração intranasal de MPTP no teste da borrifagem com sacarose

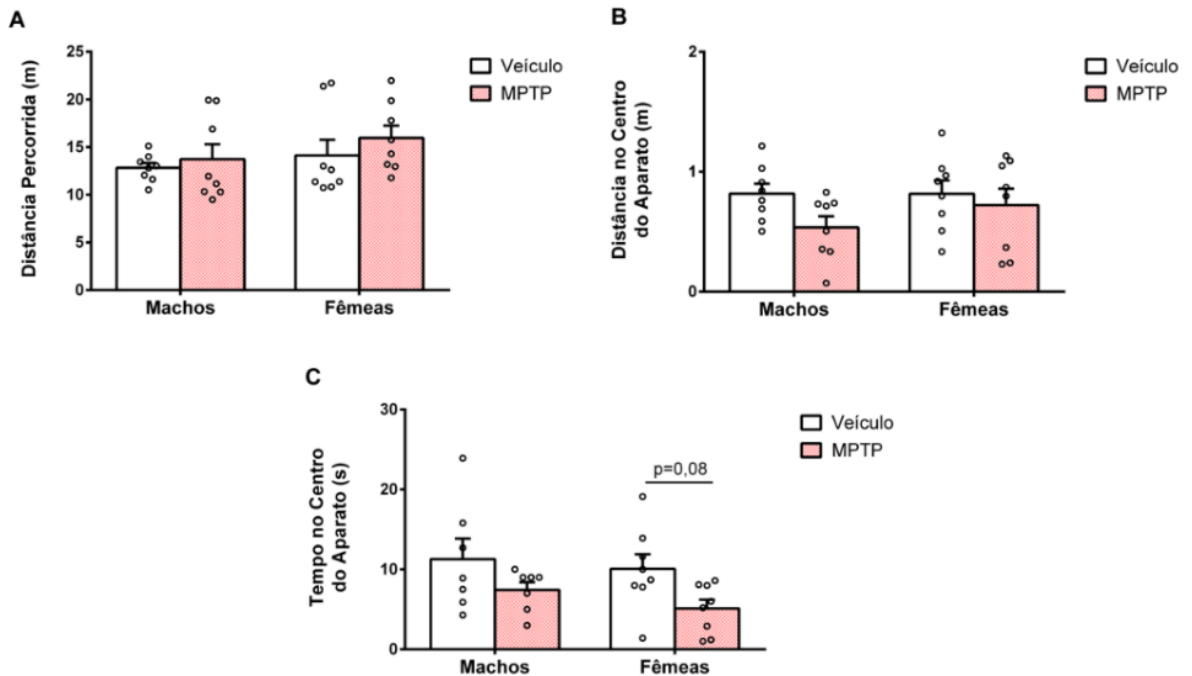


Legenda: Tempo de latência para iniciar o comportamento de autolimpeza (A). Tempo total do comportamento de autolimpeza (B). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=7-8).

5.1.1.5. Teste do campo aberto

A ANOVA de duas vias não demonstrou alterações significativas na distância total percorrida (Figura 13A). Com relação ao tempo de permanência no centro do aparato, utilizado como um parâmetro de emocionalidade do teste, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator tratamento [$F(1,26) = 7,9018$; $p=0,0092$]. Entretanto, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais neste parâmetro (Figura 13C).

Figura 12. Avaliação de parâmetros locomotores e de emocionalidade em camundongos machos e fêmeas realizada 14 dias após a administração intranasal de MPTP no teste do campo aberto

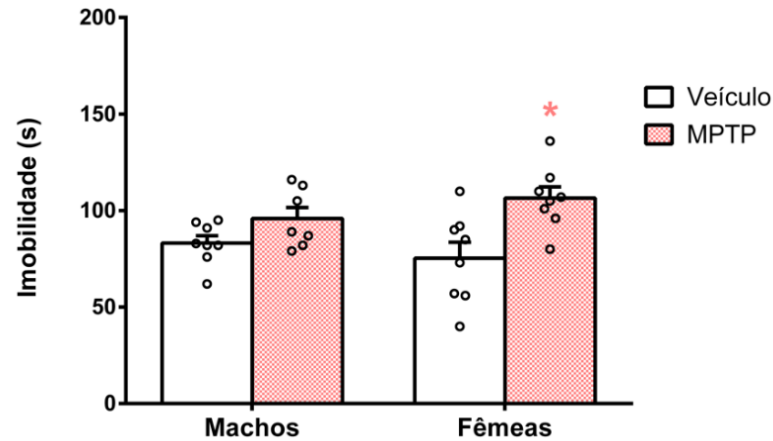


Legenda: Distância total percorrida no aparato (A). Distância total percorrida no centro do aparato (B). Tempo de permanência na área central do aparato (C). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=7-8). $P=0,08$ vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.1.1.6. Teste da suspensão pela cauda

A Figura 13 ilustra o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator tratamento neste parâmetro [$F(1,27)=11,2870$; $p=0,0023$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que a administração intranasal de MPTP promoveu um aumento significativo no tempo de imobilidade somente nas fêmeas, indicando que estas são mais susceptíveis a apresentarem comportamento do tipo-depressivo após o tratamento com MPTP (Figura 13).

Figura 13. Avaliação do comportamento tipo-depressivo em camundongos machos e fêmeas realizada 14 dias após a administração intranasal de MPTP no teste da suspensão pela cauda



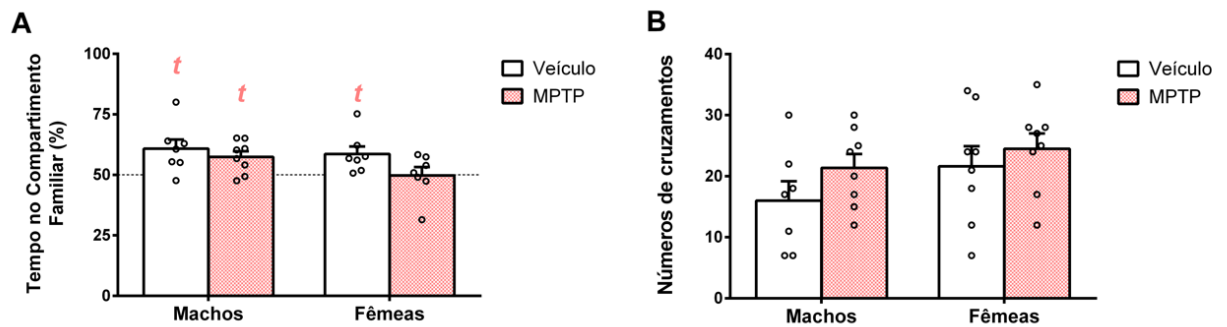
Legenda: Tempo total de imobilidade durante o teste da suspensão pela cauda. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=7-8). * $p < 0,05$ vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.1.2 Segundo Bloco Experimental

5.1.2.1. Discriminação olfatória

Neste segundo bloco, os camundongos fêmeas tratados com veículo ($t=2,773$; $df=6$; $p=0,0323$) e os machos tratados com veículo ($t=2,815$; $df=6$; $p=0,0306$) ou MPTP ($t=3,127$; $df=7$; $p=0,0167$) apresentaram preferência pelo compartimento familiar, como indicado pelo teste t de Student contra o valor teórico de 50% (Figura 14A). A ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas entre os grupos. Esses resultados sugerem que todos os grupos do presente experimento exibiram a habilidade de discriminar entre os dois compartimentos, com exceção das fêmeas tratadas com MPTP. Quanto ao parâmetro de locomoção (número de cruzamentos), a ANOVA de duas vias não acusou diferenças significativas entre os grupos (Figura 14B).

Figura 14. Avaliação da habilidade de discriminação olfatória em camundongos machos e fêmeas realizada 5 dias após a administração intranasal de MPTP

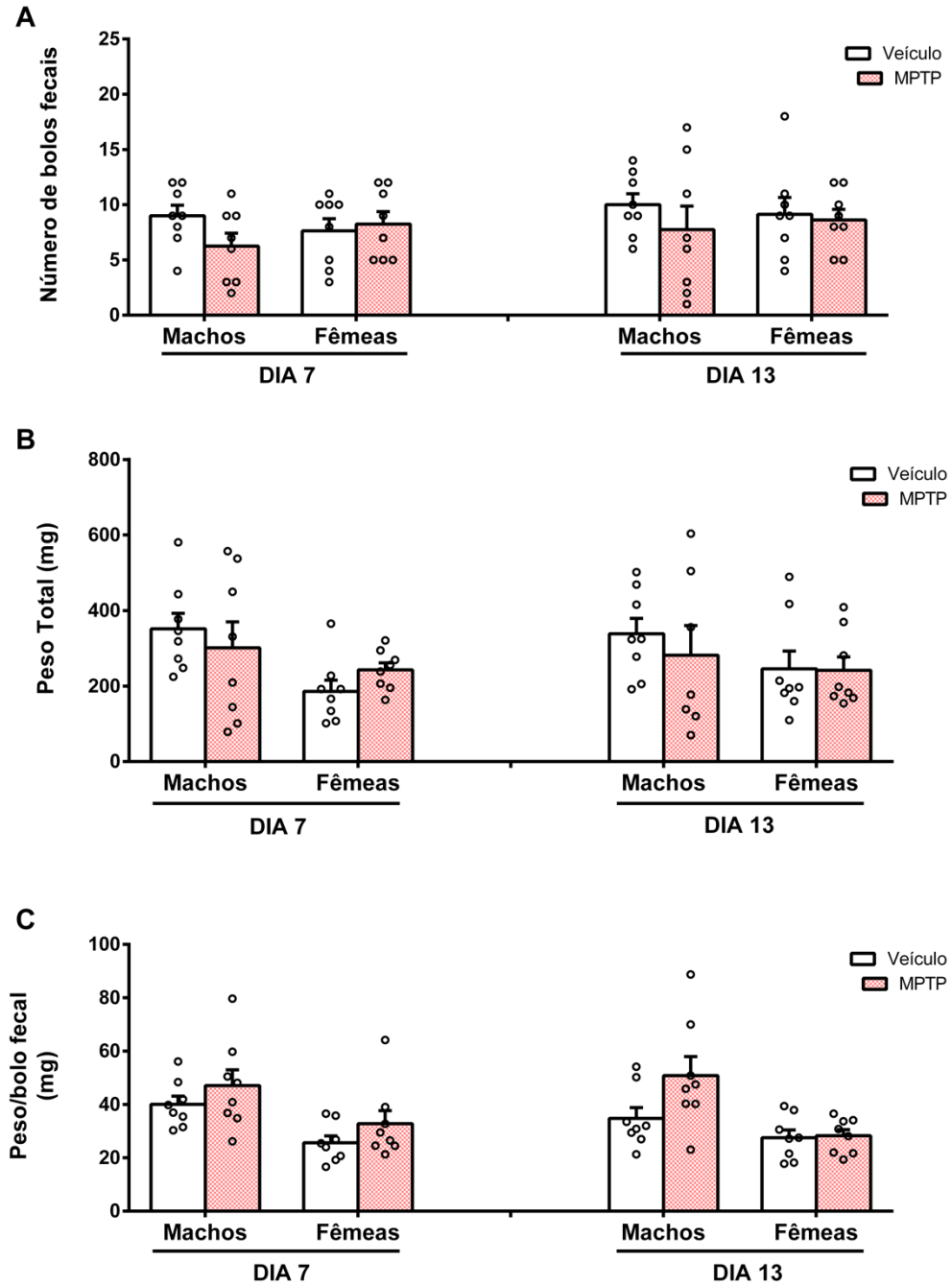


Legenda: Tempo de permanência no compartimento familiar em relação ao tempo total do teste (A). Número total de cruzamentos entre os compartimentos familiar e não familiar (B). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=8). $t_p < 0,05$ vs valor teórico de 50%, segundo teste *T* de Student.

5.1.2.2. Teste para avaliação da motilidade fecal

A ANOVA com medidas repetidas não constatou efeitos significantes para os fatores tratamento, sexo e sua interação nos parâmetros avaliados (número de bolos fecais, peso total das amostras e na razão peso por bolo fecal) (Figura 16).

Figura 15. Avaliação da motilidade fecal em camundongos machos e fêmeas realizada 7 e 13 dias após a administração intranasal de MPTP



Legenda: Número de bolos fecais coletados após o término do teste (A). Peso total das amostras coletadas (B). Razão entre peso e bolo fecal (C). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente ($n=7-8$).

5.1.2.3. Teste do ninho

O comportamento no teste do ninho foi analisado por um escore qualitativo referente ao ninho formado individualmente. A análise estatística não paramétrica revelou ausência de diferenças significantes entre as médias dos grupos [teste de Kruskal-Wallis test ($P < 0,05$)]. As médias \pm erro padrão da média referente aos grupos são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação da habilidade de construção de ninhos por camundongos machos e fêmeas 10 dias após a administração intranasal de MPTP

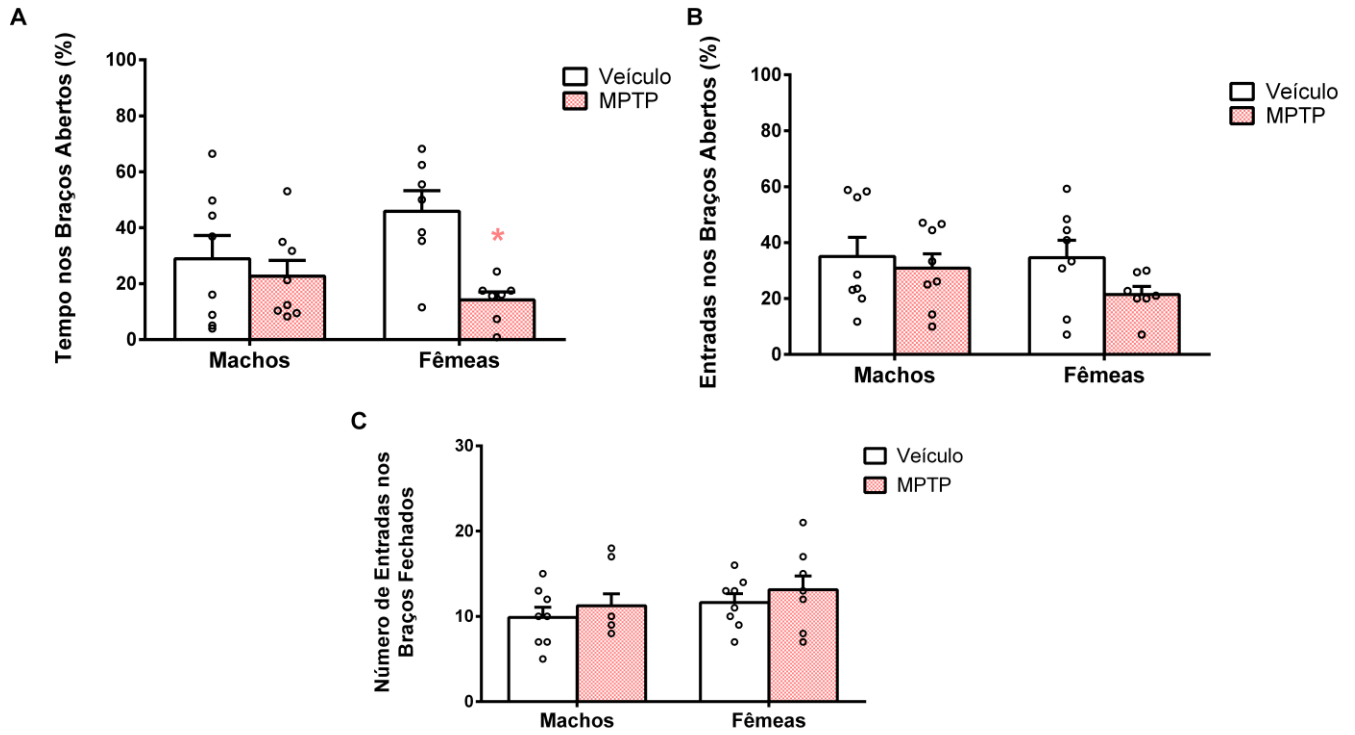
Tratamento	Sexo	Escore de Ninho
Veículo	Machos	3,63 \pm 0,263
MPTP	Machos	2,75 \pm 0,250
Veículo	Fêmeas	3,38 \pm 0,263
MPTP	Fêmeas	2,63 \pm 0,182

Legenda: Escore referente a qualidade dos ninhos formados no teste. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (n=8).

5.1.2.4. Teste do labirinto em cruz elevado

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator tratamento sobre o percentual do tempo de permanência nos braços abertos [$F(1,26) = 8,4411$; $p = 0,0073$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que a administração intranasal de MPTP reduziu o tempo de permanência das fêmeas nos braços abertos, sendo indicativo de um efeito ansiogênico dependente do sexo (Figura 16A). Por outro lado, a ANOVA de duas vias não acusou diferenças significativas entre os grupos quanto ao percentual de entradas nos braços abertos (Figura 16B) e ao número total de entradas nos braços fechados, sugerindo ausência de alterações locomotoras (Figura 16C).

Figura 16. Avaliação do comportamento tipo-ansioso em camundongos machos e fêmeas realizada 12 dias após a administração intranasal de MPTP



Legenda: Percentual do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do aparato. Número de entradas totais nos braços fechados do aparato (C). As barras representam a média \pm erro padrão da média (n=7-8). * $p < 0,05$ vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

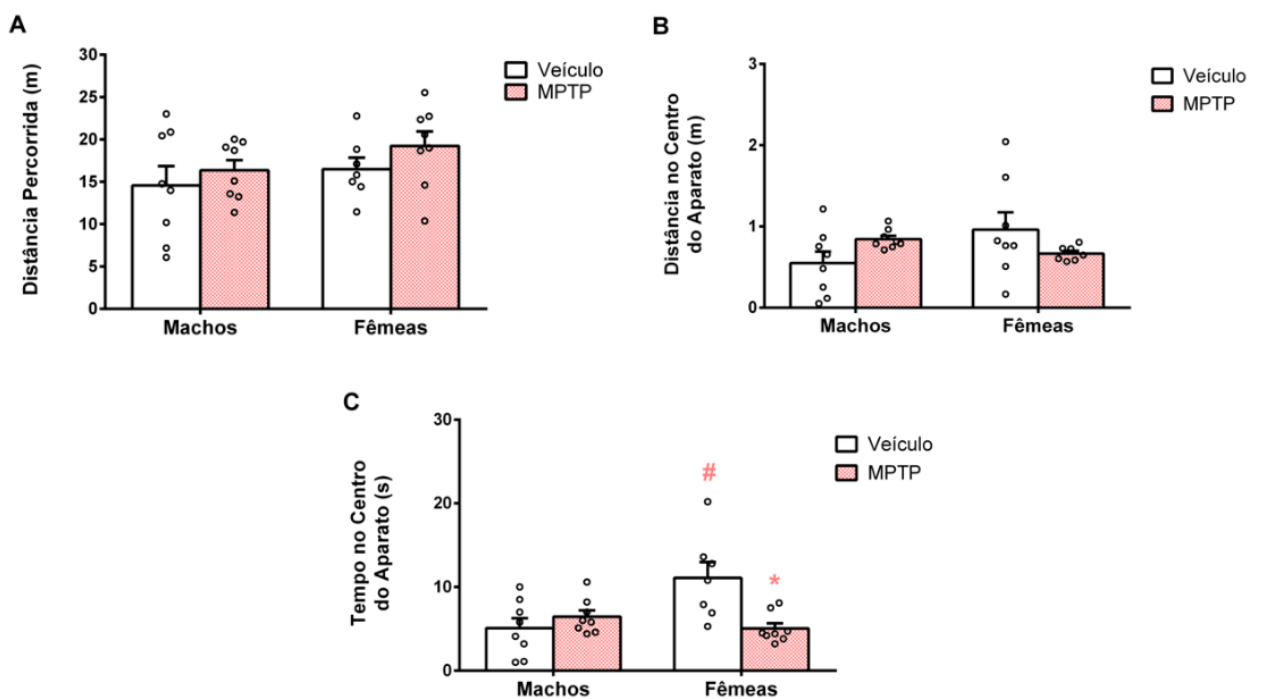
5.1.2.5. Teste do campo aberto

Assim como no primeiro bloco experimental, a ANOVA de duas vias não indicou alterações significativas entre os grupos para a distância total percorrida no TCA (Figura 17A). Adicionalmente, a ANOVA indicou resultados significativos no fator sexo*administração de MPTP [$F(1,27)=4,7805$; $p=0,0376$] na distância percorrida no centro do aparato. Entretanto, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls não indicou valores significativos entre as médias dos grupos (Figura 17B).

Referente ao tempo de permanência no centro do aparato (Figura 17C), a ANOVA revelou efeito significativo para a interação entre os fatores tratamento e sexo [$F(1,27)=10,0731$; $p=0,0037$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que as fêmeas do grupo veículo

permanecem mais tempo no centro do aparato em comparação aos machos. Por outro lado, a administração intranasal de MPTP reduziu seletivamente o tempo de permanência no centro do TCA das fêmeas, corroborando a hipótese de que o comportamento ansiogênico induzido pelo MPTP é influenciada pelo sexo.

Figura 17. Avaliação de parâmetros locomotores e de emocionalidade em camundongos machos e fêmeas realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP no teste do campo aberto

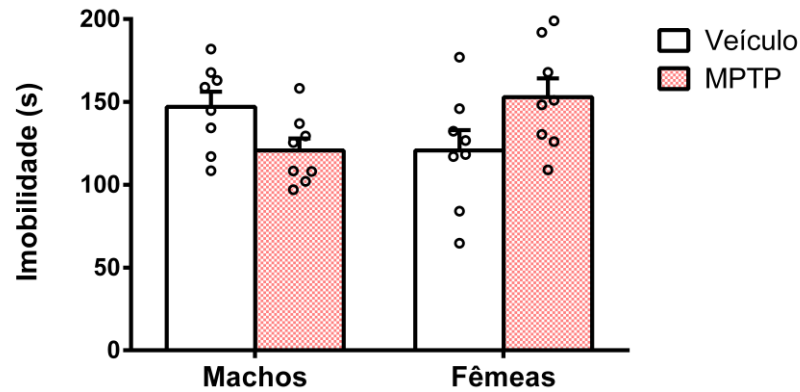


Legenda: Distância total percorrida no aparato (A). Distância total percorrida no centro do aparato (B). Tempo de permanência na área central do aparato (C). As barras representam a média ± erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=7-8). #p<0,05 vs Veículo Machos, *p<0,05 vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.1.2.6. Teste do nado forçado

A ANOVA indicou um efeito significativo do fator de interação tratamento*sexo [F(1,28)=8,2983; p=0,0075] no tempo de imobilidade. Entretanto, o *post-hoc* de Newman-Keuls não acusou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 18. Avaliação do comportamento tipo-depressivo em camundongos machos e fêmeas realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP no teste do nado forçado

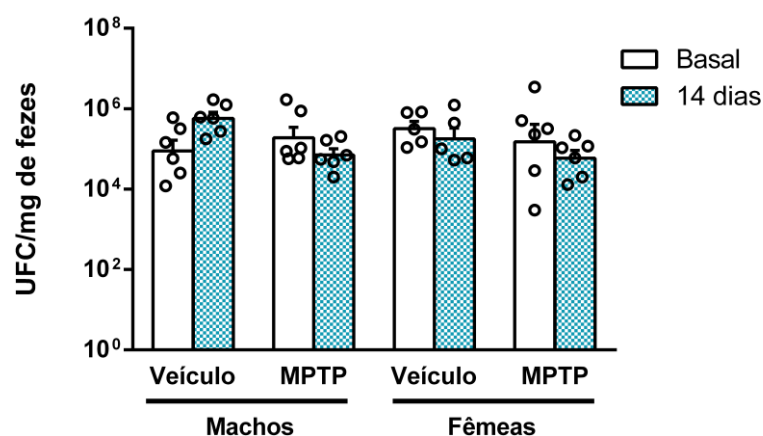


Legenda: Tempo total de imobilidade durante o teste do nado forçado. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=8).

5.2 CONTAGEM DE COLÔNIAS BACTERIANAS

A ANOVA com medidas repetidas não mostrou diferenças significativas no cultivo bacteriano das amostras fecais após a administração intranasal de MPTP, representado por UFC/mg de fezes (Figura 19).

Figura 19. Unidades formadoras de colônias bacterianas 2 dias antes e após 14 dias da administração de MPTP

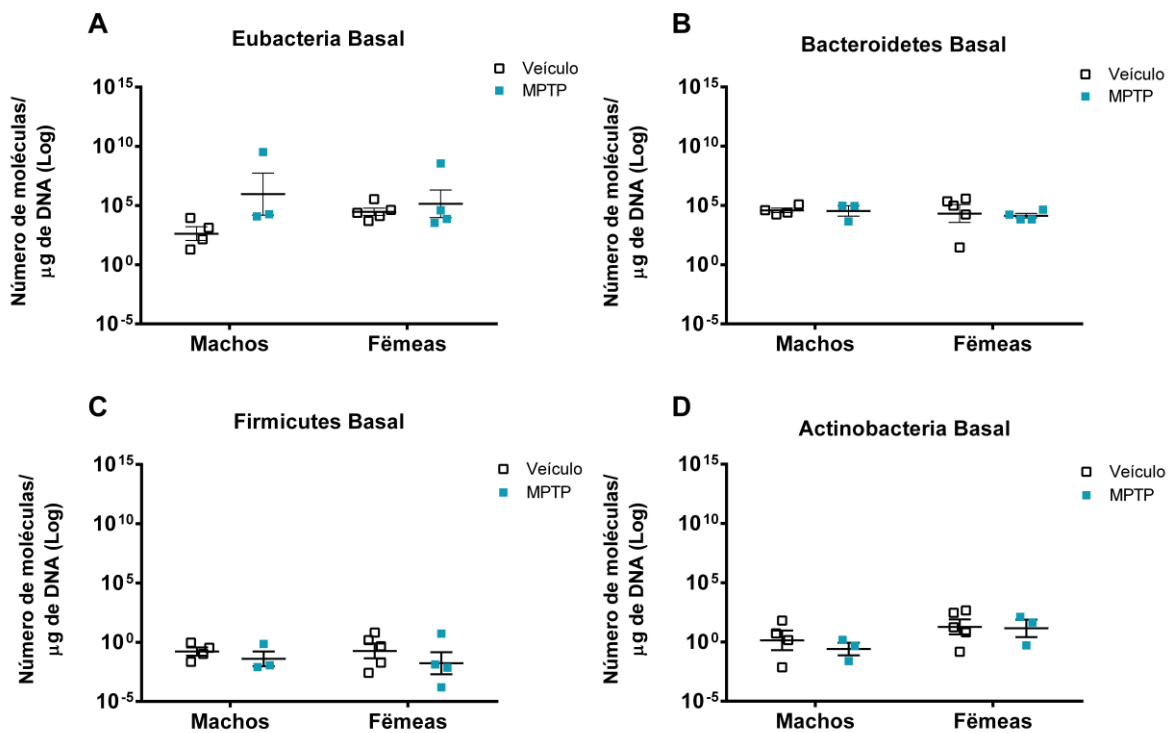


Legenda: Representação gráfica do cultivo de amostras fecais 2 dias antes da administração vs. 14 dias após a administração de intranasal MPTP. As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=6).

5.3 ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E DOS FILOS BACTEROIDETES, FIRMICUTES E ACTINOBACTERIA NO CONTEÚDO FECAL

A Figura 20 ilustra os valores referentes ao conteúdo total de bactérias (Eubacteria) e dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria presentes nas amostras fecais dos camundongos machos e fêmeas dois dias antes da administração intranasal de MPTP (avaliação basal). A ANOVA de duas vias revelou ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação à abundância de bactérias presente nas amostras (Figura 20A), assim como nos filos Bacteroidetes (Figura 20B), Firmicutes (Figura 20C) e Actinobacteria (Figura 20D).

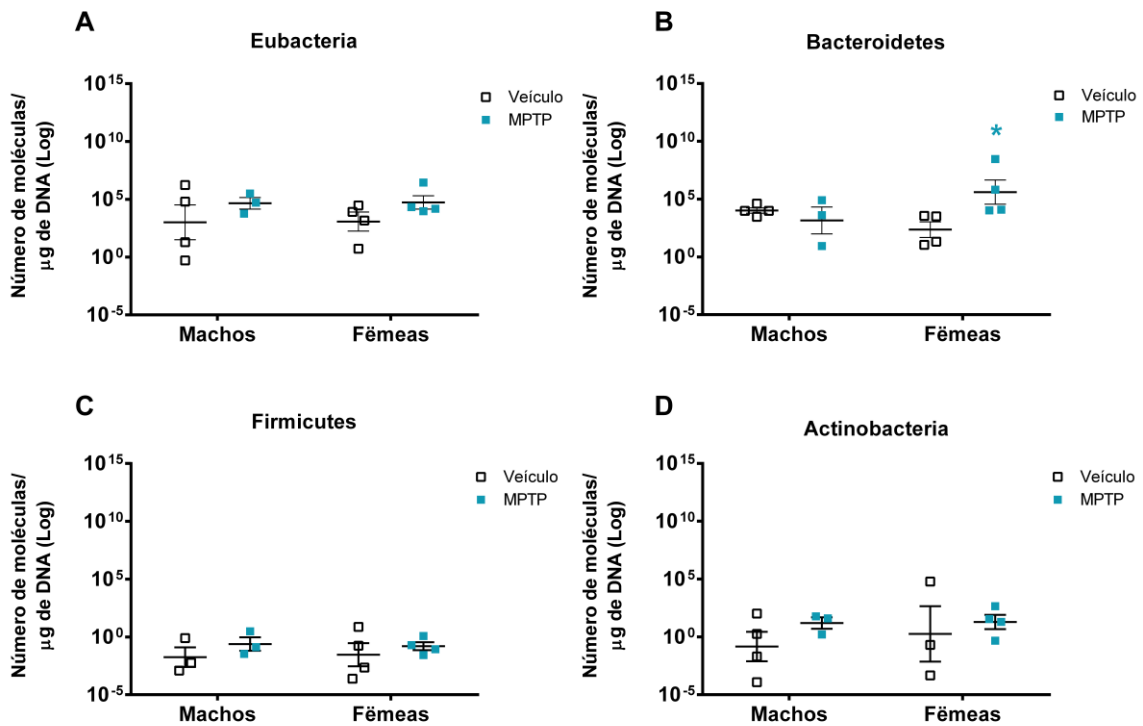
Figura 20. Avaliação da abundância de bactérias e dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria antes da administração intranasal de MPTP



Legenda: Abundância de bactérias no conteúdo fecal (A), filo Bacteroidetes (B), filo Firmicutes e (C) filo Actinobacteria (D) nas amostras fecais de camundongos machos e fêmeas dois dias antes da administração intranasal de MPTP. As barras representam médias \pm erro padrão da média e os quadrados representam cada animal individualmente (n = 3-4).

A Figura 21 destaca os mesmos parâmetros após 14 dias da administração intranasal de MPTP. Não foram observadas diferenças significativas nos valores referentes ao conteúdo total de bactérias (Eubacteria) e dos filós Firmicutes e Actinobacteria presentes nas amostras fecais dos camundongos machos e fêmeas. A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para a abundância do filo Bacteroidetes no fator tratamento*sexo [$F(1,11) = 7,3189$; $p=0,02$]. Posterior teste de Newman-Keuls revelou que a administração intranasal de MPTP aumentou o número de moléculas do filo Bacteroidetes apenas em camundongos fêmeas (Figura 21B).

Figura 21. Avaliação da abundância de bactérias e dos filós Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria após 14 dias da administração intranasal de MPTP



Legenda: Abundância de bactérias no conteúdo fecal (A), filo Bacteroidetes (B), filo Firmicutes e (C) filo Actinobacteria (D) nas amostras fecais de camundongos machos e fêmeas 14 dias após a administração intranasal de MPTP. As barras representam médias \pm erro padrão da média e os quadrados representam cada animal individualmente ($n = 3-4$). * $p < 0,05$ vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO DUODENO

A Tabela 2 sumariza os resultados da avaliação de parâmetros morfológicos realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP (0,5 mg por narina) em camundongos machos e fêmeas. A ANOVA de duas vias revelou ausência de efeitos significantes para os fatores tratamento e sexo no comprimento e na largura das vilosidades no duodeno. Em relação ao número de vilosidades por milímetro, a ANOVA indicou um efeito significativo para o fator sexo [$F(1,15)=5,894$; $p=0,0282$], embora o *post hoc* de Newman-Keuls não tenha acusado diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 2 - Parâmetros da avaliação morfológica do duodeno em camundongos machos e fêmeas realizada 15 dias após a administração intranasal de MPTP.

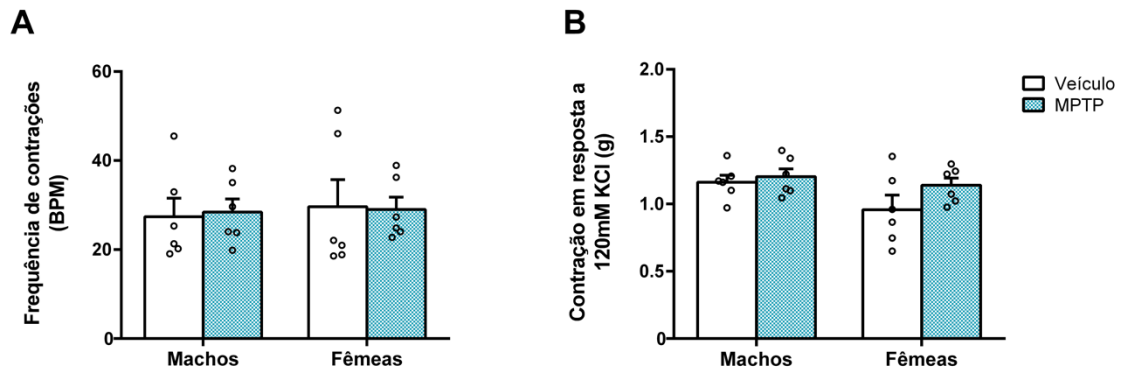
Tratamento	Sexo	Comprimento das Vilosidades	Largura das Vilosidades	Vilosidades por mm	n
Veículo	Machos	256,7 ± 22,1	71,1 ± 3,7	23,3 ± 0,9	5
MPTP	Machos	261,3 ± 8,6	78,5 ± 4,8	24,1 ± 1,2	5
Veículo	Fêmeas	307,4 ± 13,9	75,7 ± 2,2	22,2 ± 0,7	5
MPTP	Fêmeas	235,9 ± 18,1	75,3 ± 0,8	19,2 ± 2,1	4

Legenda: Os valores representam a média ± erro padrão da média (n=4/5).

5.5 RESPOSTA CONTRÁTIL À ACETILCOLINA E DOPAMINA NO ÍLEO ISOLADO

A ANOVA de duas vias indicou ausência de diferenças significativas para os fatores tratamento e sexo na frequência de contrações nos 10 minutos precedentes aos experimentos (Figura 22A), e na resposta contrátil frente ao KCl (Figura 22B).

Figura 22. Avaliação da frequência de contrações e da resposta contrátil ao KCl no íleo isolado de camundongos machos e fêmeas 16 dias após a administração intranasal de MPTP



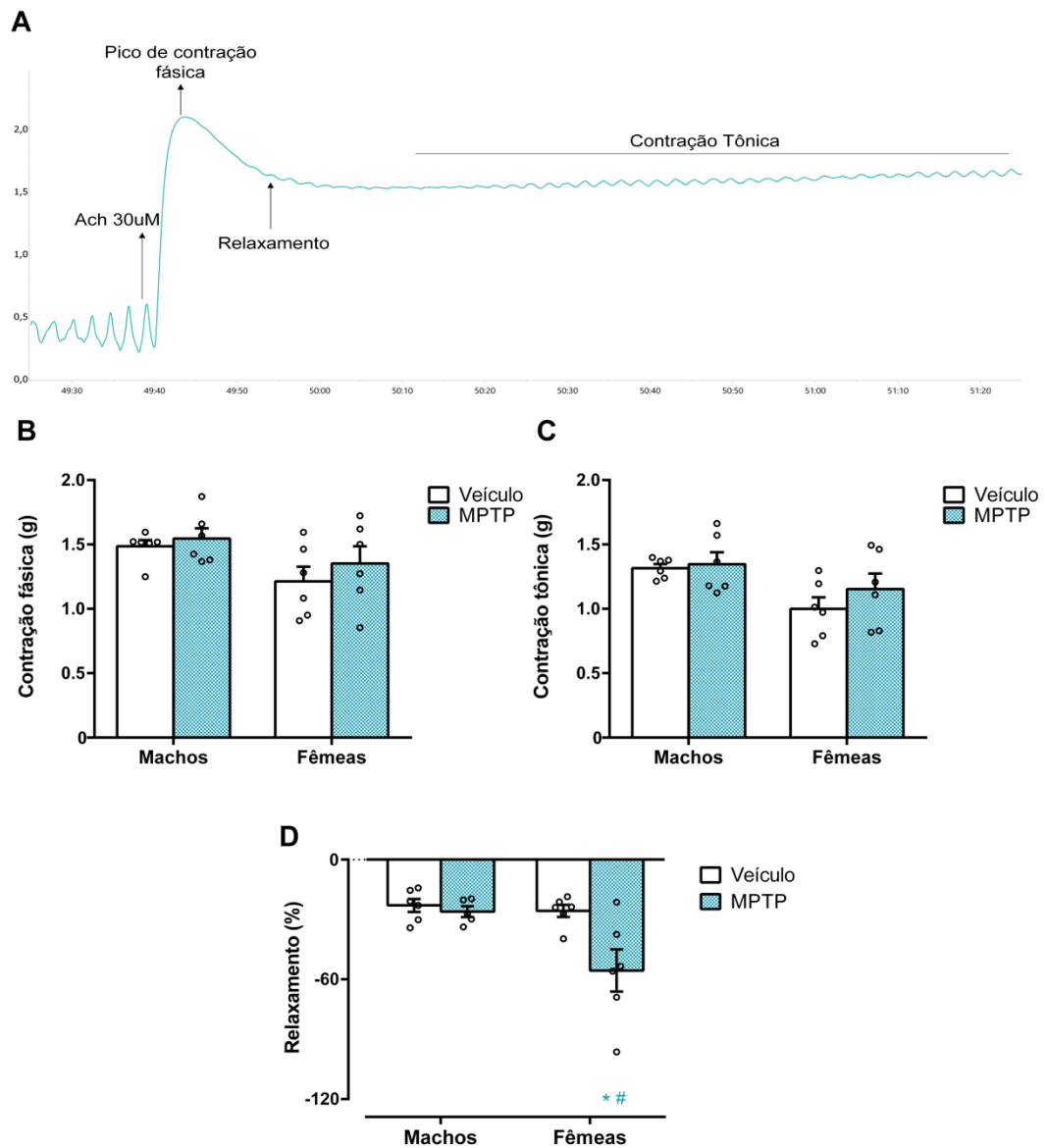
Legenda: Frequência de contrações durante os dez minutos antecedentes ao início do experimento (A) e resposta contrátil ao KCl (120 mM) (B) nos segmentos de íleo coletados de camundongos machos e fêmeas 16 dias após a administração intranasal de MPTP (0,5 mg por narina). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=6).

5.5.1 Avaliação da resposta à acetilcolina no íleo isolado de camundongos machos e fêmeas após a administração intranasal de MPTP

Após 20 minutos da exposição ao KCl, todos os segmentos de íleo foram submetidos à 30 μ M de ACh exógena, como ilustrado na Figura 23. A ANOVA de duas vias apresentou efeitos significantes do fator sexo sobre a resposta de contração fásica [F (1,20) = 5,4744; p=0,0297], bem como para a resposta de contração tônica [F (1,20) = 8,0687; p=0,0101]. Porém, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls não indicou diferenças significativas entre os grupos experimentais nestes parâmetros (Figura 23B e Figura 23C).

Em relação ao relaxamento (Figura 23D), a ANOVA de duas vias indicou efeitos significantes dos fatores tratamento [F (1,19) = 7,2391; p=0,0144], sexo [F (1,19) = 6,9092; p=0,0165] e na interação tratamento e sexo [F (1,19) = 4,7313; p=0,0424]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls indicou que a administração intranasal de MPTP em fêmeas promoveu um aumento no relaxamento do íleo observado após a contração fásica induzida pela ACh (Figura 23D).

Figura 23. Avaliação da resposta contrátil à 30 μM de ACh nos segmentos de íleo isolado de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP.



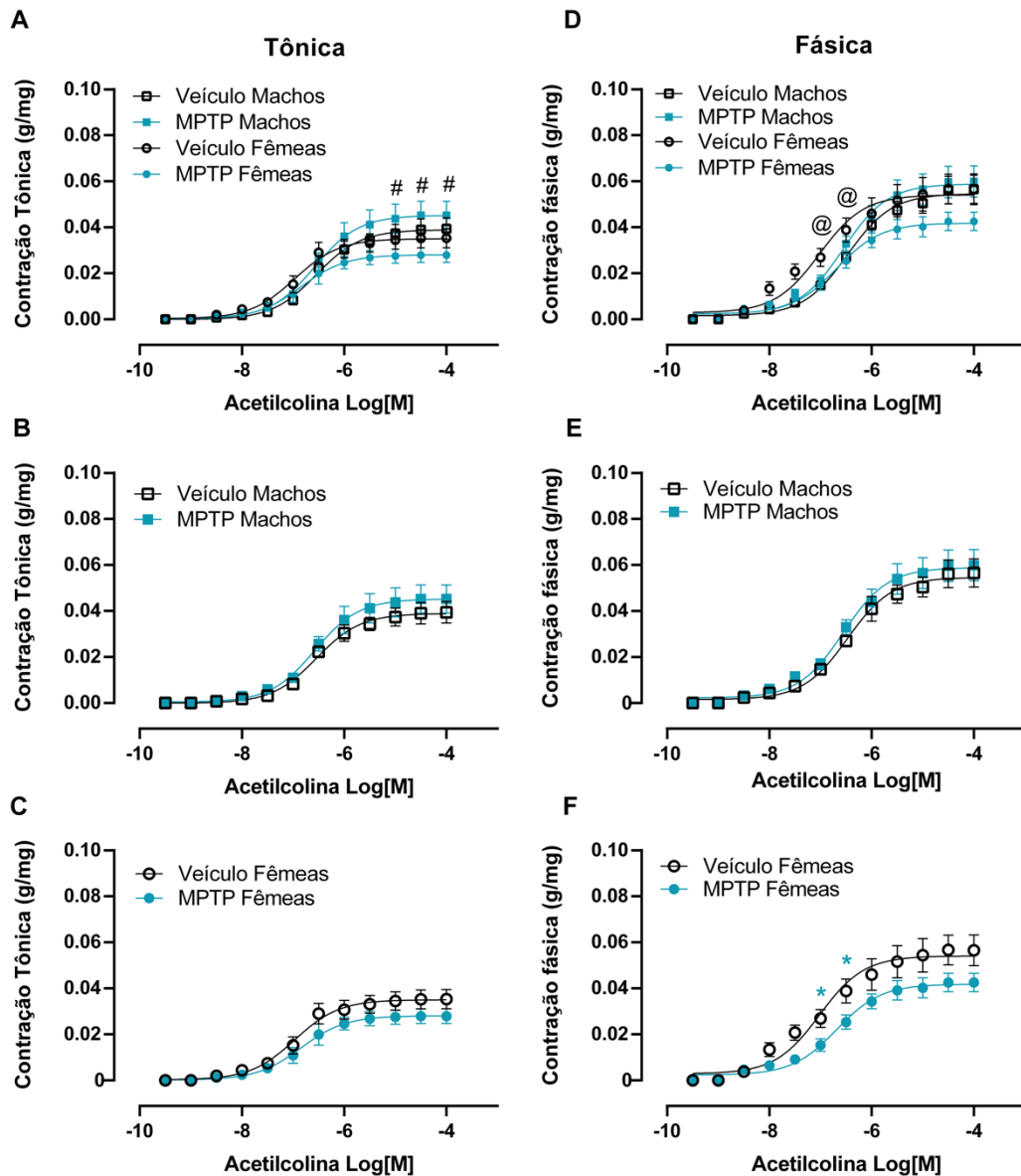
Legenda: Registro representativo da resposta à ACh no íleo isolado de um camundongo fêmea do grupo controle (A). Contração fásica (B) e contração tônica (C) em íleos isolados de camundongos machos e fêmeas. Relaxamento em relação a contração fásica máxima (D). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente ($n=5-6$). * $p<0,05$ vs Veículo Fêmeas, # $p<0,05$ vs MPTP Machos, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Após um período de equilíbrio (30 minutos), os segmentos isolados de íleo foram submetidos às concentrações crescentes não cumulativas de ACh (10 nM a 300 μM). Em relação à contração tônica, a ANOVA de três vias revelou efeitos significativos dos fatores sexo

[F (1,240) = 10,960; p=0,0010], concentração de ACh [F (1,240) = 100,536; p<0,0001] e nas interações entre os fatores tratamento e sexo [F (1,240) = 17,784; p<0,0001] e concentração de ACh e sexo [F (1,240) = 2,779; p=0,0020]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls indicou que as fêmeas submetidas à administração intranasal de MPTP apresentaram uma resposta máxima reduzida em comparação aos machos tratados com MPTP (Figura 24A). Todavia, o teste *post-hoc* revelou ausência de efeitos significantes do tratamento com MPTP em relação ao grupo veículo em camundongos machos (Figura 24B) e fêmeas (Figura 24C).

Quanto à contração fásica, a ANOVA de três vias indicou efeitos significantes dos fatores tratamento [F (1,240) = 12,670; p=0,0004] e concentração de ACh [F (1,240) = 116,115 p<0,0001], bem como para as interações entre os fatores tratamento e sexo [F (1,240) = 38,281; p<0,0001] e sexo*concentração de ACh [F (1,240) = 2,153; p=0,0176]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls revelou que o grupo fêmea-veículo apresentou uma resposta contrátil inicial frente à ACh (3 e 10 μ M) maior do que o grupo macho-veículo, sendo que esta diferença não foi observada após a administração intranasal de MPTP (Figura 24F).

Figura 24. Curvas de concentração-resposta não cumulativas à ACh em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP.

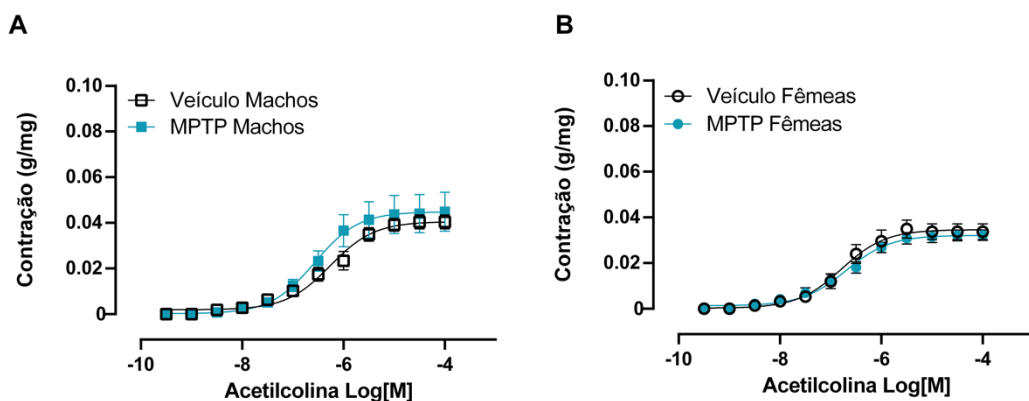


Legenda: Curvas de concentração resposta à ACh no íleo isolado referente a contração tônica (A) em machos (B) e fêmeas (C), assim como a contração fásica (D) em machos (E) e fêmeas (F). Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média (n=6). *p<0,05 vs Veículo Fêmeas, @p<0,05 vs Veículo Machos, #p<0,05 vs MPTP Fêmeas, segundo ANOVA de três vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Após outro período de equilíbrio de 60 minutos, os segmentos isolados de íleo foram novamente submetidos à contração com as mesmas concentrações crescentes de ACh, porém foi realizado uma curva de concentração-resposta cumulativa (Figura 25).

A ANOVA de três vias indicou efeitos significantes dos fatores sexo [F (1,240) = 6,630; p=0,0106], concentração de ACh [F (1,240) = 86,601; p<0,0001] e da interação entre os fatores tratamento*sexo [F (1,240) = 4,540; p=0,0341]. O teste de Newman-Keuls revelou ausência de efeitos significantes da administração intranasal de MPTP sobre resposta contrátil frente à ACh no íleo isolados de camundongos machos (Figura 25A) e fêmeas (Figura 25B).

Figura 25. Curvas de concentração resposta cumulativas à ACh em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP

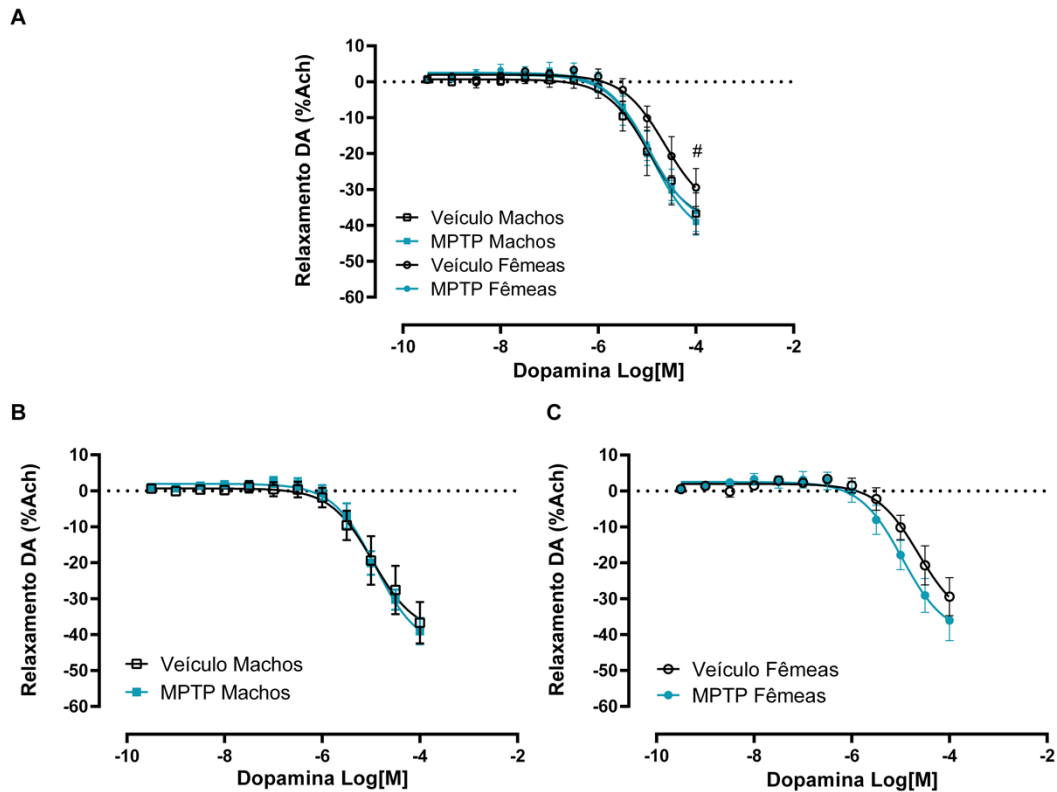


Legenda: Curvas de Concentração Resposta Cumulativa à ACh no íleo isolado de machos (A) e de fêmeas (B). Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média (n=6).

5.5.2 Avaliação da resposta à dopamina no íleo isolado de camundongos machos e fêmeas após a administração intranasal de MPTP

A partir da resposta contrátil tônica mediada por 30 μ M de ACh, os segmentos isolados de íleo foram submetidos a concentrações crescentes cumulativas de DA para verificar o percentual de relaxamento (Figura 26). A ANOVA de três vias indicou efeitos significantes dos fatores concentração de DA [F (1,239) = 100,9162; p<0,0001] e sexo [F (1,239) = 12,0130; p=0,0006]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls indicou que a resposta máxima obtida nesse experimento foi maior no grupo macho-veículo em relação ao grupo fêmea-veículo (Figura 26A). A administração intranasal de MPTP não interferiu no relaxamento induzido pela DA no íleo isolado de camundongos machos (Figura 26B) ou fêmeas (Figura 26C).

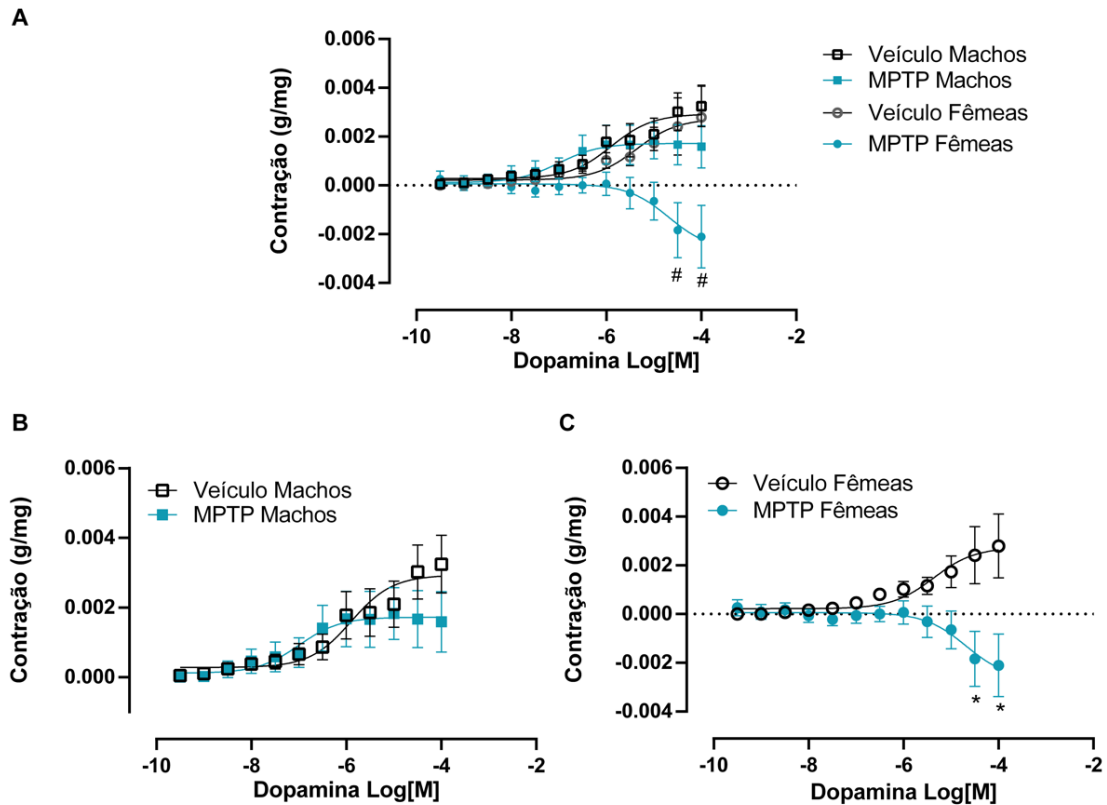
Figura 26. Curvas concentração resposta de relaxamento de DA em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP.



Legenda: Curvas de relaxamento de DA em relação ao percentual de contração tônica de ACh após 16 dias da administração intranasal de MPTP (A). Representações gráficas dos resultados dos camundongos machos (B) e das fêmeas (C) separadamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média (n=6). # $p < 0,05$ vs Veículo Fêmeas, segundo ANOVA de três vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

Na Figura 27 é ilustrada a curva de concentração resposta cumulativa à DA. A ANOVA de três vias revelou efeitos significantes dos fatores tratamento [$F(1,240) = 21,4508$; $p < 0,0001$], sexo [$F(1,240) = 26,1972$; $p < 0,0001$] e concentração de DA [$F(1,240) = 3,3607$; $p = 0,0002$], bem como das interações dos fatores tratamento e sexo [$F(1,240) = 9,9999$; $p = 0,0017$] e tratamento*concentrações de DA [$F(1,240) = 3,9656$; $p < 0,0001$]. A análise de múltiplas comparações de Newman-Keuls indicou que a administração intranasal de MPTP reduziu a resposta máxima da DA nos segmentos de íleo isolados de fêmeas (Figura 27C), sendo que esta alteração não foi observada nos segmentos de íleos isolados de machos (Figura 27A e Figura 27B).

Figura 27. Curvas de concentração resposta cumulativa à DA em segmentos de íleo isolados de camundongos machos e fêmeas realizadas 16 dias após a administração intranasal de MPTP



Legenda: Curvas de concentração resposta cumulativa à DA no íleo isolado de camundongos 16 dias após a administração intranasal de MPTP (A). Representações gráficas dos resultados dos camundongos machos (B) e das fêmeas (C) separadamente. Os resultados são representados pela média \pm erro padrão da média (n=6). * $p < 0,05$ vs Veículo Fêmeas, # $p < 0,05$ vs MPTP Machos, segundo ANOVA de três vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

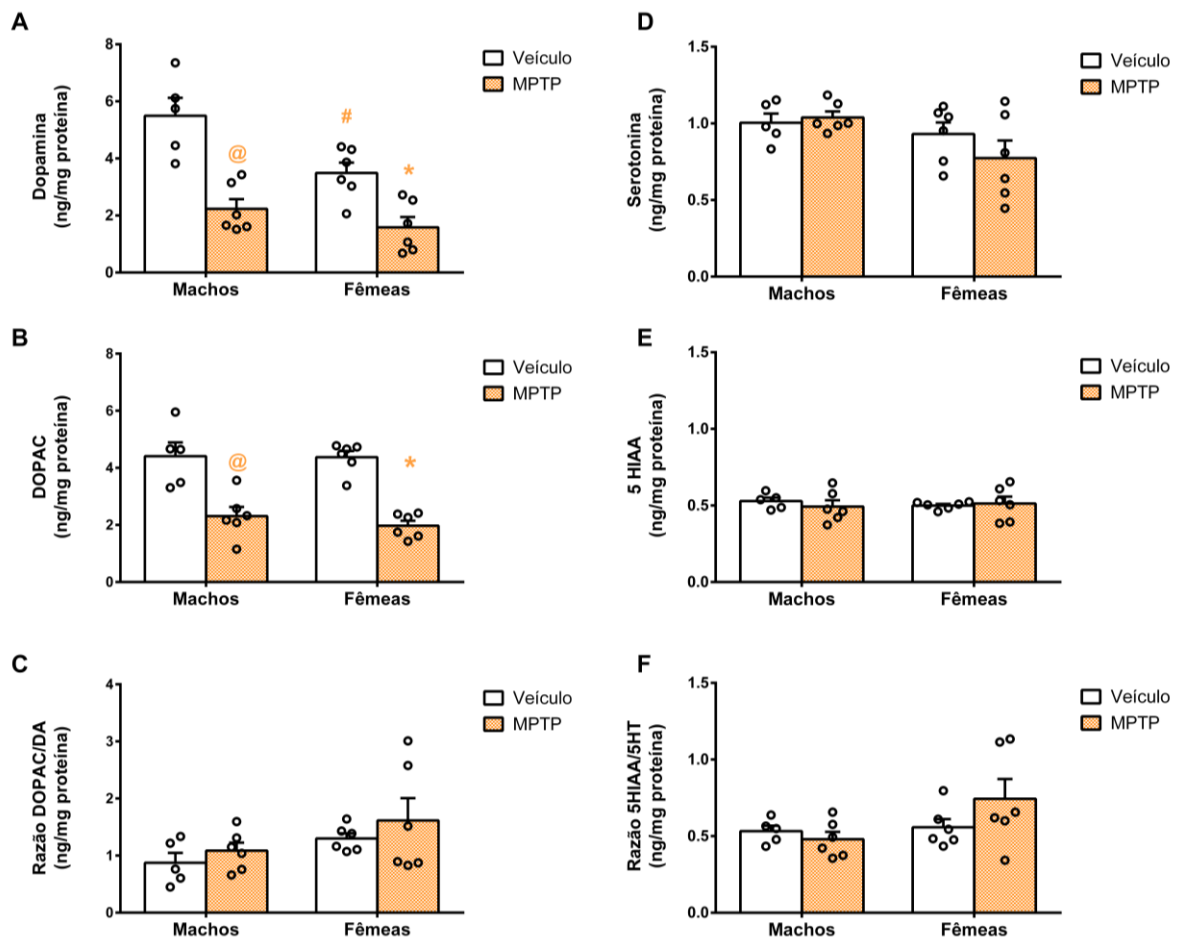
5.6 DOSAGEM DE MONOAMINAS NO ESTRIADO, HIPOCAMPO E DUODENO

5.6.1 Estriado

A Figura 30A ilustra os efeitos da administração intranasal de MPTP (0,5 mg por narina) sobre as concentrações dos neurotransmissores DA e 5-HT e seus metabólitos DOPAC e 5HIAA no estriado de camundongos machos e fêmeas 16 dias após o tratamento. A ANOVA de duas vias indicou efeitos significantes dos fatores tratamento [$F(1,19)=37,6991$; $p < 0,0001$] e sexo [$F(1,19)=9,9200$; $p=0,0052$] nas concentrações de DA. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que as fêmeas apresentam uma menor concentração *per se* nas concentrações

estriatais de DA em comparação aos machos. Além disso, a administração intranasal de MPTP reduziu significativamente as concentrações de DA no estriado de camundongos de ambos os sexos (Figura 30A). Quanto às concentrações de DOPAC, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator tratamento [$F(1,19)=55,2987$; $p<0,0001$]. Posterior teste de Newman-Keuls revelou que a administração intranasal de MPTP reduziu significativamente as concentrações de DOPAC no estriado de camundongos de ambos os sexos estriado (Figura 30B). Por outro lado, não foram observados efeitos significantes dos fatores tratamento ou sexo nos demais parâmetros avaliados no estriado: *turnover* de DA (razão entre DOPAC e DA) (Figura 30C), concentrações de 5-HT (Figura 30D) e 5HIAA (Figura 30E), ou no *turnover* de 5-HT, indicado pela razão entre 5HIAA e 5-HT (Figura 30F).

Figura 28. Dosagem das concentrações de monoaminas no estriado de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP



Legenda: Concentrações de DA (A), DOPAC (B), 5-HT (D) e 5HIAA (E) no estriado de camundongos. Razão entre DOPAC/DA(C) e 5HIAA/5-HT(F). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos

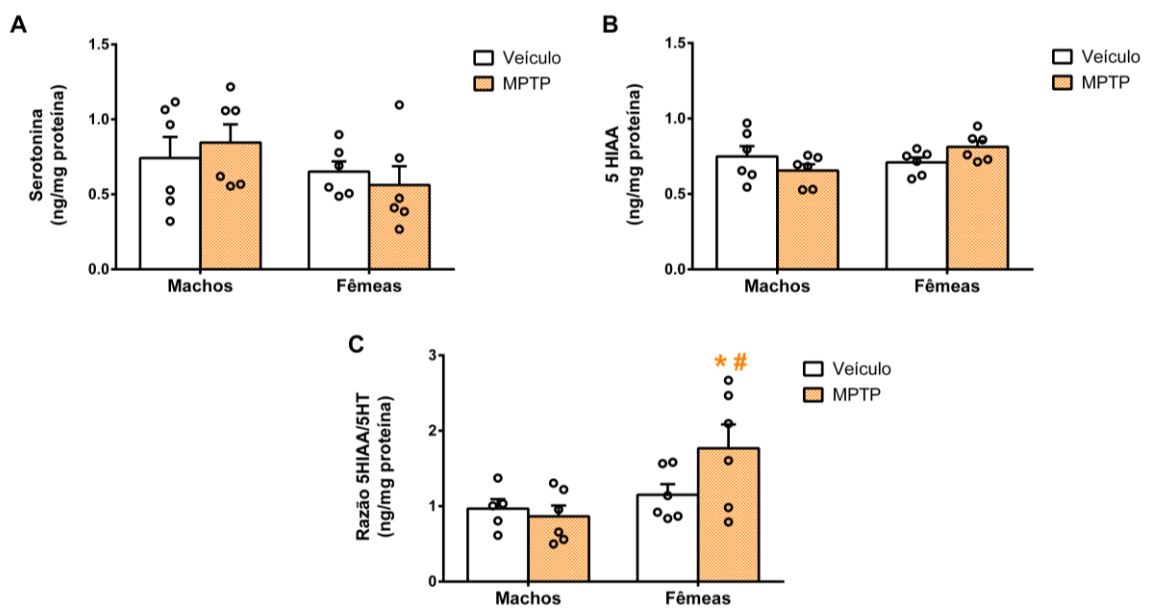
representam cada animal individualmente (n=5-6). @p<0,05 vs Veículo Machos, *p<0,05 vs Veículo Fêmeas, #p<0,05 vs Veículo Machos, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.6.2 Hipocampo

Devido as baixas concentrações de DA e DOPAC no hipocampo (indetectáveis com o método utilizado), foram avaliadas somente as concentrações de 5-HT, 5HIAA e o *turnover* de 5-HT no hipocampo, como ilustra a Figura 29. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de 5-HT entre os grupos experimentais (Figura 29A). A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do fator interação entre tratamento e sexo [F(1,20)=4,3936; p=0,0489] nas concentrações hipocampais de 5-HIAA. Entretanto, a análise de múltiplas comparações com o teste de Newman-Keuls não revelou diferenças significativas entre os grupos nesta medida (Figura 29B).

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator sexo na razão entre 5HIAA e 5-HT [F(1,19)=7,0993; p=0,0153]. O *post-hoc* de Newman-Keuls revelou que a administração intranasal de MPTP provou um aumento no *turnover* de 5-HT seletivamente nas fêmeas (Figura 29C).

Figura 29. Dosagem das concentrações de serotonina e metabólito no hipocampo de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP



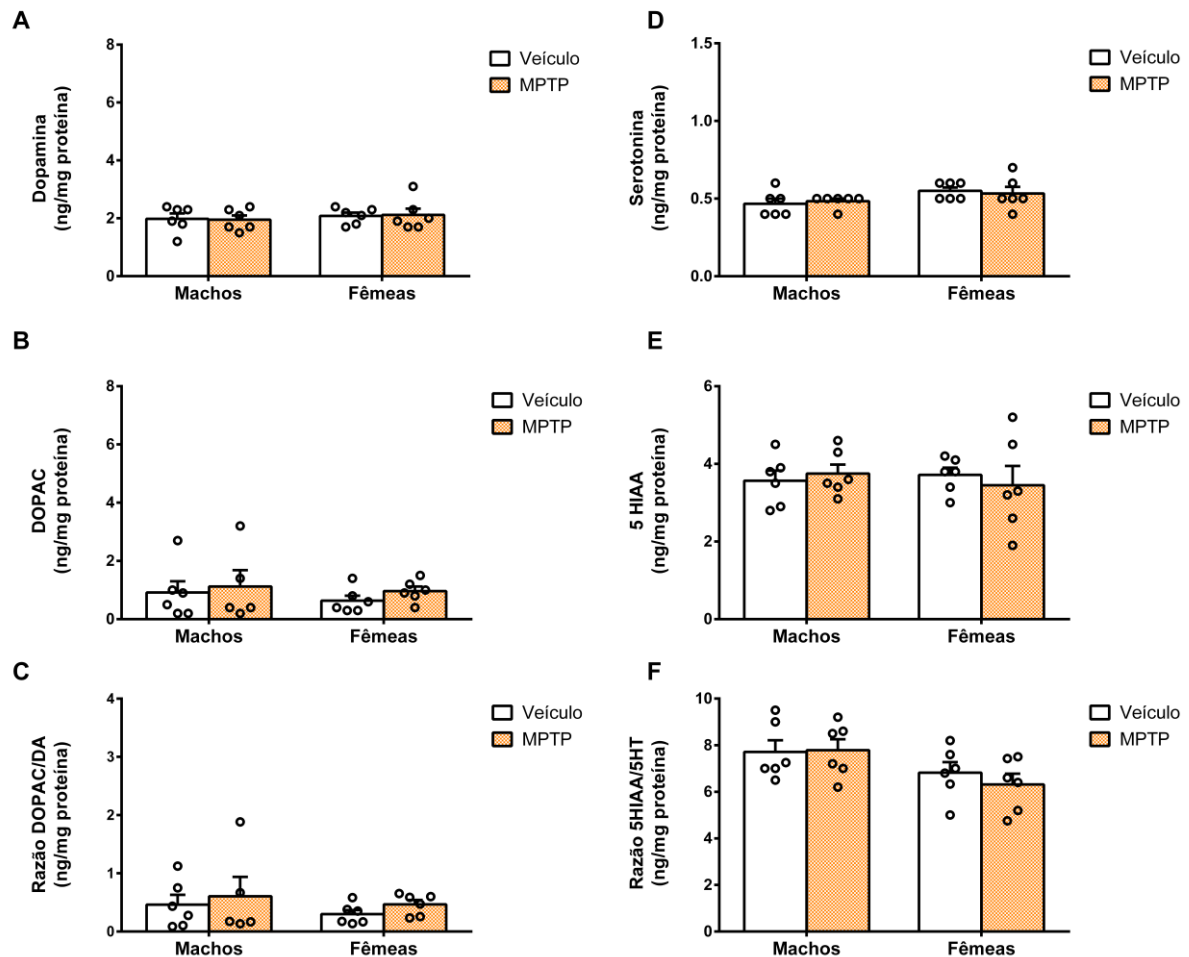
Legenda: Concentrações de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) no hipocampo de camundongos machos e fêmeas. Razão entre 5-HIAA/5-HT(C). As barras representam a média \pm erro padrão da média e os pontos representam cada

animal individualmente (n=5-6). *p<0,05 vs Veículo Fêmeas, #p<0,05 vs Machos, segundo ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.6.3 Duodeno

Como ilustrado na Figura 30, não foram observados efeitos significativos dos fatores tratamento e sexo nas concentrações de monoaminas dosadas no duodeno, conforme ANOVA de duas vias (Figura 30A, Figura 30C, Figura 30E e Figura 30F) e análise de Kruskal-Wallis (Figura 30B e Figura 30D).

Figura 30. Dosagem das concentrações de DA, 5-HT e seus metabólitos no duodeno de camundongos machos e fêmeas realizada 16 dias após a administração intranasal de MPTP



Legenda: Concentrações de DA (A), DOPAC (B), 5-HT (D) e 5HIAA (E) no duodeno de camundongos. Razão entre DOPAC/DA(C) e 5HIAA/5-HT(F). As barras representam a média ± erro padrão da média e os pontos representam cada animal individualmente (n=5-6).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que camundongos machos e fêmeas apresentam respostas distintas frente à administração intranasal de MPTP, da mesma forma que se observa um dimorfismo sexual na população acometida pela DP. Apesar disso, ambos os sexos apresentaram uma redução significativa de DA e DOPAC no estriado após 16 dias da exposição ao MPTP intranasal (0,5 mg/narina). Assim como em pacientes, a perda de DA e seus metabólitos no estriado de roedores reflete a morte de neurônios dopaminérgicos e a degeneração de seus axônios (MEREDITH; RADEMACHER, 2011). Em contraste com nossos achados, Ookubo et al. (2009) demonstraram que 4 administrações de MPTP ip (20 mg/kg cada) com intervalos de 2 horas induziram uma redução de DA, DOPAC e HVA estriatal mais pronunciada em fêmeas do que em machos da linhagem C57BL/6. Enquanto o trabalho de Nánási et al. (2020), que utilizou 5 administrações de MPTP ip (12 mg/kg cada) com intervalos de 2 horas, induziu uma perda de DA no estriado mais pronunciada em machos do que em fêmeas.

A respeito do modelo intranasal, nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos machos administrados com uma única dose (1 mg/narina) de MPTP apresentam diminuição de DA no estriado e no bulbo olfatório (PREDIGER et al., 2006, 2010). Em camundongos fêmeas, foi observado uma redução no imunoconteúdo de TH no estriado com a administração da mesma dose (SCHAMNE et al., 2018). Corroborando esses achados, este estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos do MPTP intranasal sob as concentrações de DA, DOPAC, 5-HT e 5HIAA em camundongos fêmeas. Nota-se que os níveis de 5-HT e 5HIAA no estriado não foram afetados pela administração em nenhum sexo.

Destaca-se que os pacientes diagnosticados com DP exibem sintomas motores somente quando a degeneração dopaminérgica ultrapassa 60% (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015; BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020). Já nos estágios iniciais, há uma perda moderada de neurônios dopaminérgicos da SN associada à presença de sintomas olfatórios e emocionais e ausência de alterações motoras. Devido ao grau de degeneração, a administração intranasal de MPTP em roedores reproduz um processo temporal de prejuízos não motores que mimetizam os estágios iniciais da DP em humanos (PREDIGER et al., 2011).

Correlacionando com o estadiamento de sintomas não motores na fase prodrômica da DP, demonstramos pela primeira vez que a administração intranasal de MPTP foi capaz de interferir na habilidade olfatória de fêmeas após 5 dias. A disfunção olfatória é associada a um dano celular nos neurônios de primeira ordem ou no bulbo olfatório (DOTY, 2012). De fato, Prediger et al. (2010) demonstrou redução no número de células TH+ no bulbo olfatório, além da diminuição de DA e NA em camundongos machos após a administração intranasal de MPTP (1 mg/narina). Contudo, a diminuição da dose de MPTP (0,5 mg/narina) nesse estudo não foi capaz de induzir um comprometimento olfatório em animais machos.

A neurodegeneração inicial no bulbo olfatório é um fator fundamental para a reprodutibilidade do modelo. É possível que a redução da dose pela metade não seja suficiente para causar um dano olfatório em machos, ou que estes tenham uma recuperação mais rápida do que as fêmeas devido ao alto nível de regeneração e neuroplasticidade do bulbo olfatório. Em camundongos C57bl/6 *naive* com 2 meses de vida é observado um dimorfismo sexual na neurogênese do bulbo olfatório, na qual machos apresentam maior proliferação de novas células do que as fêmeas. Além disso, esse estudo observou que essas diferenças não são preservadas em animais com 6 meses de idade (NUNEZ-PARRA; PUGH; ARANEDA, 2011). Enquanto no presente trabalho foram utilizados animais com 3 a 4 meses, Prediger et al. (2010) realizou os experimentos apenas em machos com 6 meses. A variação de dose e de idade dos animais são fatores que podem interferir na comparação destes resultados.

Ainda, observamos que no primeiro protocolo os machos do grupo veículo não discriminaram o compartimento familiar, como ocorre no segundo protocolo. Já as fêmeas do grupo veículo apresentaram o mesmo comportamento em ambos os protocolos. Normalmente as fêmeas tendem a exibir maior sensibilidade aos odores e uma melhor identificação e discriminação (KASS et al., 2017). Em roedores machos, existe um comportamento territorial e hierárquico que acompanha pistas olfatórias, como por exemplo o odor da urina dos machos dominantes (LEE; KHAN; CURLEY, 2017). Como o teste de DO é baseado no odor presente na maravalha dos animais, existe uma limitação nesse sentido que poderia estar interferindo na reprodutibilidade do teste e que não pode ser descartada.

O olfato é um sentido crítico para diversos comportamentos, desde a localização de comida, comportamento sexual e social e até mesmo emocional. O bulbo olfatório projeta seus axônios para várias áreas do SNC que estão envolvidas na emoção e cognição, como a amígdala, o córtex pré-frontal e o hipocampo. Neste sentido, algumas doenças neuropsiquiátricas também

apresentam o desenvolvimento de disfunção olfatória, como é o caso da depressão (CHEN et al., 2019). Em roedores, a destruição do bulbo olfatório é caracterizada como um modelo de depressão, gerando alterações nos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos. É sugerido que nesse modelo, a perda de aferências no sistema olfatório pode causar a degeneração de estruturas subsequentes (ORAL et al., 2013). Assim como a disfunção olfatória, a depressão na DP pode preceder o diagnóstico clínico e é frequentemente reportada com uma proporção maior em mulheres do que em homens, tanto na população em geral quanto na DP (LINTEL et al., 2021).

Demonstramos que apenas as fêmeas apresentam um comportamento do tipo-depressivo avaliado pelo TSC após 14 dias da administração intranasal de MPTP (0,5 mg/narina), assim como observado pela administração de 1 mg/narina (SCHAMNE et al., 2018). O aumento do tempo de imobilidade se mostrou condicionado ao sexo, mas independente da locomoção dos animais, visto que não há alterações na distância total percorrida no TCA. O mesmo comportamento não é observado no TNF no segundo protocolo.

Apesar de ambos os testes serem utilizados para o estudo de comportamentos tipo-depressivos, as vias neuroquímicas relacionadas ao comportamento nos dois paradigmas não são consideradas as mesmas. Os ISRS que geralmente são utilizados como controle positivo nesses testes não reduzem de forma consistente a imobilidade no TNF em algumas doses, comparado com o TSC (BAI et al., 2001; RENARD et al., 2003; ZHU et al., 2020). Além disso, existem alguns relatos contestando a validade do TNF. Autores relatam a variabilidade interexperimental observada nos estudos de seus laboratórios e recentemente uma meta-análise concluiu que o teste possui sensibilidade limitada em camundongos (COSTA et al., 2013; KARA; STUKALIN; EINAT, 2018; RAMOS-HRYB et al., 2018). Portanto, mais estudos são necessários para afirmar se as discrepâncias entre TST e TNF reforçam a questão de reprodutibilidade discutidas, ou se a menor dose de MPTP poderia afetar diferentes circuitos e conduzir respostas distintas.

Ao mesmo tempo, a redução da dose de MPTP administrada via intranasal (0,5 mg/narina) não reproduziu comportamentos tipo-anedônicos no TBS ou no TPS, observados por Schamne (2018) apenas em fêmeas administradas com uma dose de 1 mg/narina, ou no teste do ninho. Considerada um dos elementos da depressão, a anedonia é definida como uma diminuição no interesse ou prazer em quase todas as atividades diárias, sendo caracterizada por

uma hipoativação das vias dopaminérgicas de recompensa, secundária ao processo neurodegenerativo da DP (LOAS et al., 2014). Alguns estudos apontam que a anedonia pode ocorrer independente da depressão em pacientes com DP, e que talvez esteja mais correlacionada à apatia e à fadiga (SKORVANEK et al., 2015; NAGAYAMA et al., 2017; HUSAIN; ROISER, 2018; MURAKAMI et al., 2020).

De maneira semelhante ao que ocorre na clínica, alguns modelos animais de DP reproduzem comportamentos do tipo-depressivo dissociados da anedonia. É o caso do estudo de Matheus et al. (2015), que demonstraram uma dissociação temporal dos comportamentos associados a anedonia e a depressão em ratos machos submetidos à administração de 6-OHDA no estriado dorsolateral. Após 21 dias, os animais apresentam comportamento do tipo-depressivo no TNF, mas sem a permanência do comportamento tipo-anedônico observado no TBS e TPS apenas no dia 7 após a cirurgia estereotáxica. Essa dissociação é atribuída a uma diferença na sensibilidade à DA no estriado (dia 7) e no córtex pré-frontal (dia 21).

Tanto a via VTA-estriado (núcleo *accumbens*) quanto a via VTA-córtex pré-frontal estão envolvidas nas respostas anedônicas. Recompensas primárias (como o consumo de sacarose) aumentam a liberação de DA principalmente no núcleo *accumbens*, enquanto recompensas secundárias envolvem o aumento de DA também no córtex pré-frontal. Na depressão, ambos os processos podem estar envolvidos, seja na diminuição da sensação de recompensa (redução na sinalização estriatal) ou na incapacidade de distinguir o valor do estímulo (redução na sinalização cortical) (GORWOOD, 2008).

No caso do modelo MPTP intranasal em ratos (0,1 mg/narina), observa-se inicialmente uma redução de DA no bulbo olfatório e no córtex pré-frontal, mas não no estriado ou hipocampo de machos (7 dias após a administração) (PREDIGER et al., 2006). Essa variação temporal no acometimento das estruturas que estão envolvidas nos comportamentos depressivos e anedônicos associada a uma dose baixa, como a utilizada no presente trabalho, poderia explicar a discordância entre os resultados encontrados em comparação com o estudo de Schamne et al. (2018). Além disso, observamos a depleção de DA no estriado 16 dias após a administração, mas o TPS e o TBS foram realizados no dia 10 e 12, respectivamente. Não podemos aferir sobre o dia 12, tampouco sobre a sensibilidade à DA no estriado neste dia ou no dia 16. De forma especulativa, acreditamos que a administração intranasal de MPTP (0,5 mg/narina) não modificou os circuitos de recompensa envolvidos nas respostas de anedonia nos dias citados, mas foi capaz de induzir alterações em estruturas que compõem o sistema

mesocorticolímbico, exclusivamente em fêmeas, refletido no comportamento tipo-depressivo no TSC.

Essa hipótese é reforçada pela observação do comportamento tipo-ansioso no LCE (dia 12) e no TCA (dia 15) após a administração intranasal de MPTP (0,5 mg/narina), que também ocorre seletivamente em camundongos fêmeas. Ambos os testes avaliam uma tarefa de escolha entre “risco e evasão” que depende da aproximação e exploração de áreas potencialmente perigosas para os roedores. As áreas mais claras e expostas, como o centro do campo aberto ou os braços abertos do LCE representam as regiões mais aversivas; enquanto a periferia do campo aberto e os braços fechados do LCE são referidos como áreas mais seguras. Os roedores naturalmente apresentam a curiosidade inata de explorar áreas novas, ao mesmo tempo que demonstram uma tendência de evitar as regiões mais expostas (PELLOW et al., 1985; WALF; FRYE, 2007; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Várias evidências apontam que a inibição farmacológica de D_{1R} na amígdala, no núcleo *accumbens* e na VTA de roedores aumenta a exploração dos braços abertos no LCE e o tempo de permanência no centro no TCA (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015; XIE et al., 2022). Ou seja, a sinalização de DA através de D_{1R} tem um papel crítico nas respostas ansiosas mediada pela via mesolímbica. O circuito entre amígdala, núcleo *accumbens*, córtex pré-frontal e hipocampo ventral determina a valência emocional de eventos e pode conduzir para mudanças comportamentais motivadas por ansiedade ou por recompensa (CALHOON; TYE, 2015).

No LCE, por exemplo, a exploração dos braços abertos e o medo inato de roedores pela altura pode levar à ativação dessa via e conduzir comportamentos ansiogênicos. Quando o animal foge da área aversiva e entra nos braços fechados ocorre um processamento de recompensa, o que pode ser um incentivo para permanecer nos braços fechados (XIE et al., 2022). Foi demonstrado que as projeções dopaminérgicas da VTA para o núcleo *accumbens* exibem plasticidade sináptica apenas após o estímulo de recompensa, enquanto as células dopaminérgicas que visam o córtex pré-frontal medial são sensíveis apenas à estimulação aversiva (CALHOON; TYE, 2015; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). O contraste do papel da plasticidade nos circuitos de recompensa e na estimulação aversiva podem determinar o comportamento desses animais.

Ressaltamos que mesmo apresentando um comportamento do tipo-ansioso no LCE 12 dias após a administração intranasal de MPTP, as fêmeas apresentam um comportamento tipo-hedônico no mesmo período. Assumindo a semelhança das estruturas envolvidas nesses comportamentos e o curso temporal do modelo intranasal de MPTP, acreditamos que a progressão no modelo acomete diferentes estruturas ou, que afeta progressivamente a função de cada via. Mais estudos são necessários para entender as diferenças na sinalização de DA entre o córtex pré-frontal, amígdala e núcleo *accumbens* neste modelo.

O papel da DA nesses comportamentos não significa que ela tenha um papel independente. Um estudo que comparou a depleção seletiva ou combinada de NA, 5-HT e DA como modelos de DP em camundongos C57BL/6 machos observou que a depleção de apenas um dos neurotransmissores não foi suficiente para induzir um comportamento do tipo-anedônico ou tipo-ansioso nos animais, mas induziu um comportamento do tipo-depressivo no TSC e no TNF. Já a combinação das três toxinas utilizadas no estudo, incluindo o MPTP (ip), associada a depleção combinada das três monoaminas induziu comportamentos anedônicos e ansiosos (LI et al., 2018). Curiosamente, os autores mostraram que a depleção de duas monoaminas (sejam elas DA, 5-HT ou NA) induziu um comportamento do tipo-ansioso, mas não anedônico.

Além da redução de DA no modelo intranasal de MPTP (1 mg/narina) em camundongos, também nota-se a diminuição de NA no bulbo olfatório, estriado e hipocampo após 20 dias da administração (PREDIGER et al., 2011). O envolvimento noradrenérgico em modelos utilizando o MPTP também é evidenciado em outros estudos (ARCHER; FREDRIKSSON, 2005; PIFL et al., 2013; SAMPAIO et al., 2017). Quanto a 5-HT e seus metabólitos, não há relatos de alteração no modelo intranasal (estudos apenas com machos), mas uma diminuição de 5-HT já foi observada em modelos agudos e subagudos de administração ip (PAIN et al., 2013).

No presente estudo, o modelo de administração intranasal de MPTP não alterou os níveis de 5-HT e 5 HIAA no estriado, tampouco no hipocampo de machos ou fêmeas. Entretanto, observamos que somente as fêmeas apresentaram um aumento na razão 5 HIAA/5-HT no hipocampo após 16 dias da administração intranasal de MPTP. Por definição, a razão entre o metabólito e o neurotransmissor reflete a utilização da monoamina, neste caso, o *turnover* de 5-HT. O 5 HIAA é produzido no interior dos neurônios através da atividade da MAO (principalmente do tipo A), após o vazamento de 5-HT das vesículas de armazenamento ou

devido a recaptação após a liberação da monoaminas na fenda sináptica. Um aumento no *turnover* de 5-HT pode refletir algum prejuízo nesse processo: desde aumento da síntese intracelular, disparo neuronal aumentado, capacidade reduzida de captação vesicular e consequente aumento do metabolismo intraneuronal (GRAHAME-SMITH, 1973; BARTON et al., 2008). Esses resultados precisam ser estudados com cautela, pois o MPTP pode afetar a atividade da MAO e indiretamente o *turnover*.

Sugere-se que o dimorfismo sexual do sistema serotoninérgico pode ter um papel importante no modelo. Alguns artigos mostram que as fêmeas apresentam maior síntese de 5-HT, o que é associado com a maior concentração de triptofano comparado aos machos (SONGTACHALERT et al., 2018). As mulheres em geral apresentam mais receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT_{1AR}) e menor potencial de ligação da monoaminas com seu transportador do que homens em diversas regiões encefálicas, especialmente no hipocampo (JOVANOVIC et al., 2007).

A interação entre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico é bem conhecida. A DA pode modular a atividade neuronal de 5-HT através de D_{2R} expressos no núcleo da rafe, por exemplo (PETERS; CHEER; TONINI, 2021). Aliás, um prejuízo na transmissão dopaminérgica poderia afetar a transmissão serotoninérgica. A desregulação do sistema serotoninérgico tem um papel importante na fisiopatologia da depressão e ansiedade na população em geral, e também na DP. Em um estudo com pacientes depressivos sem a DP, Barton et al. (2008) observaram aumento do *turnover* de 5-HT em pacientes não medicados. Em relação a DP, alguns estudos têm mostrado a correlação entre degeneração serotoninérgica com os sintomas depressivos relatados pelos pacientes. Corroborando essa hipótese, estudos clínicos já indicaram redução de 5 HIAA no líquido cerebrospinal de pacientes com DP (FONTOURA et al., 2017; MENDONÇA et al., 2020).

Assim como se observa uma maior prevalência de sintomas depressivos e ansiosos em pacientes do sexo feminino diagnosticados com DP, no presente estudo apenas camundongos fêmeas reproduziram esses comportamentos no modelo animal de administração intranasal de MPTP (0,5 mg/narina). Schamne et al. (2018) também observaram esse fato com a administração do dobro da dose de MPTP, além de encontrar uma redução nos níveis de BDNF e GDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo apenas em camundongos fêmeas. Os fatores neutróficos tem um papel importante na fisiopatologia de depressão e a existência de diferenças

sexuais na expressão dessas proteínas pode influenciar a sobrevivência de neurônios, a regulação da plasticidade sináptica e neurogênese (YU; CHEN, 2010; WANG et al., 2017).

Um estudo comparativo entre machos e fêmeas nocaute para o gene BDNF mostrou que a deleção de BDNF no hipocampo e no córtex induziu comportamentos do tipo-ansioso e depressivo em fêmeas, mas não em machos (MONTEGGIA et al., 2007). A sinalização de BDNF também apresenta diferenças sexuais no córtex pré-frontal e estriado de camundongos. A redução dos níveis de BDNF nessas regiões aumentam a fosforilação do receptor tirosina quinase em machos, mas não em fêmeas (HILL; VAN DEN BUUSE, 2011).

A sinalização e ativação de receptores serotoninérgicos regula positivamente os níveis de fatores neurotróficos no SNC, exercendo efeito sobre a neurogênese hipocampal (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). A deficiência do transportador de 5-HT e de BDNF em modelos animais provoca um comportamento tipo-ansiosogênico em camundongos machos, mas não em fêmeas. Essas variações indicam que a interação entre sistema serotoninérgico e BDNF modula comportamentos semelhantes à ansiedade e que esses comportamentos são dependentes do sexo, o que poderia estar implicado em nosso modelo (REN-PATTERSON et al., 2006; SONGTACHALERT et al., 2018).

Alguns estudos mostram que o estrogênio pode aumentar a expressão de BDNF no córtex pré-frontal, o que estaria relacionado as diferenças sexuais observadas na maioria dos estudos (CHAN; YE, 2017; VAIDYA et al., 2021). Com base nos efeitos do estrogênio, questiona-se o uso de camundongos fêmeas em estágios indeterminados do ciclo estral devido as influências hormonais nos estudos. Entretanto, muitos autores compreendem que o impacto do sexo é mínimo em comparação com outros fatores, como a genética e o ambiente (JÄNCKE, 2018; ALSHAMMARI, 2021). No LCE, por exemplo, o comportamento das fêmeas da linhagem C57BL/6J mantém a mesma consistência durante dias e semanas de repetição do teste (TUCKER; MCCABE, 2017). Mesmo assim, para descartar essa variável, Schamne et al. (2018) realizaram a ovariectomia de fêmeas antes da administração intranasal de MPTP (1 mg/narina) e relataram que os comportamentos observados no modelo permaneceram similares, indicando que os níveis reduzidos de estrogênio não são a principal razão para tais prejuízos.

Em conjunto, os resultados demonstrados indicam que a administração intranasal de 0,5 mg/narina de MPTP induziu comportamentos não motores semelhantes aos observados nas fases iniciais da DP, como disfunção olfatória, comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso, seletivamente em fêmeas de linhagem C57BL/6. Não foram observadas alterações na

locomoção dos animais em nenhum dos testes aplicados, o que está de acordo com trabalhos descritos anteriormente (PREDIGER et al., 2011; SCHAMNE et al., 2018). Nesse sentido, o modelo MPTP intranasal reforça a hipótese de Braak, na qual as alterações olfatórias e comportamentos semelhantes a emocionalidade antecedem a presença de sintomas motores.

A proposta de Braak está alinhada com a hipótese de vetorização olfatória e a origem periférica da DP, que são a base para o modelo intranasal de MPTP. Todavia, Braak dá enfoque para o início dos sintomas não motores no sistema nervoso entérico e autônomo (BRAAK et al., 2004). Existem muitas discussões referentes a origem intestinal da DP, mas a hipótese que mais se destaca é a inflamação periférica mediada por alterações na composição e diversidade da microbiota intestinal, que propagaria a doença a nível central (HOUSER; TANSEY, 2017; LIDDLE, 2018).

Considerando as evidências de disbiose e sua influência nos sintomas da DP, este trabalho investigou o número de bactérias cultiváveis e a abundância dos filos Eubacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria presentes no conteúdo fecal antes e após a administração de MPTP intranasal. Contrariando alguns resultados da literatura (BAARS et al., 2018; SANTOS-MARCOS et al., 2018; JAGGAR et al., 2020), não observamos diferenças sexuais na medida basal desses parâmetros. Alguns estudos também não encontraram efeitos sexuais significativos na microbiota intestinal, principalmente a nível de filo (KOVACS et al., 2011; ORG et al., 2016; MISHIMA et al., 2021). Elderman et al. (2018) compararam duas linhagens de camundongos e mostraram uma diferença na proporção de Firmicutes/Bacteroidetes entre elas, enquanto a razão não foi influenciada pelo sexo. Em seu estudo, sexo e linhagem explicaram 11,6% e 26,5% da variância na composição da microbiota, respectivamente. Tem sido sugerido que camundongos alojados nas mesmas instalações e com a mesma dieta tendem a abrigar grupos microbianos semelhantes em níveis taxonômicos mais elevados, e que a espécie e a linhagem do animal têm mais efeito sobre a composição da microbiota intestinal do que seu sexo (KOVACS et al., 2011; ELDERMAN et al., 2018).

Neste estudo, a administração intranasal de MPTP alterou a composição da microbiota intestinal, visto que após 14 dias do tratamento as fêmeas apresentaram um aumento na abundância do filo Bacteroidetes, enquanto nenhuma alteração foi observada nos camundongos machos. Essa é a primeira evidência na literatura de que a administração de MPTP pode causar modificações na microbiota de camundongos fêmeas. De forma similar, um aumento de

Bacteroidetes nas amostras fecais foi reportado em pacientes com depressão (JIANG et al., 2015), com DP (KESHAVARZIAN et al., 2015), em um modelo animal de doença de Alzheimer associado a comportamentos tipo-depressivos (ROSA et al., 2020) e em outros modelos de DP que estudam sintomas motores (KESHAVARZIAN et al., 2020). Independente da via de administração, outros estudos mostraram o efeito do MPTP (ip ou sc) sobre a composição e a diversidade da microbiota intestinal, entretanto, os resultados são variáveis e não nos permitem uma conclusão precisa (KESHAVARZIAN et al., 2020; XIE et al., 2020; JEON et al., 2021). Além disso, há trabalhos que não observam diferenças a nível de filo, apenas a nível de família (FANG et al., 2019). Apesar de existirem relatos da influência da administração de MPTP na microbiota intestinal, não é possível fazer comparações diretas com o presente trabalho, uma vez que estes estudos foram realizados apenas com animais machos. Além disso, considerando a próxima relação sistêmica dessas vias, é muito provável que a toxicidade do MPTP seja a causa direta nas mudanças descritas.

Assim, acreditamos que o modelo da administração intranasal de MPTP se encaixa no subtipo “*brain-first*” proposto por Horsager e colaboradores (2020) para designar a origem da DP. Ou seja, nosso modelo se inicia por meio da exposição ambiental da cavidade nasal e acomete progressivamente outras estruturas no SNC e no SNP, incluindo o eixo intestino-microbiota-encéfalo. Outro estudo do nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a administração intranasal de MPTP (0,5 mg/narina) em camundongos machos é capaz de atingir o SNP, induzindo dano mitocondrial em neurônios periféricos dos gânglios da raiz dorsal (ROVERSI, 2019). Devido a presença de sintomas gastrointestinais em pacientes, que incluem constipação e motilidade reduzida, associadas a estágios pré-motores da DP, avaliamos alguns parâmetros intestinais *post mortem*, *in vivo* e *in vitro*.

No presente estudo, a administração intranasal de MPTP não alterou a integridade das vilosidades duodenais em machos ou fêmeas, tampouco os níveis de DA e 5-HT e seus metabólitos no duodeno após 16 dias da administração. Diferente do que observamos, a toxicidade sistêmica mediada pela administração do MPTP via ip compromete a morfologia e prejudica a função intestinal (NATALE et al., 2008). Em outros modelos de administração do MPTP, a toxina diminuiu os níveis de DA no duodeno e no íleo, induziu a perda dopaminérgica no plexo mioentérico e submucoso e prejudicou o relaxamento no cólon (NATALE et al., 2010; SAMPATH et al., 2019; XIE et al., 2020; COLETTI et al., 2021).

Para acessar a resposta contrátil de ACh e DA no intestino delgado, foram realizadas curvas concentração-resposta em segmentos de íleo isolados dos camundongos após a administração intranasal de MPTP. Inicialmente, a resposta de 30 μM de ACh induziu um pico de contração fásica nos segmentos de íleo, seguida por breve queda da contração e de um componente tônico, o que também foi observado nas curvas concentração-resposta não cumulativas à ACh. Observamos uma diferença sexual após a contração fásica inicial induzida pela ACh, na qual as fêmeas apresentaram maior resposta de relaxamento após a administração intranasal de MPTP. Além disso, em relação as contrações tônicas dependentes de concentração, as fêmeas exibiram uma menor resposta máxima em comparação aos machos após a administração.

Secretada por neurônios colinérgicos do SNE e nervos parasimpáticos, a ACh é o principal neurotransmissor excitatório na regulação da motilidade intestinal. Entretanto, a ACh pode estimular tanto neurônios excitatórios quanto inibitórios e produzir contração e relaxamento. No duodeno (de cobaias) e no cólon (de ratos) o relaxamento mediado por ACh ocorre devido à liberação de NO decorrente da ativação de receptores nicotínicos (KODAMA et al., 2010; LIU; DU; RUDD, 2020). Os diferentes tipos de contração (fásica e tônica) mediados pela ACh consistem na diferença entre a CLM fosforilada e desfosforilada. Após a ativação do receptor, ocorre a rápida liberação de cálcio intracelular mediado por $\text{IP}_{3\text{R}}$ (fásica) seguido da ativação de PKC, envolvida na resposta tônica sustentada pela inativação da CLMF (MACARA; GIÃO-T. RICO, 1992; RATTAN, 2016). O aumento no relaxamento após a resposta de contração fásica pode estar relacionado a diversos fatores, como (1) a maior remoção do estímulo (efluxo de Ca^{2+}), (2) a um aumento da atividade da CLMF ou (3) um desequilíbrio na sinalização de segundos mensageiros para o início da contração tônica, que também poderia repercutir na diminuição de eficácia nessa resposta. A contração tônica de ACh também está associada a uma inibição da atividade espontânea de células IC (LIU; DU; RUDD, 2020), o que não pode ser descartado neste trabalho, visto que o aparecimento da resposta tônica em machos e fêmeas parece ser dependente da supressão das contrações espontâneas (ver apêndice A).

Em relação a curva de concentração resposta cumulativa à DA, observamos que os camundongos machos e fêmeas tratados com veículo apresentaram uma resposta de contração frente à DA, enquanto a administração intranasal de MPTP em fêmeas induziu uma resposta de

relaxamento, assim como uma redução da resposta máxima nos segmentos de íleo isolados. A definição do papel da sinalização de DA na motilidade ainda é um desafio, pois dependendo da região ou da espécie ela proporciona efeitos diferentes. Em ratos Wistar, ocorre uma contração mediada por D_{1R} e D_{2R} no duodeno, enquanto no jejuno e íleo há uma resposta de relaxamento dependente de receptores adrenérgicos (KIRSCHSTEIN et al., 2009). Em camundongos, os D_{1R} são responsáveis pelo controle inibitório basal do íleo (ZIZZO et al., 2010). Mas os receptores D_{2R} também parecem ter um papel importante na motilidade, visto que camundongos nocaute para este receptor apresentam diminuição do trânsito no TGI e o uso de antagonistas D_{2R} inibe o relaxamento de DA após pré-contração com carbacol no cólon (ZHI et al., 2006; AUTERI et al., 2016). Zizzo et al. (2016) demonstraram que no início da vida os camundongos apresentam uma resposta contrátil à DA mediada por D_{1R} , mas que com a progressão da idade a DA induz relaxamento mediado por D_{1R} e principalmente por D_{2R} .

É difícil supor o que de fato está ocorrendo em nosso modelo e mais investigações são necessárias. Contudo, acreditamos que a expressão de receptores dopaminérgicos e a sinalização de DA tenham papel importante. Já foi demonstrado que a administração intranasal de MPTP (1 mg/narina) altera a contração mediada por DA no íleo de ratos devido uma disfunção de D_{2R} no plexo mioentérico (SILVA, 2015). No mesmo trabalho, não há redução na expressão de TH ou nos níveis de DA no íleo, sugerindo que as alterações são independentes de uma perda dopaminérgica no intestino.

Com esses experimentos, observamos novamente uma diferença sexual na resposta ao modelo de administração intranasal de MPTP. Alguns estudos destacam um efeito modulatório do estrogênio e da progesterona na excitabilidade muscular, como um relaxamento induzido por estrogênio no íleo de ratos. Entretanto, os andrógenos também alteram a atividade contrátil no intestino, aumentando a sensibilização de Ca^{2+} em músculos do íleo e cólon (HOUDEAU, 2016). Neste experimento, não observamos modificações na contratilidade entre machos e fêmeas tratados com veículo, com exceção do relaxamento de DA após pré-contração de ACh (apenas a maior concentração). Dessa forma, é mais plausível sugerir que a diferença sexual na periferia seja consequência de alterações centrais, que também determinam a discrepância entre os sexos nos comportamentos.

No protocolo comportamental, buscamos avaliar a motilidade fecal através do TMF nos dias 7 e 13 após a infusão intranasal de MPTP. A produção fecal alterada reflete a função colônica e o trânsito gastrointestinal (MARKS et al., 2013). Apesar das modificações na

resposta de contração com segmentos coletados no dia 16, não encontramos diferenças entre os grupos em relação ao número de bolos fecais ou ao peso das amostras coletadas no TMF. No modelo de administração ip, o MPTP prejudicou a resposta de relaxamento no cólon devido à neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos no SNE; mas os autores também não encontraram modificações no trânsito intestinal dos animais (ANDERSON et al., 2007).

A disfunção gastrointestinal é uma característica não motora marcante na DP e vai muito além de constipação e motilidade reduzida, pois abrange todo o TGI (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). No entanto, ainda não está claro se está associada à deficiência dopaminérgica central ou periférica. Em modelos de degeneração dopaminérgica central, as alterações neuroquímicas que afetam o SNE são dependentes de modificações no núcleo dorsal do nervo vago (ANNERINO et al., 2012; FORNAI et al., 2016). O nervo vago tem comunicação direta com o intestino através de fibras parassimpáticas e tem sido proposto que ele desempenha um papel importante na regulação de respostas inflamatórias, visto que a α -sinucleína pode ser transportada como um príon por ele (KIM et al., 2019). Lai et al. (2018) mostraram que após a administração sc de MPTP há uma redução inicial na expressão de α -sinucleína no íleo de camundongos, e após 2 semanas ocorre um aumento rebote correspondente à produção de citocinas inflamatórias, sugerindo que o aumento no nível de α -sinucleína esteja relacionado ao início da inflamação intestinal. É provável que mesmo um simples dano à via nigroestriatal, na ausência de toxicidade periférica, possa contribuir para a produção de uma disfunção gastrointestinal (BLANDINI et al., 2009).

A toxicidade do MPTP é atribuída principalmente a disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo, em conjunto a apoptose dos neurônios dopaminérgicos. No bulbo olfatório, a atividade do complexo I mitocondrial é reduzida após 24 horas da infusão de MPTP (1 mg/narina), há um aumento na produção de EROs e na expressão de α -sinucleína no estriado após 14 dias (PREDIGER et al., 2011). Além disso, os efeitos do MPTP intranasal também são mediados pela ativação microglial, recrutamento de células imunes e um processo inflamatório (ROVERSI, 2019). Recentemente, foi demonstrado que a inflamação nasal crônica através da administração de LPS em camundongos C57BL/6 ocasionou mudanças na composição da microbiota intestinal dependentes do sexo, associado a uma ausência de inflamação sistêmica (MISHIMA et al., 2021).

Ao todo, essas evidências e os resultados obtidos neste trabalho suportam a hipótese que o MPTP intranasal induza alterações progressivas no SNC, por meio de diversos processos celulares, incluindo inflamatório. Isso reflete diretamente nos comportamentos e na transmissão dopaminérgica, assim como periféricamente a nível intestinal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo reforçam o potencial do modelo MPTP intranasal nos estudos de comportamentos não motores associados a DP e a maior susceptibilidade de camundongos fêmeas da linhagem C57bl/6 aos sintomas emocionais. Além disso, demonstramos pela primeira vez que o modelo de administração intranasal de MPTP induz modificações na composição da microbiota e na resposta a DA e a ACh nos segmentos de íleo de camundongos fêmeas.

Ainda faltam modelos animais adequados que possam replicar integralmente todas as características patológicas e comportamentais da DP. Mais uma vez ressaltamos que para obter um avanço significativo na área é imprescindível a inclusão do sexo como uma variável. Ignorar o sexo pode levar a um viés na pesquisa básica que reflete na sua translação para a clínica, e consequentemente no diagnóstico e tratamento de doenças. Os dados aqui presentes, juntamente com resultados obtidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa, ampliam a importância do modelo de MPTP intranasal para investigar as diferenças sexuais que ocorrem na DP.

REFERÊNCIAS

AARSLAND, D. et al. Depression in Parkinson disease—epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology** 2011 **8:1**, v. 8, n. 1, p. 35–47, 26 dez. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrneuro.2011.189>>. Acesso em: 9 set. 2021.

ALIFIROVA, V. et al. Correlation Between Emotional-Affective Disorders and Gut Microbiota Composition in Patients with Parkinson's Disease. **Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk**, v. 71, n. 6, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29298003/>>. Acesso em: 10 set. 2021.

ALSHAMMARI, T. K. Sexual dimorphism in pre-clinical studies of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 105, p. 110120, 8 mar. 2021.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). 2013. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=JivBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT18&dq=Diagnostic+and+Statistical+Manual+of+Mental+Disorders+\(DSM-5\)&ots=ceSK71KEv7&sig=Nj172wfbNDHQ23FsWY-EYIXp2CE](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=JivBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT18&dq=Diagnostic+and+Statistical+Manual+of+Mental+Disorders+(DSM-5)&ots=ceSK71KEv7&sig=Nj172wfbNDHQ23FsWY-EYIXp2CE)>. Acesso em: 22 fev. 2019.

ANDERSON, G. et al. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 207, n. 1, p. 4–12, 1 set. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488607002087?via%3Dihub#fig1>>. Acesso em: 8 out. 2019.

ANNERINO, D. M. et al. Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. **Acta Neuropathologica**, v. 124, n. 5, p. 665–680, nov. 2012.

ANTZOULATOS, E. et al. Sex differences in motor behavior in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 4, p. 466–472, 1

jun. 2010.

ARCHER, T.; FREDRIKSSON, A. Influence of noradrenaline denervation on MPTP-induced deficits in mice. **Journal of Neural Transmission** 2005 113:9, v. 113, n. 9, p. 1119–1129, 16 dez. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-005-0402-5>>. Acesso em: 6 nov. 2021.

ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 11 fev. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2760741>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson’s disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442216302307>>. Acesso em: 30 set. 2019.

AUTERI, M. et al. Dopamine induces inhibitory effects on the circular muscle contractility of mouse distal colon via D1- and D2-like receptors. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 395–404, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13105-017-0566-0>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

AVSAR, O. Is testosterone perspective available for neurodegenerative diseases? v. 8, n. 5, p. 1482–1489, 16 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.jneuropsychiatry.org/peer-review/is-testosterone-perspective-available-for-neurodegenerative-diseases-12747.html>>. Acesso em: 23 set. 2021.

BAARS, A. et al. Sex differences in lipid metabolism are affected by presence of the gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2018.

BAI, F. et al. Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 70, n. 2–3, p. 187–192, 1 out. 2001.

BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365–373, 2015.

BALDINI, F. et al. Parkinson's disease-associated alterations of the gut microbiome predict disease-relevant changes in metabolic functions. **BMC Biology**, v. 18, n. 1, 9 jun. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7285525/>. Acesso em: 24 set. 2021.

BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, v. 27, n. 1, p. 27–42, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ene.14108>. Acesso em: 30 jul. 2021.

BANG, Y.; LIM, J.; CHOI, H. J. Recent advances in the pathology of prodromal non-motor symptoms olfactory deficit and depression in Parkinson's disease: clues to early diagnosis and effective treatment. **Archives of Pharmacal Research** 2021 44:6, v. 44, n. 6, p. 588–604, 19 jun. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-021-01337-3>. Acesso em: 30 ago. 2021.

BAQUET, Z. C.; BICKFORD, P. C.; JONES, K. R. Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Required for the Establishment of the Proper Number of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra Pars Compacta. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 26, p. 6251–6259, 29 jun. 2005. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/25/26/6251>. Acesso em: 9 set. 2021.

BARICHELLA, M. et al. Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease. **Neurology**, v. 87, n. 12, p. 1274–1280, 20 set. 2016. Disponível em: <https://n.neurology.org/content/87/12/1274>. Acesso em: 19 set. 2021.

BARNUM, C. J.; TANSEY, M. G. Neuroinflammation and Non-motor Symptoms: The Dark Passenger of Parkinson's Disease? **Current Neurology and Neuroscience Reports** 2012 12:4, v. 12, n. 4, p. 350–358, 12 maio 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11910-012-0283-6>. Acesso em: 17 ago. 2021.

BARTON, D. A. et al. Elevated brain serotonin turnover in patients with depression: effect of genotype and therapy. **Archives of general psychiatry**, v. 65, n. 1, p. 38–46, jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18180427/>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

BEAULIEU, J.; GAINETDINOV, R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21303898/>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

BELL, J. S. et al. Invited Review: From nose to gut – the role of the microbiome in neurological disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 45, n. 3, p. 195–215, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nan.12520>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

BERG, D. et al. Prodromal Parkinson disease subtypes — key to understanding heterogeneity. **Nature Reviews Neurology** 2021 17:6, v. 17, n. 6, p. 349–361, 20 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41582-021-00486-9>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

BLANDINI, F. et al. Functional and neurochemical changes of the gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson’s disease. **Neuroscience Letters**, v. 467, n. 3, p. 203–207, 31 dez. 2009.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T. Animal models of Parkinson’s disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156–1166, 1 abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x>>. Acesso em: 8 out. 2019.

BOMASANG-LAYNO, E. et al. Antidepressive treatments for Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 21, n. 8, p. 833–842, 1 ago. 2015.

BONATO, J. M. et al. Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson’s disease in rats.

Experimental Neurology, v. 300, p. 188–200, 1 fev. 2018.

BONNET, A.-M. Involvement of Non-Dopaminergic Pathways in Parkinson's Disease. **CNS Drugs** **2000** **13:5**, v. 13, n. 5, p. 351–364, 14 set. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2165/00023210-200013050-00005>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 1 mar. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458002000659?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 set. 2019.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, 24 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338272>>. Acesso em: 2 out. 2019.

BROWN, R. G. et al. Depression and anxiety related subtypes in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 803–809, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://jnnp.bmj.com/content/82/7/803>>. Acesso em: 13 set. 2021.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience** **2015** **18:10**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 25 set. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.4101>>. Acesso em: 12 set. 2021.

CAMILLERI, M. The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1516, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35484441/>>. Acesso em: 13 set. 2021.

CAREY, G. et al. Neuroimaging of Anxiety in Parkinson's Disease: A Systematic Review. **Movement Disorders**, v. 36, n. 2, p. 327–339, 1 fev. 2021.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-

Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature** 1957 **180:4596**, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, 1957. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/1801200a0>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

CARR, W. J. et al. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 90, n. 9, p. 821–8, set. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/965530>>. Acesso em: 24 out. 2019.

CASTAGNÉ, V. et al. Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, n. SUPPL.55, p. 1–14, 2011.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 3, p. 319–379, 1 jan. 1993.

CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. **Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference?** **Journal of Parkinson's Disease** IOS Press, , 2019. .

CHAN, C. B.; YE, K. Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 328–335, 2 jan. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jnr.23863>>. Acesso em: 6 nov. 2021.

CHARVIN, D. et al. Therapeutic strategies for Parkinson disease: beyond dopaminergic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery** 2018 **17:11**, v. 17, n. 11, p. 804–822, 28 set. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd.2018.136>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

CHEN, Y. et al. Combined effects of olfactory dysfunction and chronic stress on anxiety- and depressive- like behaviors in mice. **Neuroscience Letters**, v. 692, p. 143–149, 23 jan. 2019.

COLETTI, E. et al. Contractile dysfunction and nitrergic dysregulation in small intestine of a

primate model of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 10 dez. 2019.

COLETTI, E. et al. Dysregulation of epithelial ion transport and neurochemical changes in the colon of a parkinsonian primate. **NPJ Parkinson's Disease**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7820491/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

COLUCCI, M. et al. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. **Autonomic Neuroscience**, v. 169, n. 2, p. 77–86, 16 ago. 2012.

COSTA, A. P. R. et al. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 150–155, 1 ago. 2013.

CRYAN, J. F. et al. The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019.

DAHODWALA, N. et al. Sex disparities in access to caregiving in Parkinson disease. **Neurology**, v. 90, n. 1, p. e48–e54, 2 jan. 2018. Disponível em: <https://n.neurology.org/content/90/1/e48>. Acesso em: 1 ago. 2021.

DEACON, R. M. Assessing nest building in mice. **Nature Protocols** 2006 1:3, v. 1, n. 3, p. 1117–1119, 24 ago. 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.170>. Acesso em: 25 jul. 2021.

DISSANAYAKA, N. N. W. et al. The clinical spectrum of anxiety in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 29, n. 8, p. 967–975, 2014.

DISSANAYAKA, N. N. W. et al. Characteristics and Treatment of Anxiety Disorders in Parkinson's Disease. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 2, n. 2, p. 155, 1 jun. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC6183244/>. Acesso em: 6 ago. 2021.

DISSANAYAKA, N. N. W. et al. Disease-specific anxiety symptomatology in Parkinson's

disease. **International Psychogeriatrics**, v. 28, n. 7, p. 1153–1163, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/international-psychogeriatrics/article/diseasespecific-anxiety-symptomatology-in-parkinsons-disease/F96A52941C9D7C0EB1A3E78048A41518>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 30 jan. 2007. Disponível em: <<https://n.neurology.org/content/68/5/384>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

DOS SANTOS, E. U. D. et al. The influence of SLC6A3 and DRD2 polymorphisms on levodopa-therapy in patients with sporadic Parkinson's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 206–212, 10 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jpp/article/71/2/206/6122043>>. Acesso em: 23 set. 2021.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology** 2012 **8:6**, v. 8, n. 6, p. 329–339, 15 maio 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrneurol.2012.80>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

DUMAN, R. S. et al. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, v. 22, n. 3, p. 238–249, 1 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.4050>>. Acesso em: 29 mar. 2019.

ECKELI, A. L.; DACH, F.; RODRIGUES, A. L. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. **Neuroreport**, v. 11, n. 9, p. 1839–43, 26 jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884029>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. **Klinische Wochenschrift**, v. 38, n. 24, p. 1236–1239, dez. 1960. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13726012/>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

ELDERMAN, M. et al. Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. **Biology of Sex Differences**, v. 9, n. 1, p. 26, 18 jun. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6006852/>. Acesso em: 8 nov. 2021.

ELKOUZI, A. et al. Emerging therapies in Parkinson disease — repurposed drugs and new approaches. **Nature reviews. Neurology**, v. 15, n. 4, p. 204, 1 abr. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC7758837/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

ERAUSQUIN, G. A. de et al. The chronic neuropsychiatric sequelae of COVID-19: The need for a prospective study of viral impact on brain functioning. **Alzheimer's & Dementia**, v. 17, n. 6, p. 1056–1065, 1 jun. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/alz.12255>>. Acesso em: 18 out. 2021.

FANG, X. et al. Neuroprotective effects of an engineered commensal bacterium in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine Parkinson disease mouse model via producing glucagon-like peptide-1. **Journal of Neurochemistry**, v. 150, n. 4, p. 441–452, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.14694>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

FELIX-ORTIZ, A. et al. Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 321, p. 197–209, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26204817/>>. Acesso em: 12 set. 2021.

FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4117–4120, 1 jul. 2005. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. Acesso em: 1 nov. 2020.

FILALI, M.; LALONDE, R. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1292, p. 93–99, 25 set. 2009.

FINOTELLO, F.; MASTRORILLI, E.; DI CAMILLO, B. Measuring the diversity of the human

microbiota with targeted next-generation sequencing. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 679–692, 20 jul. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bib/article/19/4/679/2871295>>. Acesso em: 24 set. 2021.

FIRESTEIN, S. How the olfactory system makes sense of scents. **Nature** 2001 **413:6852**, v. 413, n. 6852, p. 211–218, 13 set. 2001. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35093026>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

FONTOURA, J. L. et al. Depression in Parkinson's Disease: The Contribution from Animal Studies. **Parkinson's Disease**, v. 2017, 2017.

FORBES, E. J. et al. Defining Atypical Anxiety in Parkinson's Disease. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 8, n. 4, p. 571–581, 1 maio 2021.

FORNAI, M. et al. Enteric Dysfunctions in Experimental Parkinson's Disease: Alterations of Excitatory Cholinergic Neurotransmission Regulating Colonic Motility in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 2, p. 434–444, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://jpet.aspetjournals.org/content/356/2/434>>. Acesso em: 19 set. 2021.

FRISINA, P. G.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L. S. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 15, n. 2, p. 144–148, 1 fev. 2009.

FULLARD, M. E. et al. Olfactory impairment predicts cognitive decline in early Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 25, p. 45–51, 1 abr. 2016.

FÜLLING, C.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... **Neuron**, v. 101, n. 6, p. 998–1002, 20 mar. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30897366>>. Acesso em: 7 out. 2019.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews**

Gastroenterology & Hepatology 2012 9:5, v. 9, n. 5, p. 286–294, 6 mar. 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.32>>. Acesso em: 18 set. 2021.

GAZERANI, P. Probiotics for Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, 1 set. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6747430/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444430/)>. Acesso em: 19 set. 2021.

GE, X. et al. Potential role of fecal microbiota from patients with slow transit constipation in the regulation of gastrointestinal motility. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

GENEROSO, J. S. et al. The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 293–305, 10 jul. 2020. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/rbp/a/vcVptJTbDB4M4CdscTTLGFj/>>. Acesso em: 14 set. 2021.

GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, set. 2011. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3234454/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21444454/)>. Acesso em: 30 jul. 2021.

GORWOOD, P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 291, 2008. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3181880/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/181880/)>. Acesso em: 6 nov. 2021.

GRAHAME-SMITH, D. G. DOES THE TOTAL TURNOVER OF BRAIN 5-HT REFLECT THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF 5-HT IN BRAIN? **Serotonin and Behavior**, p. 5–7, 1 jan. 1973.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B.; JOHNSON, A.; GRUNDY, D. Gastrointestinal Physiology and Function. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 239, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28176047/>>. Acesso em: 13 set. 2021.

GUBELLINI, P.; KACHIDIAN, P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. **Revue Neurologique**, v. 171, n. 11, p. 750–761, nov. 2015. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0035378715008048>>. Acesso em: 8 out. 2019.

GUDELSKY, G. A. Tuberoinfundibular dopamine neurons and the regulation of prolactin secretion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 6, n. 1, p. 3–16, 1 jan. 1981.

GUERIN, D. et al. Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. **Behavioral neuroscience**, v. 122, n. 4, p. 816, ago. 2008. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2562590/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18811111/)>. Acesso em: 30 ago. 2021.

GUO, X. et al. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 367–373, nov. 2008.

HALL, J. E.; C., G. A. **Tratado de fisiologia médica**. 13.ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HILL, R. A.; VAN DEN BUUSE, M. Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. **Brain Research**, v. 1384, p. 51–60, 12 abr. 2011.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–21, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643025>>. Acesso em: 7 abr. 2019.

HIRSCH, E. C.; STANDAERT, D. G. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 36, n. 1, p. 16–24, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mds.28075>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

HÖGLINGER, G. U. et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. **Nature Neuroscience** 2004 7:7, v. 7, n. 7, p. 726–735, 13 jun. 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn1265>>. Acesso em: 9 set. 2021.

HORSAGER, J. et al. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. **Brain : a journal of neurology**, v. 143, n. 10, p. 3077–3088, 1 out. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32830221/>>. Acesso em: 5 ago. 2021.

HORWITZ, A. Anxiety: A short history. 2013. Disponível em: <<https://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=zecEAQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT13&ots=GaHsf5DBI&sig=Dzv-eNn8hkMyZA54fbKi5HYwV8I>>. Acesso em: 10 set. 2021.

HOUDEAU, E. Sex Differences in Gastrointestinal Physiology and Diseases: From Endogenous Sex Hormones to Environmental Endocrine Disruptor Agents. In: **Sex Differences In Physiology**. [s.l.] Academic Press, 2016. p. 125–143.

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. 3, 11 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41531-016-0002-0>>. Acesso em: 4 out. 2019.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, n. 4, p. 261–275, 1 dez. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010210027793>>. Acesso em: 11 maio. 2019.

HUSAIN, M.; ROISER, J. P. Neuroscience of apathy and anhedonia: a transdiagnostic approach. **Nature Reviews Neuroscience** 2018 19:8, v. 19, n. 8, p. 470–484, 26 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41583-018-0029-9>>. Acesso em: 25 out. 2021.

IARKOV, A. et al. Strategies for the Treatment of Parkinson's Disease: Beyond Dopamine. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 0, p. 4, 31 jan. 2020.

IJZENDOORN, S. C. D. van; DERKINDEREN, P. The Intestinal Barrier in Parkinson's

Disease: Current State of Knowledge. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 9, n. Suppl 2, p. S323, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6839484/>. Acesso em: 13 set. 2021.

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain research reviews**, v. 56, n. 1, p. 27, nov. 2007. Disponível em: </pmc/articles/PMC2134972/>. Acesso em: 16 ago. 2021.

ILKIW, J. L.; LIMA, M. M. S. Perspectives for the association between olfactory disturbances and depression in Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 4, p. 591, 1 abr. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6352594/>. Acesso em: 4 set. 2021.

IMAMURA, K. et al. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. **Acta Neuropathologica** **2003 106:6**, v. 106, n. 6, p. 518–526, 25 set. 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-003-0766-2>. Acesso em: 9 set. 2021.

JAGGAR, M. et al. **You've got male: Sex and the microbiota-gut-brain axis across the lifespan** **Frontiers in Neuroendocrinology** Academic Press Inc., , 1 jan. 2020. .

JÄNCKE, L. Sex/gender differences in cognition, neurophysiology, and neuroanatomy. **F1000Research**, v. 7, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6013760/>. Acesso em: 7 nov. 2021.

JENNINGS, D. et al. Imaging prodromal Parkinson disease. **Neurology**, v. 83, n. 19, p. 1739–1746, 4 nov. 2014. Disponível em: <https://n.neurology.org/content/83/19/1739>. Acesso em: 6 ago. 2021.

JEON, H. et al. Korean red ginseng suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced inflammation in the substantia nigra and colon. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 94, p. 410–423, 1 maio 2021.

JIANG, H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 48, p. 186–194, 1 ago. 2015.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139–146, 30 ago. 2014.

JOERS, V. et al. Microglia, inflammation and gut microbiota responses in a progressive monkey model of Parkinson's disease: A case series. **Neurobiology of Disease**, v. 144, p. 105027, 1 out. 2020.

JOVANOVIC, H. et al. Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET ☆. 2007. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ynimg>. Acesso em: 8 nov. 2021.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 29 ago. 2015. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(14\)61393-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(14)61393-3/fulltext)>. Acesso em: 30 set. 2019.

KARA, N. Z.; STUKALIN, Y.; EINAT, H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 84, p. 1–11, 1 jan. 2018.

KASS, M. D. et al. Differences in peripheral sensory input to the olfactory bulb between male and female mice. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 26 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep45851>>. Acesso em: 19 out. 2021.

KESHAVARZIAN, A. et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 10, p. 1351–1360, 1 set. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.26307>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

KESHAVARZIAN, A. et al. The gut microbiome in Parkinson's disease: A culprit or a bystander? **Progress in Brain Research**, v. 252, p. 357–450, 1 jan. 2020.

KESSEL, S. P. van et al. Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <pmc/articles/PMC6338741/>. Acesso em: 24 set. 2021.

KHAN, A. U. et al. Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1486837>, v. 129, n. 1, p. 55–93, 2 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00207454.2018.1486837>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

KHATRI, D. K. et al. Anxiety: An ignored aspect of Parkinson's disease lacking attention. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110776, 1 nov. 2020.

KIM, S. et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 103, n. 4, p. 627- 641.e7, 21 ago. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31255487>>. Acesso em: 5 out. 2019.

KIRSCHSTEIN, T. et al. Dopamine induces contraction in the proximal, but relaxation in the distal rat isolated small intestine. **Neuroscience Letters**, v. 465, n. 1, p. 21–26, 3 set. 2009. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/MED/19733212>>. Acesso em: 19 set. 2021.

KISH, S. J. et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. **Brain**, v. 131, n. 1, p. 120–131, 1 jan. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/131/1/120/341619>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

KLINGELHOEFER, L.; REICHMANN, H. Pathogenesis of Parkinson disease—the gut–brain axis and environmental factors. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 11, p. 625–636, 27 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26503923>>. Acesso em: 5 out. 2019.

KODAMA, Y. et al. Properties of acetylcholine-induced relaxation of smooth muscle isolated

from the proximal colon of the guinea-pig. **J. Smooth Muscle Res**, v. 46, n. 4, p. 185–200, 2010.

KOSTIĆ, V. et al. Regional patterns of brain tissue loss associated with depression in Parkinson disease. **Neurology**, v. 75, n. 10, p. 857–863, 7 set. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20686125/>>. Acesso em: 9 set. 2021.

KOVACS, A. et al. Genotype Is a Stronger Determinant than Sex of the Mouse Gut Microbiota. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 423–428, 23 fev. 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-010-9787-2>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Methods in Molecular Biology**, v. 1916, p. 99–103, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8994-2_9>. Acesso em: 14 set. 2021.

KUO, I. Y.; EHRLICH, B. E. Signaling in Muscle Contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/>>. Acesso em: 16 set. 2021.

LAI, F. et al. Intestinal Pathology and Gut Microbiota Alterations in a Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 10, p. 1986–1999, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-018-2620-x>>. Acesso em: 12 nov. 2021.

LANDAU, S. et al. Anxiety and anxious-depression in Parkinson's disease over a 4-year period: a latent transition analysis. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 3, p. 657–667, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/psychological-medicine/article/anxiety-and-anxiousdepression-in-parkinsons-disease-over-a-4year-period-a-latent-transition-analysis/BA0D266F9664FDAF936FD931DD6D180B>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

LANGSTON, J. W. The MPTP Story. **Journal of Parkinson's disease**, v. 7, n. s1, p. S11–S19, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28282815>>. Acesso em: 8 out. 2019.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. **BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 104

LEE, W.; KHAN, A.; CURLEY, J. P. Major urinary protein levels are associated with social status and context in mouse social hierarchies. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1863, 27 set. 2017. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspb.2017.1570>>. Acesso em: 19 out. 2021.

LEENTJENS, A. F. G. The Role of Dopamine Agonists in the Treatment of Depression in Patients with Parkinson's Disease. **Drugs** 2011 71:3, v. 71, n. 3, p. 273–286, 18 nov. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2165/11585380-000000000-00000>>. Acesso em: 19 set. 2021.

LEGGIO, G. M. et al. Dopamine D3 receptor as a new pharmacological target for the treatment of depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 719, n. 1–3, p. 25–33, 5 nov. 2013.

LI, Y. et al. Investigation of Behavioral Dysfunctions Induced by Monoamine Depletions in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 0, p. 241, 8 ago. 2018.

LI, Z. et al. Major Depressive Disorder: Advances in Neuroscience Research and Translational Applications. **Neuroscience Bulletin** 2021 37:6, v. 37, n. 6, p. 863–880, 13 fev. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-021-00638-3>>. Acesso em: 7 set. 2021.

LIDDLE, R. A. **Parkinson's disease from the gut**Brain ResearchElsevier B.V., , 15 ago.

2018. .

LINDQVIST, D. et al. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease--associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. **Brain, behavior, and immunity**, v. 33, p. 183–189, out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23911592/>>. Acesso em: 9 set. 2021.

LINTEL, H. et al. Mood Disorders and Anxiety in Parkinson's Disease: Current Concepts. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 34, n. 4, p. 280–288, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34219518/>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

LIU, J. Y. H.; DU, P.; RUDD, J. A. Acetylcholine exerts inhibitory and excitatory actions on mouse ileal pacemaker activity: Role of muscarinic versus nicotinic receptors. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 319, n. 1, p. G97–G107, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.00003.2020>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

LIU, Z. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 2525967, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785371>>. Acesso em: 29 maio. 2019.

LLEDO, P.-M.; GHEUSI, G.; VINCENT, J.-D. Information Processing in the Mammalian Olfactory System. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2004>, v. 85, n. 1, p. 281–317, jan. 2005. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00008.2004>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

LOAS, G. et al. Hedonic Deficits in Parkinson's Disease: Is Consummatory Anhedonia Specific? **Frontiers in Neurology**, v. 0, p. 24, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin. **Journal Biological Chemistry**, v.

193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: <[http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry 1951.pdf](http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry%201951.pdf)>. Acesso em: 25 jan. 2018.

MACARA, B.; GIÃO-T. RICO, J. M. Effect of Ca²⁺ modulators on acetylcholine-induced phasic and tonic contractions and A23187-induced contractions in ileal longitudinal muscle and IP₃ production. **European Journal of Pharmacology**, v. 218, n. 1, p. 27–33, 21 jul. 1992.

MARKS, L. et al. An evaluation of the non-invasive faecal pellet assessment method as an early drug discovery screen for gastrointestinal liability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 1, p. 123–136, jul. 2013.

MASATO, A. et al. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. **Molecular Neurodegeneration** 2019 14:1, v. 14, n. 1, p. 1–21, 20 ago. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/articles/10.1186/s13024-019-0332-6>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

MATHEUS, F. C. et al. Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. **Molecular Neurobiology** 2015 53:6, v. 53, n. 6, p. 3891–3899, 12 jul. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-015-9330-z>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

MATRISCIANO, F. et al. Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 3, p. 247–254, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.014>>.

MATSUI, H. et al. Depression in Parkinson's disease. Diffusion tensor imaging study. **Journal of neurology**, v. 254, n. 9, p. 1170–1173, set. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17710361/>>. Acesso em: 9 set. 2021.

MAYER, E. A. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. **Nature Reviews Neuroscience** 2011 12:8, v. 12, n. 8, p. 453–466, 13 jul. 2011. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/nrn3071>>. Acesso em: 14 set. 2021.

MAYEUX, R. et al. Altered serotonin metabolism in depressed patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 34, n. 5, p. 642–642, 1 maio 1984. Disponível em: <<https://n.neurology.org/content/34/5/642>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. Complexity of dopamine metabolism. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, p. 34, 2013. Disponível em: <<http://www.biosignaling.com/content/11/1/34>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

MEISSNER, W. When does Parkinson's disease begin? From prodromal disease to motor signs. **Revue neurologique**, v. 168, n. 11, p. 809–814, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22981298/>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

MENDONÇA, I. P. et al. **Neurobiological findings underlying depressive behavior in Parkinson's disease: A review** *International Immunopharmacology* *Int Immunopharmacol*, , 1 jun. 2020. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32224442/>>. Acesso em: 7 set. 2021.

MENZA, M. et al. The Role of Inflammatory Cytokines in Cognition and Other Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. **Psychosomatics**, v. 51, n. 6, p. 474–479, 1 nov. 2010.

MEONI, S.; MACEROLLO, A.; MORO, E. Sex differences in movement disorders. **Nature Reviews Neurology** **2020 16:2**, v. 16, n. 2, p. 84–96, 3 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41582-019-0294-x>>. Acesso em: 22 set. 2021.

MEREDITH, G. E.; RADEMACHER, D. J. MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. **Journal of Parkinson's disease**, v. 1, n. 1, p. 19, 2011. Disponível em: <</pmc/articles/PMC3530193/>>. Acesso em: 23 set. 2021.

MISGANAW, D. Heteromerization of dopaminergic receptors in the brain: Pharmacological implications. **Pharmacological Research**, v. 170, p. 105600, 1 ago. 2021.

MISHIMA, Y. et al. Sex-dependent differences in the gut microbiota following chronic nasal inflammation in adult mice. **Scientific Reports** 2021 **11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 25 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-83896-5>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

MONTEGGIA, L. M. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Conditional Knockouts Show Gender Differences in Depression-Related Behaviors. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 2, p. 187–197, 15 jan. 2007.

MOYLAN, S. et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: Why so much stress? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 46–62, 1 set. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763414001249>>. Acesso em: 11 maio. 2019.

MUISE, E. D. et al. Distribution of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the murine small intestine. **Life Sciences**, v. 169, p. 6–10, 15 jan. 2017.

MUNDIÑANO, I.-C. et al. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. **Acta Neuropathologica** 2011 **122:1**, v. 122, n. 1, p. 61–74, 8 maio 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-011-0830-2>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

MURAKAMI, H. et al. Differences in correlations of depression and anhedonia with cardiovascular sympathetic functions during a head-up tilt test in drug-naïve Parkinson's disease patients. **Neurological Sciences** 2020 **41:10**, v. 41, n. 10, p. 2825–2830, 19 abr. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10072-020-04390-w>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

MURTHY, K. S. SIGNALING FOR CONTRACTION AND RELAXATION IN SMOOTH MUSCLE OF THE GUT. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707>, v. 68, p. 345–374, 6 fev. 2006. Disponível em:

<<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707>>.

Acesso em: 16 set. 2021.

NAGAYAMA, H. et al. Anhedonia and its correlation with clinical aspects in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 372, p. 403–407, 15 jan. 2017.

NÁNÁSI, N. et al. The assessment of possible gender-related effect of endogenous striatal alpha-tocopherol level on MPTP neurotoxicity in mice. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04425, 1 jul. 2020.

NATALE, G. et al. Parkinson's disease and the gut: a well known clinical association in need of an effective cure and explanation. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, n. 7, p. 741–749, 1 jul. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2982.2008.01162.x>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

NATALE, G. et al. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut. **Brain Research**, v. 1355, p. 195–206, 8 out. 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS.; INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (U.S.). **Guide for the care and use of laboratory animals**. [s.l.] National Academies Press, 2011.

NEIS, V. B. et al. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 150–151, p. 108–114, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305716301691?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

NICOLETTI, A. et al. Gender effect on non-motor symptoms in Parkinson's disease: are men more at risk? **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 35, p. 69–74, 1 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.prd-journal.com/article/S1353802016304886/fulltext>>. Acesso em: 22 set.

2021.

NUNEZ-PARRA, A.; PUGH, V.; ARANEDA, R. C. Regulation of adult neurogenesis by behavior and age in the accessory olfactory bulb. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 47, n. 4, p. 274–285, 1 ago. 2011.

OBESO, J. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, 1 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887905/>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

OLANOW, C. W. et al. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 8, p. 1064–1071, 1 jul. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mds.25364>>. Acesso em: 22 set. 2021.

OOKUBO, M. et al. Gender differences on MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in C57BL/6 mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 311, n. 1–2, p. 62–68, 13 nov. 2009.

ORAL, E. et al. How olfaction disorders can cause depression? The role of habenular degeneration. **Neuroscience**, v. 240, p. 63–69, 14 jun. 2013.

ORG, E. et al. Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. **Gut Microbes**, v. 7, n. 4, p. 313, 3 jul. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4988450/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26884450/)>. Acesso em: 8 nov. 2021.

OTABI, H.; OKAYAMA, T.; TOYODA, A. Assessment of nest building and social interaction behavior in mice exposed to acute social defeat stress using a three-dimensional depth camera. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13447, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.13447>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

OVERTON, P. G.; COIZET, V. The neuropathological basis of anxiety in Parkinson's disease. **Medical Hypotheses**, v. 144, p. 110048, 1 nov. 2020.

OZANSOY, M.; BAŞAK, A. N. The Central Theme of Parkinson's Disease: α -Synuclein. **Molecular Neurobiology** 2012 47:2, v. 47, n. 2, p. 460–465, 23 nov. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-012-8369-3>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

PAIN, S. et al. Toxicity of MPTP on neurotransmission in three mouse models of Parkinson's disease. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 5, p. 689–694, 1 jul. 2013.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1 ago. 1985.

PEREZ-LLORET, S.; BARRANTES, F. J. Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease** 2016 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–12, 18 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/npjparkd20161>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

PETERS, K. Z.; CHEER, J. F.; TONINI, R. Modulating the Neuromodulators: Dopamine, Serotonin, and the Endocannabinoid System. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 6, p. 464–477, 1 jun. 2021.

PETZOLD, G. C.; HAGIWARA, A.; MURTHY, V. N. Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. **Nature Neuroscience** 2009 12:6, v. 12, n. 6, p. 784–791, 10 maio 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.2335>>. Acesso em: 30 ago. 2021.

PICILLO, M. et al. Gender and non motor fluctuations in Parkinson's disease: A prospective study. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 27, p. 89–92, 1 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.prd-journal.com/article/S1353802016300797/fulltext>>. Acesso em: 22 set. 2021.

PICILLO, M. et al. **The relevance of gender in Parkinson's disease: a review** *Journal of Neurology* Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG, , 1 ago. 2017. .

PIFL, C. et al. Reduced noradrenaline, but not dopamine and serotonin in motor thalamus of the MPTP primate: relation to severity of Parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, n. 5, p. 657–662, 1 jun. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.12162>>. Acesso em: 6 nov. 2021.

PIFL, C. et al. Early Paradoxical Increase of Dopamine: A Neurochemical Study of Olfactory Bulb in Asymptomatic and Symptomatic MPTP Treated Monkeys. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 0, p. 46, 29 maio 2017.

PLOUVIER, A. O. A. et al. Prodromal symptoms and early detection of Parkinson's disease in general practice: a nested case-control study. **Family practice**, v. 31, n. 4, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24869632/>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17013, 23 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201713>>. Acesso em: 8 jul. 2019.

POLITIS, M. et al. Depressive symptoms in PD correlate with higher 5-HTT binding in raphe and limbic structures. **Neurology**, v. 75, n. 21, p. 1920–1927, 23 nov. 2010. Disponível em: <<https://n.neurology.org/content/75/21/1920>>. Acesso em: 9 set. 2021.

POLITIS, M.; NICCOLINI, F. Serotonin in Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 136–145, 15 jan. 2015.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978.

PREDIGER, R. D. et al. The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-

Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 5, p. 489–507, 28 mar. 2011.

PREDIGER, R. D. S. et al. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 202, n. 2, p. 391–403, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16908021>>. Acesso em: 9 mar. 2020.

PREDIGER, R. D. S. et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 17, n. 2, p. 114–129, fev. 2010.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience** 2017 18:4, v. 18, n. 4, p. 251–259, 17 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn.2017.25>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

RAMOS-HRYB, A. B. et al. How would publication bias distort the estimated effect size of prototypic antidepressants in the forced swim test? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 192–194, 1 set. 2018.

RANA, A. Q. et al. Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. <http://dx.doi.org/10.1586/14737175.2015.1038244>, v. 15, n. 5, p. 549–562, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737175.2015.1038244>>. Acesso em: 19 set. 2021.

RATTAN, S. Ca²⁺/calmodulin/MLCK pathway initiates, and RhoA/ROCK maintains, the internal anal sphincter smooth muscle tone. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 1, p. G63–G66, 8 dez. 2016. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.00370.2016>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

RAY DORSEY, E. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, 1 nov. 2018.

REMY, P. et al. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. **Brain**, v. 128, n. 6, p. 1314–1322, 1 jun. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/128/6/1314/431876>>. Acesso em: 9 set. 2021.

REN-PATTERSON, R. F. et al. Gender-dependent modulation of brain monoamines and anxiety-like behaviors in mice with genetic serotonin transporter and BDNF deficiencies. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4–6, p. 753–778, 22 jul. 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-006-9048-6>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

RENARD, C. E. et al. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. **Blackwell Publishing Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 449–455, 2003.

RINNINELLA, E. et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 1 jan. 2019. Disponível em: <pmc/articles/PMC6351938/>. Acesso em: 14 set. 2021.

RIZZO, G. et al. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease. **Neurology**, v. 86, n. 6, p. 566–576, 9 fev. 2016. Disponível em: <<https://n.neurology.org/content/86/6/566>>. Acesso em: 4 ago. 2021.

ROSA, J. M. et al. Prophylactic effect of physical exercise on A β 1-40-induced depressive-like behavior and gut dysfunction in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 393, p. 112791, 1 set. 2020.

ROVERSI, K. **Mecanismos moleculares da dor na doença de Parkinson: evidências obtidas em modelos experimentais**. 2019. Universidade Federal de Santa Catarina, 2019. Disponível

em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/215559>>. Acesso em: 14 set. 2021.

RYAN, M.; EATMON, C. V.; SLEVIN, J. T. Drug treatment strategies for depression in Parkinson disease. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1612877>, v. 20, n. 11, p. 1351–1363, 24 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14656566.2019.1612877>>. Acesso em: 19 set. 2021.

SAH, P. Fear, Anxiety, and the Amygdala. *Neuron*, v. 96, n. 1, p. 1–2, 27 set. 2017.

SAMPAIO, T. B. et al. The Relevance of Intranasal Route in Parkinson's Disease: from Physiopathological Alterations to Administration of Neurotoxins. *Clinical Pharmacology and Translational Medicine (CPTM)*, v. 1, n. 2, p. 20–37, 2017.

SAMPAIO, T. F. et al. MAO-B and COMT Genetic Variations Associated With Levodopa Treatment Response in Patients With Parkinson's Disease. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 58, n. 7, p. 920–926, 1 jul. 2018.

SAMPATH, C. et al. Impairment of Nrf2- and Nitroergic-Mediated Gastrointestinal Motility in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 64, n. 12, p. 3502–3517, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-019-05693-5>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

SANDERS, K. M. et al. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2012 9:11, v. 9, n. 11, p. 633–645, 11 set. 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.168>>. Acesso em: 16 set. 2021.

SANO, H. Biochemistry of the extrapyramidal system Shinkei Kennkyu No Shinpo, Advances in Neurological Sciences. (ISSN 0001-8724) Tokyo, October 1960;5:42-48. *Parkinsonism & related disorders*, v. 6, n. 1, p. 3–6, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18591145/>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

SANTOS-MARCOS, J. A. et al. Influence of gender and menopausal status on gut microbiota. **Maturitas**, v. 116, p. 43–53, 1 out. 2018.

SANTOS, S. F. et al. The Gut and Parkinson's Disease-A Bidirectional Pathway. **Frontiers in neurology**, v. 10, p. 574, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31214110>>. Acesso em: 7 out. 2019.

SAUERBIER, A. et al. Treatment of Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. **International review of neurobiology**, v. 132, p. 361–379, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28554415/>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

SCHAMNE, M. G. et al. The Gender-Biased Effects of Intranasal MPTP Administration on Anhedonic- and Depressive-Like Behaviors in C57BL/6 Mice: the Role of Neurotrophic Factors. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 4, p. 808–819, 28 nov. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12640-018-9912-4>>. Acesso em: 8 out. 2019.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 8 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn.2017.62>>. Acesso em: 8 jul. 2019.

SCHRAG, A. et al. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 1, p. 57–64, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25435387/>>. Acesso em: 19 fev. 2022.

SIDEROWF, A. et al. Clinical and Imaging Progression in the PARS Cohort: Long-Term Follow-up. **Movement Disorders**, v. 35, n. 9, p. 1550–1557, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mds.28139>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

SILVA, A. L. O. **Premotor enteric nervous system impairment in an experimental Parkinson model**. 2015. Universidade de Coimbra, 2015. Disponível em:

<<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/32984>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

SIMPSON, C. A. et al. The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review. **Clinical Psychology Review**, v. 83, p. 101943, 1 fev. 2021.

SKORVANEK, M. et al. The associations between fatigue, apathy, and depression in Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 131, n. 2, p. 80–87, 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ane.12282>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

SNIGDHA, S. et al. Probiotics: Potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 107978, 4 set. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725821001807>>. Acesso em: 24 set. 2021.

SONGTACHALERT, T. et al. Anxiety Disorders: Sex Differences in Serotonin and Tryptophan Metabolism. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 1704–1715, 15 nov. 2018.

SONNE, J.; REDDY, V.; BEATO, M. R. Neuroanatomy, Substantia Nigra. **StatPearls**, 8 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536995/>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SPENCER, N. J.; HU, H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2020 17:6, v. 17, n. 6, p. 338–351, 9 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41575-020-0271-2>>. Acesso em: 17 set. 2021.

STERU, L. et al. A new method for screening antidepressants in mice. p. 367–370, 1985.

STRAWN, J. R. et al. Pharmacotherapy for Generalized Anxiety Disorder in Adults and Pediatric Patients: An Evidence-Based Treatment Review. **Expert opinion on**

pharmacotherapy, v. 19, n. 10, p. 1057, 3 jul. 2018. Disponível em: [</pmc/articles/PMC6340395/>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/). Acesso em: 19 set. 2021.

SUH, H.; DENG, W.; GAGE, F. H. Signaling in Adult Neurogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 25, n. 1, p. 253–275, 6 nov. 2009. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.042308.113256>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 101–113, 1 fev. 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrn.2016.178>>. Acesso em: 8 jul. 2019.

SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson’s disease. **Journal of Neurochemistry**, p. 318–324, 1 out. 2016.

TAKIISHI, T.; FENERO, C. I. M.; CÂMARA, N. O. S. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 4, 2 out. 2017. Disponível em: [</pmc/articles/PMC5788425/>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/). Acesso em: 13 set. 2021.

TANAHASHI, Y. et al. Roles of M2 and M3 muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 10, p. e687–e697, 1 out. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nmo.12194>>. Acesso em: 19 set. 2021.

TETEL, M. J. et al. **Steroids, stress and the gut microbiome-brain axis** **Journal of Neuroendocrinology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2018. .

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 1 jun. 2017. Disponível em: [</biochemj/article/474/11/1823/49429/Introduction-to-the-human-gut-microbiota>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/). Acesso em: 14 set. 2021.

TITOVA, N. et al. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 124, n. 8, p. 907–914, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28028643/>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

TONG, Q. et al. Reduced plasma serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in Parkinson's disease are associated with nonmotor symptoms. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 21, n. 8, p. 882–887, 1 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.prd-journal.com/article/S1353802015002345/fulltext>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

TONG, Z. Y.; KINGSBURY, A. E.; FOSTER, O. J. F. Up-regulation of tyrosine hydroxylase mRNA in a sub-population of A10 dopamine neurons in Parkinson's disease. **Molecular Brain Research**, v. 79, n. 1–2, p. 45–54, 23 jun. 2000.

TOVOTE, P.; FADOK, J.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, 26 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25991441/>>. Acesso em: 12 set. 2021.

TRAVAGLI, R. A.; BROWNING, K. N.; CAMILLERI, M. Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2020 17:11, v. 17, n. 11, p. 673–685, 31 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41575-020-0339-z>>. Acesso em: 6 ago. 2021.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, 1 jan. 2021.

TUCKER, L. B.; MCCABE, J. T. Behavior of Male and Female C57BL/6J Mice Is More Consistent with Repeated Trials in the Elevated Zero Maze than in the Elevated Plus Maze. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, 26 jan. 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5266707/](https://pmc/articles/PMC5266707/)>. Acesso em: 7 nov. 2021.

UBEDA-BAÑÓN, I. et al. The human olfactory system in two proteinopathies: Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, 3 jun. 2020.

Disponível em: [/pmc/articles/PMC7271529/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3271529/). Acesso em: 30 ago. 2021.

VAIDYA, B. et al. Parkinson's disease in women: Mechanisms underlying sex differences. **European Journal of Pharmacology**, v. 895, p. 173862, 15 mar. 2021.

VILLAR-PIQUÉ, A.; FONSECA, T. L. da; OUTEIRO, T. F. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 240–255, 1 out. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.13249>. Acesso em: 8 out. 2021.

VOLK, N.; LACY, B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105251571630068X?via%3Dihub>. Acesso em: 4 out. 2019.

VUONG, H. E. et al. The Microbiome and Host Behavior. **Annual Review of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 21–49, 25 jul. 2017. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-072116-031347>. Acesso em: 15 abr. 2020.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 1 mar. 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.44>. Acesso em: 27 out. 2020.

WANG, Y. et al. Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 41, p. 73–78, 1 ago. 2017.

WEI, L. et al. Abnormal ventral tegmental area-anterior cingulate cortex connectivity in Parkinson's disease with depression. **Behavioural Brain Research**, v. 347, p. 132–139, 16 jul. 2018.

WEINTRAUB, D.; MAMIKONYAN, E. **The Neuropsychiatry of Parkinson Disease: A Perfect Storm** *American Journal of Geriatric Psychiatry* Elsevier B.V., , 1 set. 2019. .

WILK-BLASZCZAK, M. **Histology: Digestive system**, 2021. . Disponível em: <<https://uta.pressbooks.pub/histology/chapter/digestive-system/>>. Acesso em: 29 out. 2021.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychobiology*, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037678>>. Acesso em: 23 maio. 2019.

WINNER, B. et al. Role of α -Synuclein in Adult Neurogenesis and Neuronal Maturation in the Dentate Gyrus. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 47, p. 16906–16916, 21 nov. 2012. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/32/47/16906>>. Acesso em: 9 set. 2021.

XIE, W. et al. Twice subacute MPTP administrations induced time-dependent dopaminergic neurodegeneration and inflammation in midbrain and ileum, as well as gut microbiota disorders in PD mice. *Neurotoxicology*, v. 76, p. 200–212, 1 jan. 2020.

XIE, Y. et al. Dopaminergic neurons project to the nucleus accumbens regulates anxiety-like behaviors through dopamine D1 signaling. *Behavioural Brain Research*, v. 416, p. 113540, 7 jan. 2022.

YANG, D. et al. The Role of the Gut Microbiota in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neurology*, v. 0, p. 1155, 6 nov. 2019.

YOHAN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression. *Molecular Brain* 2017 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–12, 24 jun. 2017. Disponível em: <<https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-017-0306-y>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

YU, H.; CHEN, Z. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural

circuitry. **Acta Pharmacologica Sinica** 2011 32:1, v. 32, n. 1, p. 3–11, 6 dez. 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/aps2010184>>. Acesso em: 5 nov. 2021.

ZARRINDAST, M.; KHAKPAI, F. The modulatory role of dopamine on anxiety behavior. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 9, p. 591–603, 2015.

ZHANG, J. et al. Abnormal composition of gut microbiota contributes to delirium-like behaviors after abdominal surgery in mice. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 685–696, 1 jun. 2019.

ZHI, S. L. et al. Physiological Modulation of Intestinal Motility by Enteric Dopaminergic Neurons and the D2 Receptor: Analysis of Dopamine Receptor Expression, Location, Development, and Function in Wild-Type and Knock-Out Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 10, p. 2798–2807, 8 mar. 2006. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/26/10/2798>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

ZHU, H. et al. Long-term stability and characteristics of behavioral, biochemical, and molecular markers of three different rodent models for depression. **Brain and Behavior**, v. 10, n. 2, p. e01508, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/brb3.1508>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

ZIZZO, M. G. et al. D1 receptors play a major role in the dopamine modulation of mouse ileum contractility. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 5, p. 371–378, 1 maio 2010.

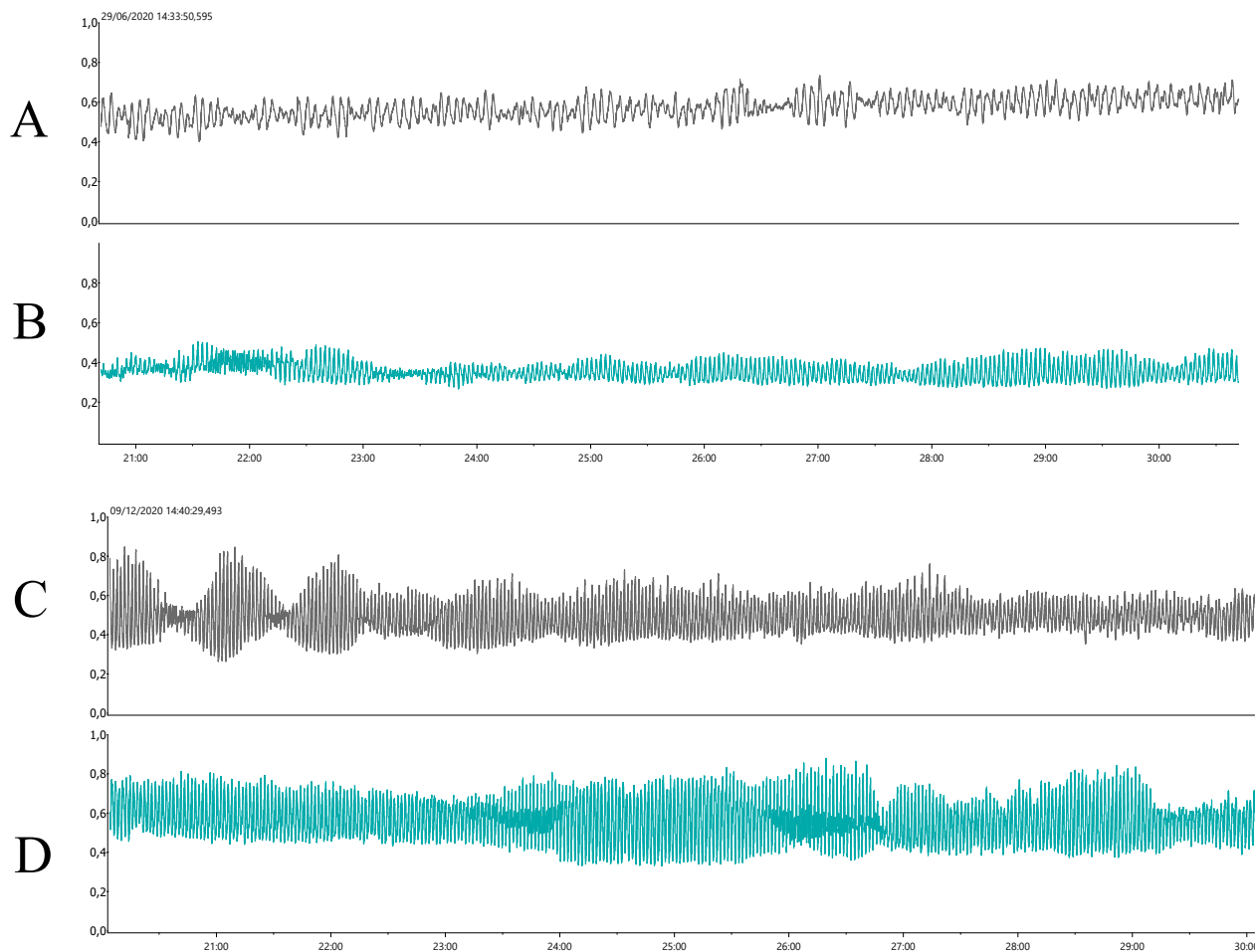
ZIZZO, M. G. et al. Postnatal development of the dopaminergic signaling involved in the modulation of intestinal motility in mice. **Pediatric Research**, v. 80, n. 3, p. 440–447, 2016.

ZOMKOWSKI, A. D. E. et al. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Research**, v. 1023, n. 2, p. 253–263, 15 out. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899304011771?via%3Dihub>>.

Acesso em: 13 mar. 2019.

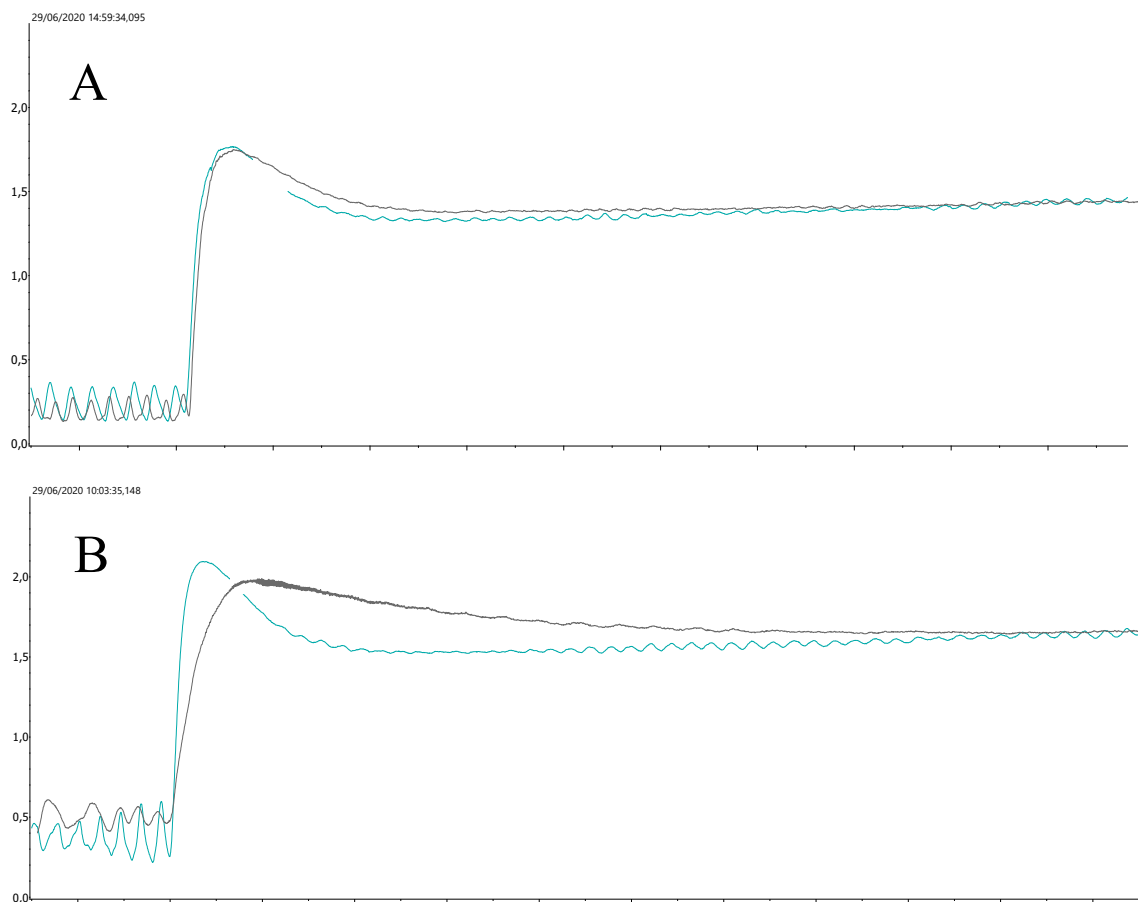
APÊNDICE A – Registros típicos do experimento em tiras de íleo isolado

Figura 1 – Registro típico dos 10 minutos precedentes aos experimentos



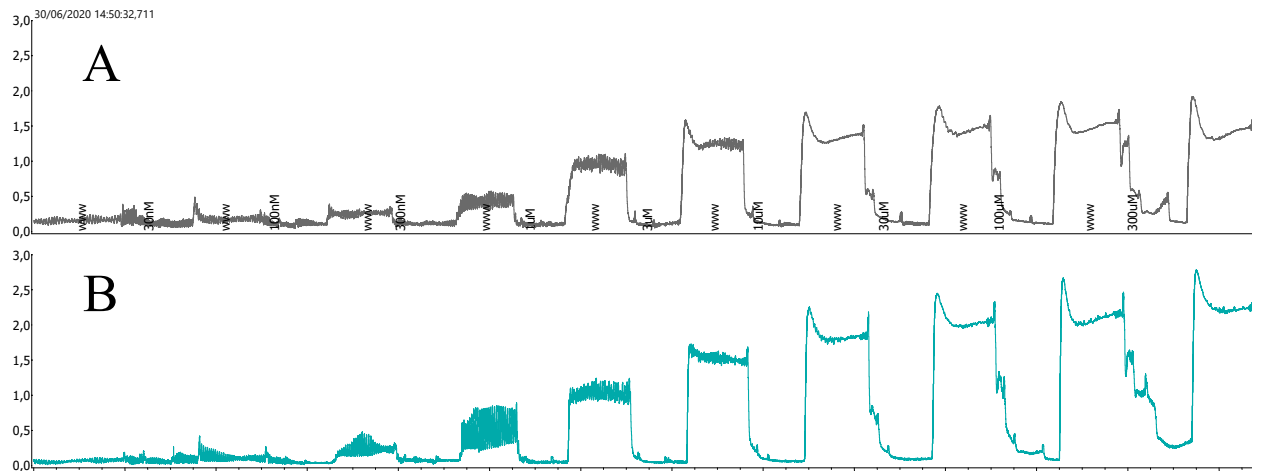
Legenda: Registro do período utilizado para avaliar a frequência de contrações. Veículos Machos (A), MPTP Machos (B), Veículos Fêmeas (C), MPTP Fêmeas (D). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 2 – Registro típico da resposta Contrátil à 30uM de Acetilcolina



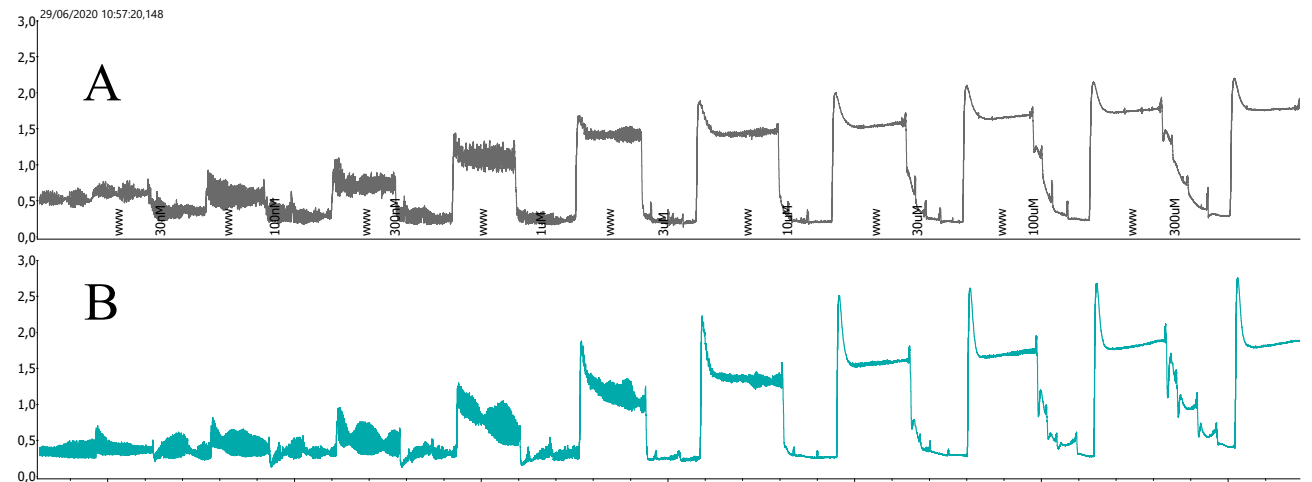
Legenda: Resposta à ACh em íleos isolados de camundongos machos (A) e fêmeas (B). Curvas cinzas representam os grupos veículo, curvas azuis representam os grupos administrados com MPTP intranasal. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 3 – Registros típicos das curvas de concentração resposta não cumulativa à ACh em machos



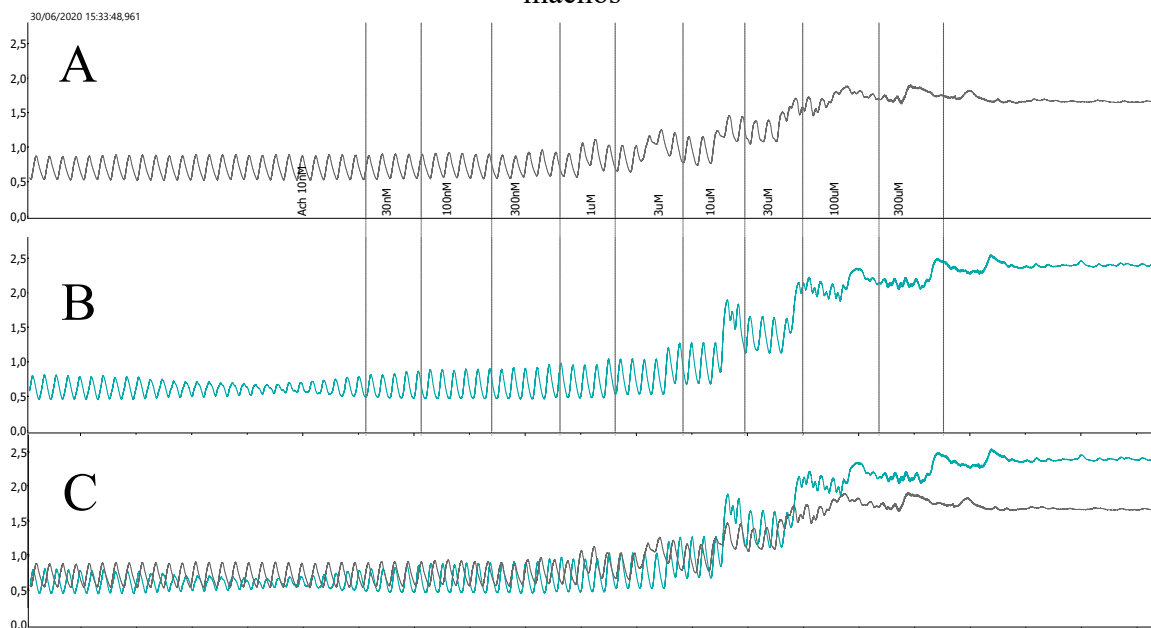
Legenda: Resposta às concentrações crescentes não cumulativas de ACh em Veículos machos (A) e MPTP machos (B). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 4 - Registros típicos das curvas de concentração resposta não cumulativa à ACh em fêmeas



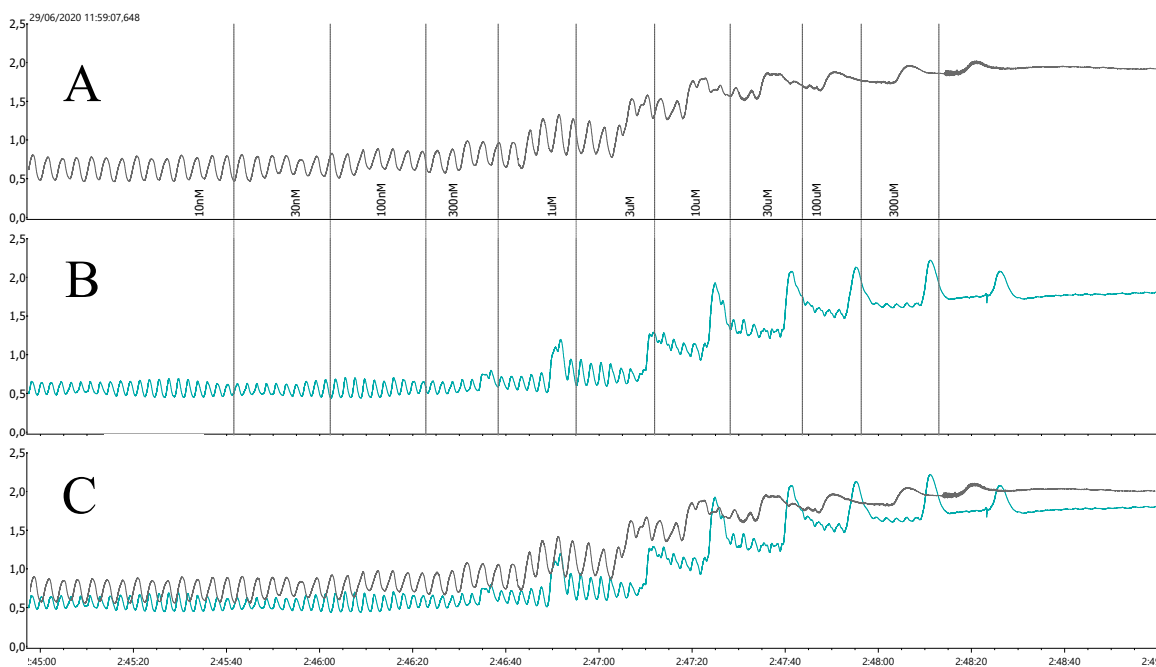
Legenda: Resposta às concentrações crescentes não cumulativas de ACh em Veículos fêmeas (A) e MPTP fêmeas (B). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 5 – Registro típico das curvas de concentração resposta cumulativa à ACh em machos



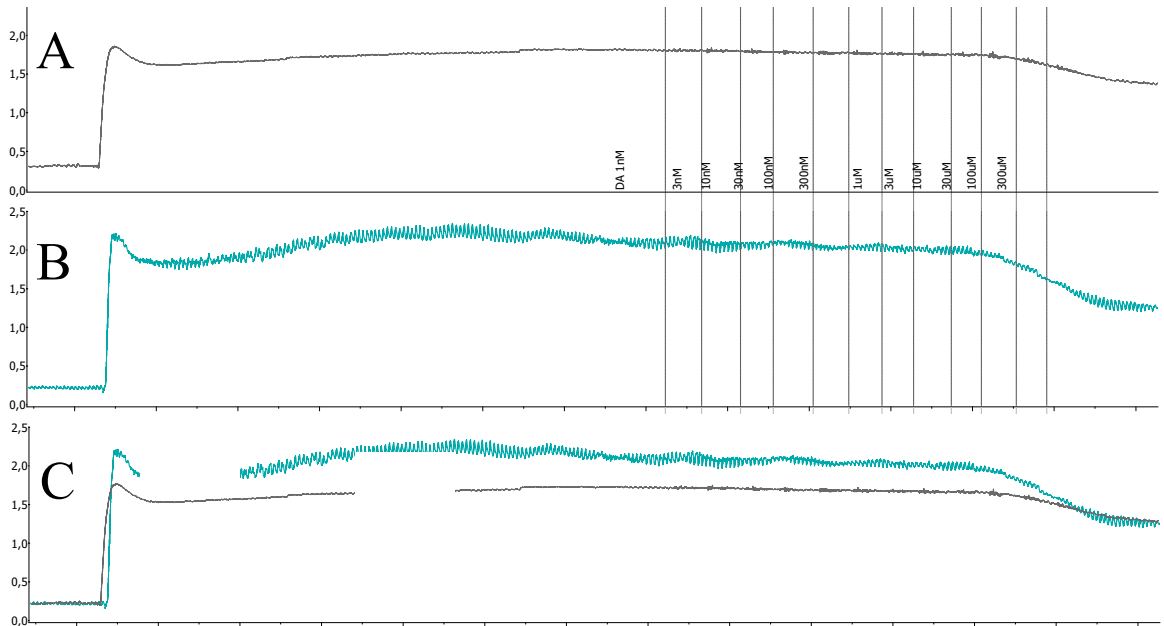
Legenda: Resposta às concentrações crescentes cumulativas de ACh em Veículos machos (A), MPTP machos (B) e sobreposição de ambos (C). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 6 – Registro típico das curvas de concentração resposta cumulativa à ACh em fêmeas



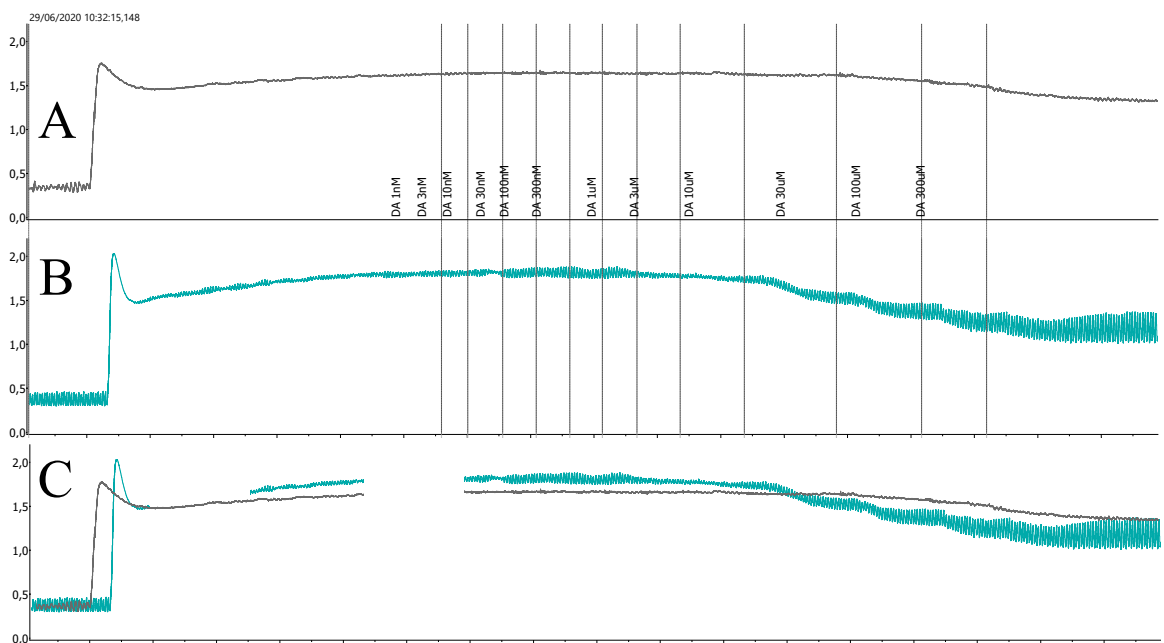
Legenda: Resposta às concentrações crescentes cumulativas de ACh em Veículos fêmeas (A), MPTP fêmeas (B) e sobreposição de ambos (C). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 7 – Registro típico das curvas de relaxamento de DA em machos



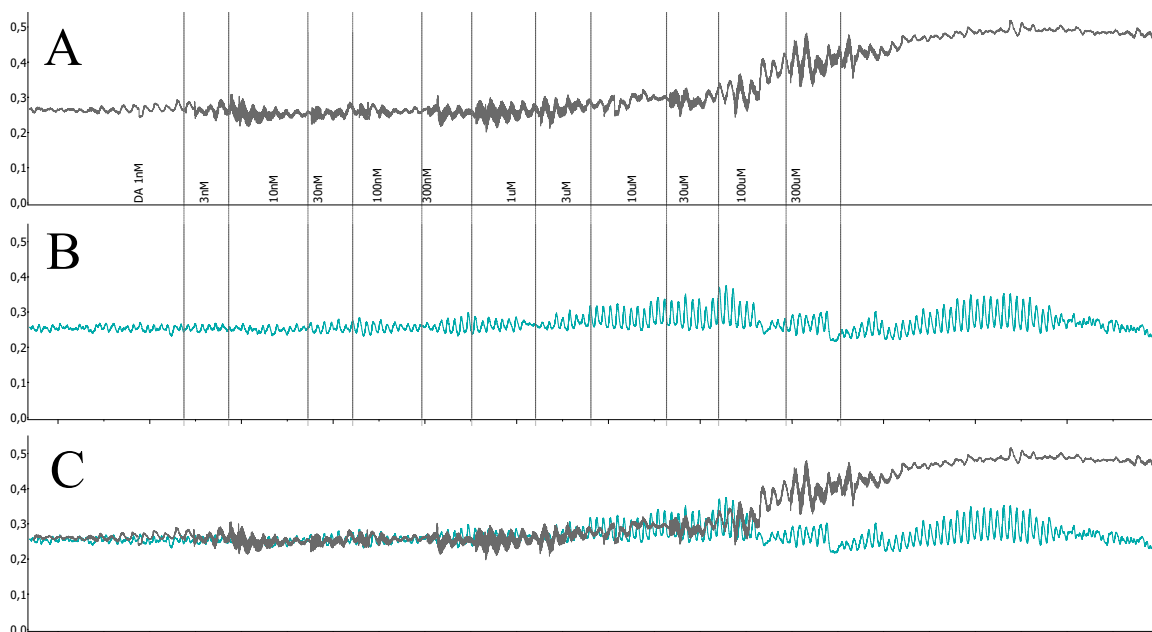
Legenda: Curvas de relaxamento de DA em relação ao percentual de contração tônica de ACh em veículos machos (A), MPTP machos (B) e sobreposição de ambos (C). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 8 – Registro típico das curvas de relaxamento de DA em fêmeas



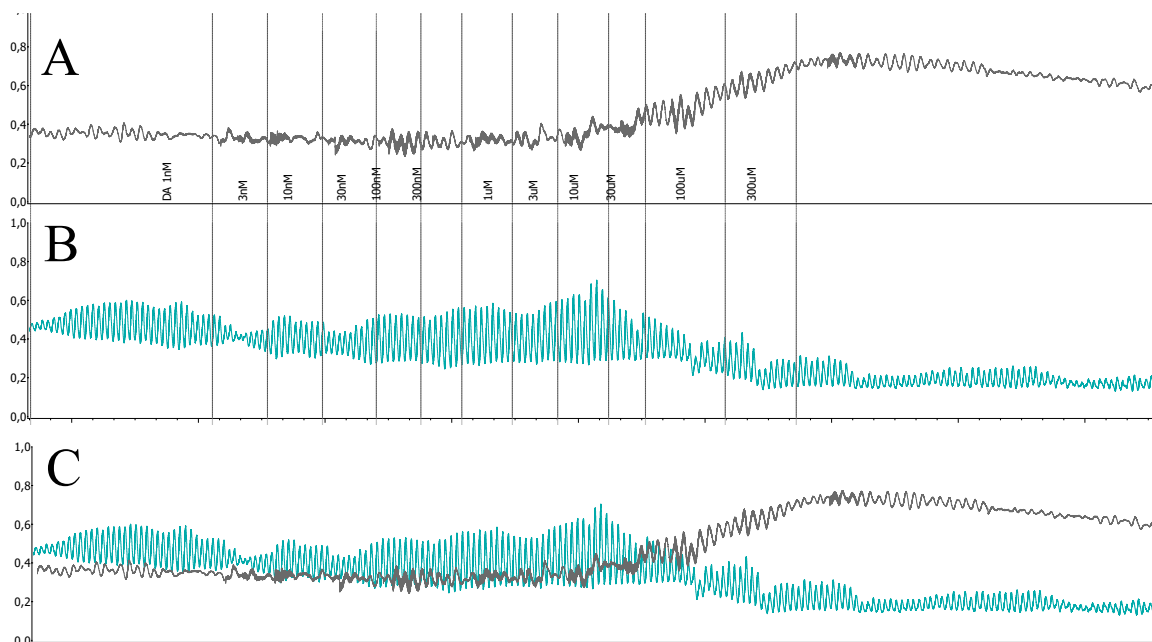
Legenda: Curvas de relaxamento de DA em relação ao percentual de contração tônica de ACh em veículos fêmeas (A), MPTP fêmeas (B) e sobreposição de ambos (C). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 9 – Registro típico das curvas de concentração resposta cumulativa à DA em machos



Legenda: Curvas de concentração resposta cumulativas de DA em veículos machos (A), MPTP machos (B) e sobreposição de ambos (C). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 10 – Registro típico das curvas de concentração resposta cumulativa à DA em fêmeas



Legenda: Curvas de concentração resposta cumulativas de DA em veículos fêmeas (A), MPTP fêmeas (B) e sobreposição de ambos (C). Fonte: Elaborado pela autora (2021).