



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

A contribuição do processo inflamatório nas doenças neurodegenerativas: eixo cérebro- intestino-microbiota e os TLRs na doença de Parkinson

Oleksandra Umanets

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientadora: Professora Doutora Mafalda Fonseca
Coorientadora: Professora Doutora Graça Baltazar

Covilhã, maio de 2019

Dedicatória

Aos meus pais, por tudo!

Agradecimentos

À Professora Doutora Mafalda Fonseca e à Professora Doutora Graça Baltazar, que foram incansáveis na ajuda que me prestaram, tanto ao nível da escolha do tema da monografia, como também na orientação durante o seu desenvolvimento.

À Faculdade de Ciências da Saúde, representada por todos os tutores, professores, técnicos, colegas e funcionários, por todos estes anos de aprendizagem e pelas oportunidades que me proporcionaram no sentido de me tornar uma melhor aluna, futura médica e, sobretudo, uma melhor pessoa.

Gostaria, por fim, de agradecer à minha família e amigos, que são a minha base de apoio incondicional.

Resumo

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por alfa-sinucleinopatia que afeta todos os níveis do eixo cérebro-intestino, incluindo o sistema nervoso central, entérico e autônomo.

Recentemente, foi reconhecido que o eixo cérebro-intestino pode ser modulado pela microbiota intestinal pelos mecanismos imunológicos, neuroendócrinos e neurológicos. A microbiota intestinal e os seus metabólitos interagem com o hospedeiro através de processos biológicos e funcionais, afetando a homeostase do organismo. A desregulação do eixo cérebro-intestino-microbiota na doença de Parkinson pode estar associada a manifestações gastrointestinais, que frequentemente precedem os sintomas motores, assim como à fisiopatologia da doença de Parkinson, suportando a hipótese de que a doença pode ter início no intestino e daí propagar-se para o cérebro.

Os recetores do tipo Toll desempenham um papel crucial no sistema imunológico inato, ao reconhecer diferentes antígenos presentes nos microrganismos, e a desregulação da sua sinalização pode estar implicada na alfa-sinucleinopatia na doença de Parkinson.

Uma excessiva estimulação do sistema imunológico inato pela disbiose e/ou pelo supercrescimento bacteriano do intestino delgado, juntamente com uma permeabilidade intestinal aumentada, podem induzir uma inflamação local e sistémica, assim como a ativação das células gliais do sistema nervoso entérico, potenciando o desenvolvimento da alfa-sinucleinopatia. Além disso, o sistema imunológico também pode ser perturbado pelas proteínas bacterianas, pela reação cruzada com os antígenos humanos, e pelos componentes bacterianos, como os Lipopolissacarídeos.

O trabalho aqui apresentado pretende fazer uma revisão de estudos publicados que se focam no modo como a microbiota intestinal e os produtos podem afetar a fisiopatologia inflamatória da doença de Parkinson.

Palavras-chave: microbiota intestinal; doença de Parkinson; Recetores do tipo Toll; inflamação; neurodegeneração.

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease, characterized by alpha-synucleinopathy, which involves every aspect of the brain-gut axis, including the central, enteric and autonomic nervous systems.

Recently, it has been recognized that the brain-gut axis can be modulated by the gut microbiota through immunological, neuroendocrine and neurological mechanisms. The gut microbiota and its metabolites interact with the host through biochemical and functional processes, thereby affecting the body's homeostasis. The deregulation of the brain-gut-microbiota axis may be associated with gastrointestinal manifestations, which frequently precede motor symptoms, as well as with the pathogenesis of Parkinson's disease, supporting the hypothesis that the disease may start in the gut and then spread to the brain.

Toll-like receptors play a crucial role in the innate immune system, by recognizing microorganism antigens, and a deregulation in their signaling may be associated with alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease.

Excessive stimulation of the innate immune system resulting from gut dysbiosis and/or small intestine bacterial overgrowth, together with increased intestinal permeability, may cause local and systemic inflammation, as well as enteric glial cell activation, triggering the development of alpha-synucleinopathy. In addition, the immune system may be disturbed by bacterial proteins cross-reacting with human antigens, and by bacterial components, like Lipopolysaccharides.

This dissertation intends to review published studies on how the intestinal microbiota and its products can affect the inflammatory pathophysiology of Parkinson's disease.

Keywords: gut microbiota; Parkinson's disease; Toll like receptors; inflammation; neurodegeneration.

Índice

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Lista de acrónimos.....	xvii
Introdução.....	1
Objetivos	3
Metodologia	5
1. Doença de Parkinson	7
1.1. Caracterização	7
1.2. A neuroinflamação no processo neurodegenerativo da doença de Parkinson.....	7
1.3. Alfa-sinucleinopatia e o trato gastrointestinal	11
2. Microbiota intestinal na doença de Parkinson.....	15
2.1 Disbiose intestinal	16
2.2 Supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SIBO)	17
3. Eixo cérebro-intestino-microbiota na fisiopatologia inflamatória da doença de Parkinson .	21
3.1 Mimetismo molecular	21
3.2 Permeabilidade intestinal e as endotoxinas	23
3.3 Ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs)	25
4. TLRs (recetores do tipo Toll)	27
4.1. TLRs na doença de Parkinson.....	27
4.2 Interação da microbiota intestinal com os TLRs na doença de Parkinson	29
Conclusão e cenários futuros	33
Bibliografia.....	35

Lista de figuras

Figura 1 - A possível ligação entre alfa-sinucleína, os processos neuroinflamatórios e a neurodegeneração na DP.	8
Figura 2 - Possíveis mecanismos dos processos neuroinflamatórios na DP.	10
Figura 3 - A teoria da progressão da agregação de alfa-sinucleína no cérebro de um doente com a DP.	12
Figura 4 - Possíveis rotas de progressão da alfa-sinucleinopatia através do sistema nervoso periférico e central e a localização das estruturas envolvidas pela alfa-sinucleinopatia.	13
Figura 5 - Translocação da MI do cólon para o intestino delgado, causando SIBO.	19
Figura 6 - Reconhecimento pelos TLRs de estruturas especializadas localizadas nos micro-organismos denominadas PAMPs.	22
Figura 7 - Alterações na permeabilidade intestinal após alterações na MI.	23
Figura 8 - Um possível caminho de disseminação da alfa-sinucleinopatia do SNE para o SNC.	24
Figura 9 - Figura resumo.	34

Lista de tabelas

Tabela 1 - Tabela dos principais achados.

31

Lista de acrónimos

- AGCC - Ácido gordo de cadeia curta
CD14 - *Cluster* de diferenciação 14
DAMP - Padrão molecular associado a danos
DMVN - Núcleo dorsal do nervo vago
DP - Doença de Parkinson
IFN γ - Interferão gama
IL-1b - Interleucina-1b
LBP - Proteína sérica de ligação a lipopolissacarídeos
LPS - Lipopolissacarídeos
MI - Microbiota intestinal
MM - Mimetismo molecular
MyD88 - Fator de diferenciação mieloide 88
NF-kB - Fator nuclear-kappa B
PAMP - Padrão molecular associado ao agente patogénico
ROS - Espécies reativas de oxigénio
SIBO - Supercrescimento bacteriano do intestino delgado
SNA - Sistema nervoso autónomo
SNC - Sistema nervoso central
SNE - Sistema nervoso entérico
TLR - Recetor do tipo Toll
TLR1 - Recetor do tipo Toll 1
TLR2 - Recetor do tipo Toll 2
TLR4 - Recetor do tipo Toll 4
TNF α - Fator de necrose tumoral-alfa

Introdução

Nos últimos anos, foi reconhecida globalmente a existência de uma rede bidirecional conhecida como “eixo cérebro-intestino”, e a sua desregulação foi associada a inúmeras doenças, levando à necessidade de pesquisas mais aprofundadas e novas estratégias de tratamento (1). Tornou-se mais claro que, na doença de Parkinson (DP), os diferentes níveis do eixo cérebro-intestino, incluindo o sistema nervoso autónomo (SNA) e o sistema nervoso entérico (SNE), podem ser afetados (2).

Recentemente, também se tornou evidente que as interações do eixo cérebro-intestino podem ser influenciadas pela microbiota intestinal (MI) (2). Pensa-se, por um lado, que a desregulação do eixo cérebro-intestino-microbiota na DP pode originar uma disfunção gastrointestinal, podendo encontrar-se em mais de 80% dos indivíduos com DP (1,2). Mas, por outro lado, tem-se questionado se essa desregulação poderá também contribuir significativamente para o início da patologia da DP, colocando-se a hipótese de que o processo patológico poderá ter origem no intestino, espalhando-se para o cérebro (1-3).

A MI tem sido referida como o “órgão esquecido”. Estima-se que contenha cerca de 100 triliões de bactérias, e também alguns fungos e vírus, o que corresponde a 10 vezes mais do que o número de células do corpo humano. O genoma total da MI, denominado microbioma intestinal, tem cerca de 3 milhões de genes, 150 vezes mais do que o genoma humano (4,5). Estudos revelaram que cada indivíduo possui uma impressão digital microbiana única, que o distingue dos outros. Julga-se que as pessoas têm um terço da MI igual entre si, ao passo que os restantes dois terços são específicos de cada indivíduo, como se se tratasse de um “cartão de identidade” (5).

A DP é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum em todo o mundo (3), afetando 2-3% da população com mais de 65 anos (6). É caracterizada por sintomas motores e sintomas não motores (7), relacionados com a acumulação intracelular e a agregação da proteína alfa-sinucleína na *substantia nigra* do sistema nervoso central (SNC), bem como noutras estruturas neurais (2,6), e a progressiva degeneração de neurónios dopaminérgicos (8).

Várias questões permanecem sem resposta em relação à causa da morte celular neuronal e ao papel dos agregados de proteínas na DP. Múltiplos mecanismos celulares e moleculares que podem contribuir para a morte das células neuronais têm sido descritos, incluindo disfunção mitocondrial, *stress* oxidativo, excitotoxicidade e disfunção proteassômica (8). Além disso, apesar de provavelmente não ser o fator desencadeante,

acredita-se que a neuroinflamação é um contribuinte essencial para a fisiopatologia da DP (6).

A neuroinflamação na DP está caracterizada pela presença de astrócitos reativos e microglia ativada, envolvimento do sistema imunológico e adaptativo, sobre-expressão de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias e aumento das concentrações de espécies reativas de oxigénio (ROS) (9,10). Estudos demonstram que os diferentes fenótipos das células gliais podem ser modulados profundamente por estímulos inflamatórios periféricos, como, por exemplo, pela disbiose resultante da MI alterada (10). A microglia deteta antígenos patogénicos no SNC e expressa uma multiplicidade de recetores de superfície celular, incluindo recetores do tipo Toll (TLRs), que, quando ativados, induzem cascatas de sinalização inflamatória necessárias para a ação do *stress* oxidativo dentro de fagossomas da microglia (11).

A agregação de alfa-sinucleína parece ser capaz de induzir a imunidade inata e adaptativa na DP e, por sua vez, a neuroinflamação também parece poder promover a agregação da alfa-sinucleína, sugerindo que os dois processos fazem parte de um ciclo vicioso. Também aqui o intestino parece intervir. Foi sugerido que este é capaz de desencadear um nível suficiente de alfa-sinucleína agregada nos neurónios do SNE e que alguns destes agregados de alfa-sinucleína eventualmente serão capazes de escapar aos mecanismos normais de degradação, podendo contribuir para a neurodegeneração na DP (6).

A MI e os seus produtos metabólicos estão entre os potenciais candidatos causais de um processo que resulta na formação de corpos de Lewy no SNE (12,13).

A função neuronal normal da proteína alfa-sinucleína de 140 aminoácidos não é totalmente compreendida. Julga-se que atua no citosol, possivelmente também na mitocôndria e no núcleo, e provavelmente tem um papel na dinâmica das vesículas sinápticas, função mitocondrial, tráfico intracelular e poderá ser uma potencial chaperona. A alfa-sinucleína adquire propriedades neurotóxicas durante um processo patológico em que os monómeros solúveis de alfa-sinucleína inicialmente formam oligómeros e depois se juntam progressivamente para formar pequenas protofibrilas e eventualmente grandes fibrilas de alfa-sinucleína insolúveis, que correspondem aos agregados que compõem a patologia de Lewy (6).

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo analisar os dados publicados, relativos à ação que o processo inflamatório tem sobre a neurodegeneração que ocorre nas doenças neurodegenerativas, nomeadamente na DP. Foca-se na forma como a MI e os seus produtos podem contribuir para a inflamação na DP, procurando também estabelecer a relação entre a MI e a ativação dos TLRs, que poderão influenciar a fisiopatologia da DP.

Metodologia

A realização desta dissertação baseou-se na pesquisa de artigos de revistas científicas, utilizando como ferramentas a PUBMED, Mendeley e ScienceDirect.

Apenas foram incluídos artigos na língua inglesa. Os critérios de pesquisa considerados foram a relevância dos artigos e a sua data de publicação, tendo a pesquisa sido limitada aos últimos 15 anos.

A pesquisa na base de dados foi realizada em modo “pesquisa avançada”, tendo as opções “melhores correspondências”, “sumário” e “20 resultados por página” sido selecionadas. As palavras utilizadas na pesquisa bibliográfica foram “neuroinflammation”, “neurodegeneration”, “Parkinson’s disease”, “gut microbiota” e “TLR”. Esta pesquisa foi realizada isoladamente e/ou na forma booleana nas diferentes combinações possíveis, entre setembro de 2018 e fevereiro de 2019.

Na pesquisa inicial foram encontrados artigos de todos os tipos. Numa primeira fase, foram excluídos artigos com base na leitura do título. De seguida, foram excluídos com base na análise dos resumos. Por fim, foram selecionados 105 para leitura, dos quais foram selecionados os artigos utilizados nesta revisão com base na sua leitura e análise. Foram referenciados também alguns artigos presentes em artigos de revisão por deterem informações relevantes à construção desta dissertação. Por último, foram selecionados artigos especificamente para retirar imagens. Os artigos utilizados foram de revisão, ensaios clínicos e estudos de investigação *in vivo* e *in vitro*.

Após a análise cuidada de todo o material encontrado considerado relevante, foi realizada a presente revisão da literatura.

1. Doença de Parkinson

1.1. Caracterização

Histopatologicamente, a DP caracteriza-se pela perda de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* com consequente défice de dopamina no estriado e pela manifestação de inclusões eosinofílicas intracelulares, os chamados corpos de Lewy e os neuritos de Lewy, nos neurónios restantes. A patologia dos corpos de Lewy é caracterizada por agregados insolúveis intracelulares de alfa-sinucleína, que apresenta uma conformação alterada e que não se limita apenas ao cérebro, mas também afeta a medula espinhal e o sistema nervoso periférico, incluindo os gânglios simpáticos, o SNE, as glândulas salivares, a medula da suprarrenal, o nervo vago, os nervos cutâneos e também o nervo ciático (14).

Em todo o mundo, cerca de 3 milhões de doentes sofrem com os sintomas frequentemente debilitantes da DP (15). Os sintomas motores clássicos incluem a rigidez, a acinesia, o tremor de repouso e a instabilidade postural devido à morte progressiva de neurónios dopaminérgicos (2,3,7,16). Existe também um amplo espectro de manifestações não motoras, envolvendo, por exemplo, transtornos neuropsiquiátricos, como a ansiedade e a depressão; a disfunção do SNA; os distúrbios do sono e as alterações sensoriais como a dor, a hiposmia e a deterioração do paladar (17). Os principais problemas associados à disfunção do SNA são os gastrointestinais, como, por exemplo, a diminuição do paladar, os distúrbios da deglutição, o esvaziamento gástrico lento, a perda de peso e a obstipação (3,17). Presume-se que os sintomas gastrointestinais resultem de anormalidades do SNE (2,16) pela acumulação de alfa-sinucleína, e que alguns destes sintomas precedam a disfunção motora em mais de uma década (14). A obstipação afeta cerca de 80% dos doentes com DP e antecipa os sintomas motores característicos da doença (18).

A DP é vista como um distúrbio neurodegenerativo progressivo que começa anos antes do diagnóstico, abrange várias áreas neuroanatômicas e resulta da influência de fatores ambientais sobre uma pessoa com predisposição genética para a doença (7,14).

1.2. A neuroinflamação no processo neurodegenerativo da doença de Parkinson

A neuroinflamação resulta da contribuição da ativação das células gliais ou dos processos inflamatórios sistémicos sobre o SNC, que podem ser benéficos ou prejudiciais (10). Esta tem sido repetidamente associada à neurodegeneração. Acredita-se que existam dois potenciais mecanismos patológicos responsáveis pela morte celular neuronal existente na DP: os mecanismos “celulares autónomos” e os “celulares não autónomos”. O mecanismo celular

autônomo refere-se a uma acumulação de danos intrínsecos nos neurónios degenerados, culminando na sua morte. O segundo mecanismo indica uma degeneração indireta dos neurónios afetados, causada por interações patológicas com células vizinhas, tais como células gliais residentes (microglia e astrócitos) e/ou células imunitárias infiltradas da periferia (macrófagos e linfócitos) (8).

A agregação de alfa-sinucleína pode desencadear neuroinflamação através da ativação da microglia. O *stress* oxidativo produzido pela neuroinflamação é relatado como uma consequência celular da agregação de alfa-sinucleína, e os níveis excessivos de ROS livres podem desencadear ainda mais inflamação e agregação de alfa-sinucleína. Este ciclo vicioso da neuroinflamação induzida por agregação da alfa-sinucleína, que, por sua vez, causa mais agregação, pode ser um mecanismo central na fisiopatologia da DP (Figura 1) (19).

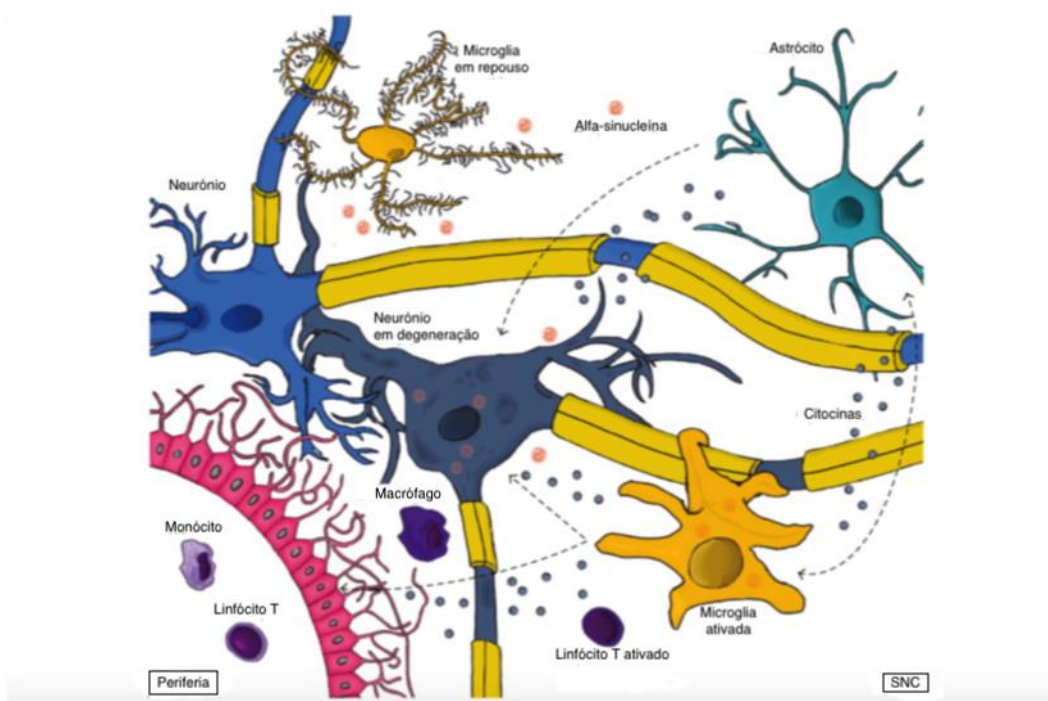


Figura 1 - A possível ligação entre alfa-sinucleína, os processos neuroinflamatórios e a neurodegeneração na DP. Na presença de conformação específica da alfa-sinucleína, a microglia é ativada e induz uma resposta imunológica complexa, aumentando a expressão de TLRs e vários mediadores pró-inflamatórios, que, consequentemente, ativam células imunológicas periféricas como monócitos ou células T. Essas células imunológicas periféricas podem contribuir ativamente para a neurodegeneração (Adaptado de Gelders G. et al) (8).

Recentemente, Harms e colegas mostraram que as fibrilas de alfa-sinucleína curtas, injetadas no sistema nervoso de murganhos, levaram à formação de inclusões de alfa-sinucleína em neurónios dopaminérgicos, potencialmente espalhando-se para os neurónios de projeção no estriado e induzindo rapidamente a ativação da microglia no cérebro. Observou-se perda axonal no estriado, juntamente com o recrutamento de monócitos dois meses após a injeção (20).

Sabe-se que os corpos de Lewy são compostos por agregados de alfa-sinucleína fibrilar. No entanto, acredita-se que esta forma de alfa-sinucleína seja não-tóxica. Além disso, numerosas experiências *in vitro* e *in vivo* suportam que os pequenos agregados de alfa-sinucleína, em formato de oligómeros, antes da formação de fibrilas, são as espécies tóxicas que levam à neurodegeneração (16,21,22). Apesar de ainda não se saber ao certo o que acontece à alfa-sinucleína oligomérica, tanto no SNE como no SNC, foi realizado um estudo em que, através do método de ELISA, foi medida a alfa-sinucleína oligomérica e a alfa-sinucleína fibrilar no trato gastrointestinal e no SNC, em macacos envelhecidos. O estudo revelou que há uma elevação dependente da idade de ambas as formas de alfa-sinucleína e que esta ocorre de forma síncrona nas várias regiões do SNE e do SNC (16).

Após a devida ativação, as células da microglia são capazes de causar toxicidade celular, através da produção e libertação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio. As citocinas inflamatórias também são mediadores importantes na inflamação. Entre elas estão o fator de necrose tumoral-alfa ($TNF\alpha$), a interleucina 1B (IL-1B) e o interferão gama ($IFN\gamma$) que têm uma função preponderante (Figura 2) (23).

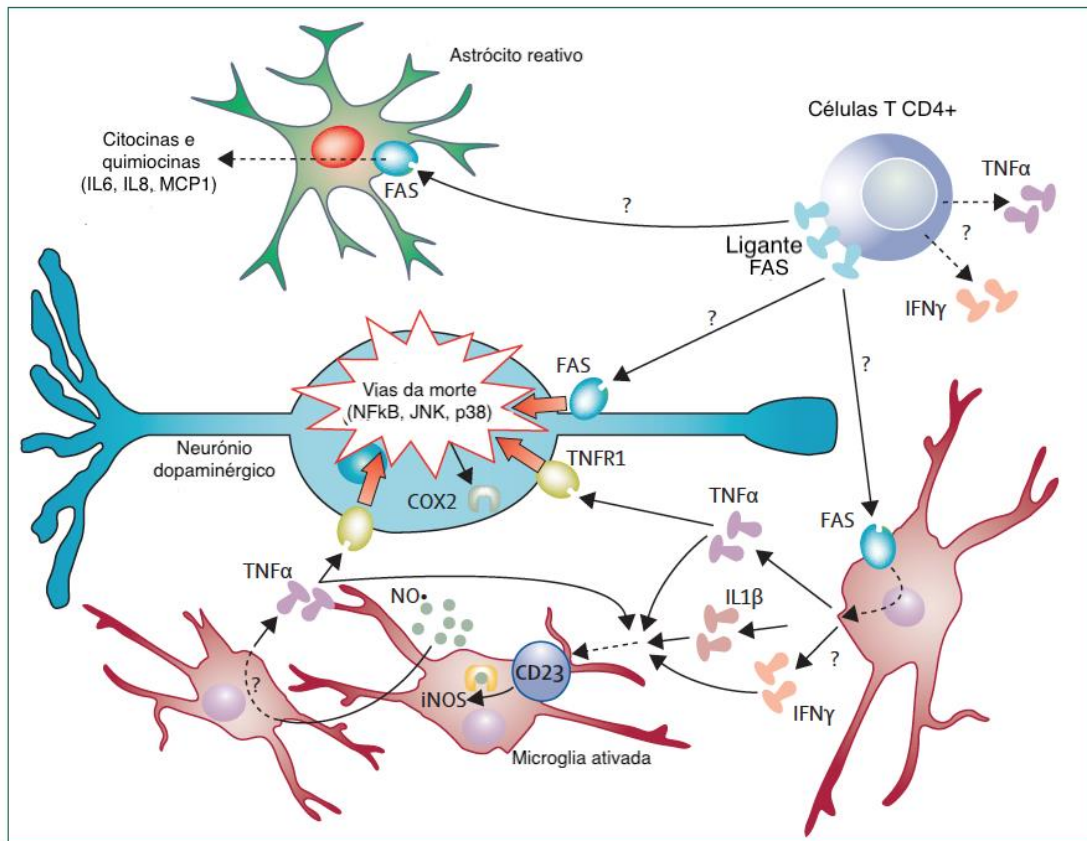


Figura 2 - Possíveis mecanismos dos processos neuroinflamatórios na DP.

A microglia ativada pode contribuir para a morte dos neurónios dopaminérgicos através da libertação de compostos inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1b e IFN γ). Entre estas citocinas, o TNF α pode ter um efeito prejudicial direto sobre os neurónios dopaminérgicos, ativando uma via de morte intracelular através da ligação ao recetor TNF 1 expresso na superfície celular desses neurónios. A ativação do recetor TNF 1 está associada à expressão induzida da COX2 nos neurónios dopaminérgicos. No entanto, estas citocinas também podem estimular a expressão de iNOS dentro da microglia (e, possivelmente, dentro dos astrócitos) através da expressão e ativação do recetor de baixa afinidade da imunoglobulina E (CD23). Este processo pode levar à produção de quantidades tóxicas de radicais livres de NO. Por sua vez, estes radicais livres podem potencializar a expressão e a libertação de TNF α pela microglia adjacente, amplificando ainda mais a reação inflamatória. A reação inflamatória dependente da microglia pode contribuir para o recrutamento cerebral de células T CD4+, ativadas próximas aos neurónios dopaminérgicos. Estas células T podem expressar e libertar vários fatores inflamatórios, como TNF α , IFN γ e ligante Fas. O ligante Fas medeia a lesão de neurónios dopaminérgicos induzida por células T. As células T CD4+, ao se ligarem ao ligante Fas, podem ter um efeito deletério diretamente nos neurónios dopaminérgicos (ativando uma via de morte intracelular através da ligação ao recetor Fas expresso na superfície celular dos neurónios dopaminérgicos) ou indiretamente (ativando o recetor Fas expresso na microglia ativada e nos astrócitos reativos), estimulando, assim, a sua ativação e a libertação de fatores inflamatórios adicionais. COX2 = ciclo-oxigenase 2. IL = interleucina. iNOS = isoforma induzível de óxido nítrico sintase. MCP1 = proteína quimioatraente de monócitos 1. NF κ B = fator nuclear-kappa B. NO = óxido nítrico. TNF α = fator de necrose tumoral alfa. TNFR = recetor do fator de necrose tumoral. IFN γ = interferon gama. JNK = c-Jun N-terminal quinases. CD23 = *cluster* de diferenciação 23. P38 = proteína 38. (Adaptado de Hirsch et al.) (23).

1.3. Alfa-sinucleinopatia e o trato gastrointestinal

Em condições fisiológicas, a alfa-sinucleína é abundantemente expressa no SNC e está envolvida na regulação da neurotransmissão. No entanto, as fibrilas insolúveis de alfa-sinucleína fosforilada têm sido implicadas em vários distúrbios neurodegenerativos, neste caso a DP (24). Há evidências crescentes de acumulação de alfa-sinucleína agregada em inclusões intraneuronais fora do cérebro, como, por exemplo, em neurónios do SNE do plexo submucoso mioentérico do trato gastrointestinal (17).

O SNE é uma rede neuronal organizada em dois grandes plexos ganglionares: o plexo mioentérico, envolvido principalmente no controlo da atividade da musculatura lisa, e o plexo submucoso, que regula a secreção e a musculatura lisa. Num estudo em que foram analisadas biópsias do intestino de doentes com DP e dos controlos saudáveis, foi encontrada a presença de corpos de Lewy no intestino em 21 dos 29 doentes com DP em estágio avançado da doença, ao passo que, nos controlos saudáveis, não foram encontrados corpos de Lewy em qualquer uma das biópsias (25).

Existe uma teoria sobre a propagação da alfa-sinucleína na DP, a hipótese “*prion-like*”. Esta hipótese defende que, após os agregados de alfa-sinucleína se formarem num neurónio, eles podem ser transportados entre axónios para outras regiões do cérebro, podem ser libertados no espaço extracelular, absorvidos por neurónios vizinhos e, por fim, se alojarem dentro do seu novo hospedeiro celular (26,27). Estudos em culturas celulares demonstraram que o comprometimento do sistema autofágico dos lisossomas dos neurónios leva a um aumento da secreção de alfa-sinucleína para o espaço extracelular através dos exossomas e que a endocitose é um mecanismo-chave para a captação de alfa-sinucleína extracelular para dentro dos neurónios (6). Um relatório recente demonstrou a presença de corpos de Lewy em neurónios enxertados. Este relatório baseou-se em estudos de autópsias de doentes com DP que receberam transplantes de mesencéfalo fetal, em que alfa-sinucleína foi encontrada nos neurónios enxertados, e, portanto, deve ter-se espalhado do hospedeiro para as células do enxerto (27). Outros estudos em modelos animais da DP revelaram um padrão imunorreativo de alfa-sinucleína após injeção intracerebral de alfa-sinucleína exógena, sugestivo de propagação da patologia de alfa-sinucleína neste modelos através de um processo “*prion-like*” (28). De acordo com esta hipótese, a agregação da alfa-sinucleína num pequeno número de células pode progressivamente levar à disseminação de agregados de alfa-sinucleína para múltiplas regiões do cérebro ou até outras regiões do corpo ao longo de anos ou décadas após a primeira agregação da proteína (6).

Foi observado através de estudos em murganhos que as lesões no SNE podem ocorrer num estado precoce da doença, o que nos leva a questionar se as alterações do SNE precedem as do SNC (29). Braak e os seus colegas propuseram um sistema de estadiamento de Braak.

Este sistema de estadiamento propõe que a fisiopatologia da alfa-sinucleína inicia-se numa área cerebral pontual, progredindo gradualmente para outras áreas cerebrais (Figura 3) (6).

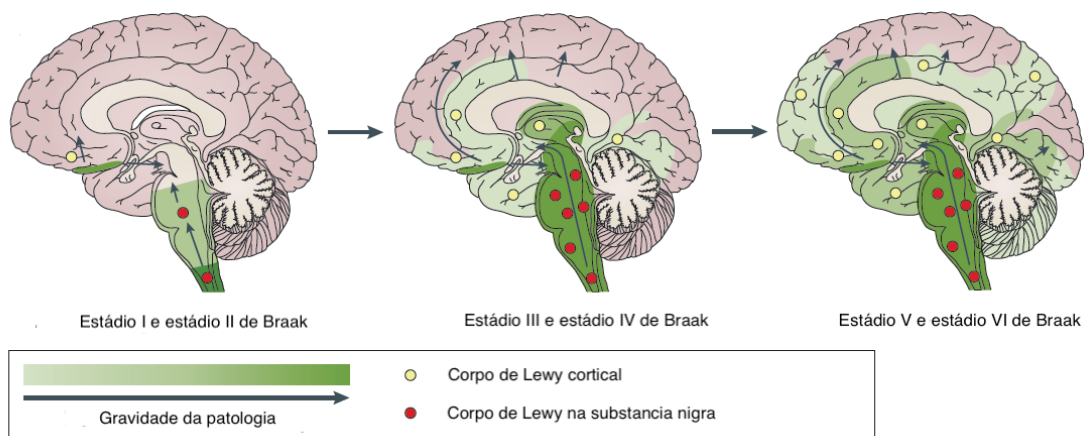


Figura 3 - A teoria da progressão da agregação de alfa-sinucleína no cérebro de um doente com DP. As inclusões de alfa-sinucleína ocorrem em neurónios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco cerebral inferior, em casos de doentes assintomáticos (estádio I e estágio II de Braak), infiltração de neurónios semelhantes no mesencéfalo e prosencéfalo basal nos doentes que apresentam sintomas motores (estádio III e estágio IV de Braak) e depois são encontrados mais tarde nas regiões límbicas neocorticais do cérebro com a progressão da doença (estádio V e estágio VI de Braak), (Adaptado de Poewe W. et al.) (6).

Além disso, ele defendia que o início da patologia poderia começar no bulbo olfatório ou no SNE (onde se iniciam os sintomas prodrómicos da DP). No caso de se iniciar no SNE, os autores propuseram que a alfa-sinucleína se propagava no sentido retrógrado até ao SNC por via dos axónios pré-ganglionares vagais do núcleo dorsal do nervo vago (DMVN) (Figura 4) (27,30). Através da técnica de imunohistoquímica, foram investigados os plexos gástricos mioentéricos e submucosos, tendo sido analisados 150 criosecções e 8 secções de parafina de cinco indivíduos autopsiados, cujos cérebros tinham sido diagnosticados com alfa-sinucleinopatia associada a DP. As inclusões de alfa-sinucleína imunorreativas foram encontradas nos neurónios do plexo submucoso de *Meissner*, cujos axónios se projetavam para a mucosa gástrica e terminavam perto das glândulas do fundo do estômago. Estes achados podem estabelecer o primeiro elo de ligação entre o SNE e o SNC (30). Hawkes e os seus colegas sugeriram duas hipóteses, em que um agente patogénico poderia atacar o sistema nervoso através de duas rotas - anterogradamente através do bulbo olfatório ou retrogradamente através do nervo vago - penetrando o epitélio da mucosa do bulbo olfatório e do trato gastrointestinal (31). No caso deste último, através dos neurónios entéricos pós-ganglionares, os agentes patogénicos ou as suas toxinas atingiriam o SNC ao longo das fibras pré-ganglionares derivadas do nervo vago pelo transporte axonal e transneuronal retrógrado, alcançando núcleos subcorticais seletivamente vulneráveis aos agentes patogénicos ou às suas toxinas (30).

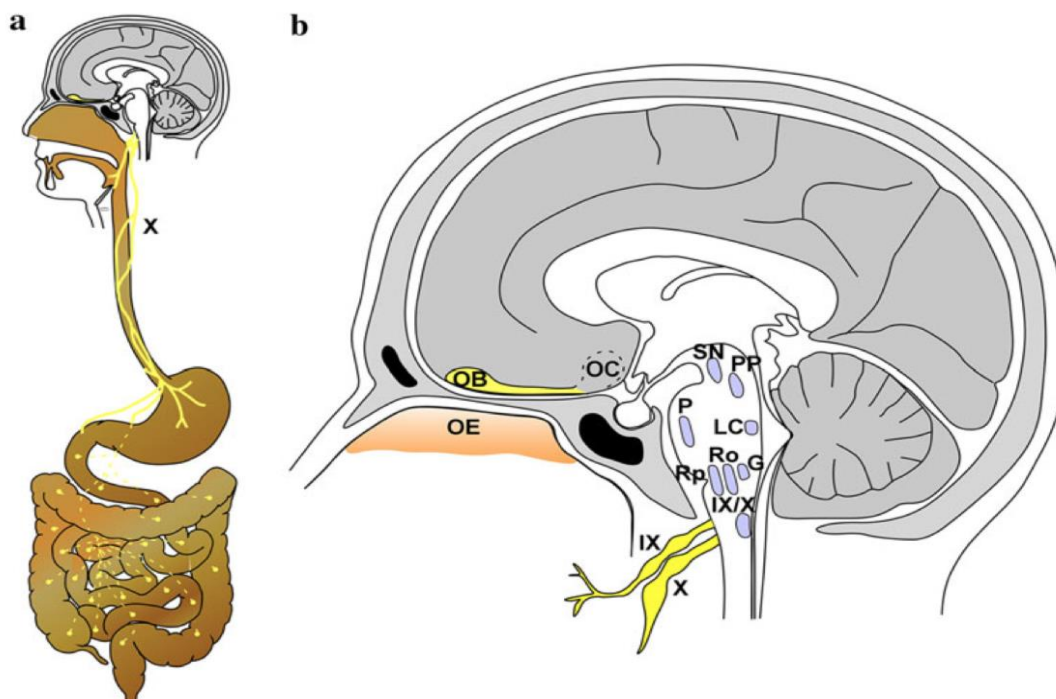


Figura 4 - Possíveis rotas de progressão da alfa-sinucleinopatia através do sistema nervoso periférico e central (a) e a localização das estruturas envolvidas pela alfa-sinucleinopatia (b). G = núcleo reticular gigantocelular, LC = *locus coeruleus*, OB = bulbo olfatório, OC = córtex olfatório, OE = epitélio olfatório, P = núcleo pontino, PP = pedúnculo do núcleo pontino, Ro = núcleo da rafe escuro, Rp = núcleo da rafe pálido, SN = substancia nigra, IX = nervo glossofaríngeo, IX/X = núcleo motor dorsal do nervo glossofaríngeo/vago, X = nervo vago (Retirado de Ubeda-Bañon et al.) (32).

No intestino, observou-se, nos estágios iniciais da DP, que o gradiente de concentração da alfa-sinucleína fosforilada segue o padrão de inervação do nervo vago, isto é, uma distribuição entérica rostrocaudal que parte do DMVN ao longo do nervo vago. Por conseguinte, há evidências de estudos que mostram que há uma maior concentração de alfa-sinucleína fosforilada presente na glândula submandibular e uma menor concentração no cólon (17,18). A primeira evidência experimental de que a patologia da DP pode começar no trato gastrointestinal e depois propagar-se para o SNC foi comprovada por estudos em ratos, demonstrando que a alfa-sinucleína injetada na parede intestinal de ratos migrou para o cérebro através do nervo vago a uma taxa estimada de 5-10 mm por dia (33). Além disso, uma vagotomia troncular completa em doentes com DP mostrou diminuir o risco de progressão da DP em comparação à vagotomia parcial ou ausência desta, sugerindo que há um envolvimento do nervo vago na disseminação dos corpos de Lewy do SNE para o SNC (34).

Resumindo, a DP é caracterizada por uma lenta e progressiva degeneração de neurónios dopaminérgicos e acumulação e agregação da alfa-sinucleína nestes neurónios. A neuroinflamação parece ter um papel crucial na fisiopatologia da DP, através de eventos celulares e moleculares, mas com especial importância da ativação das células gliais e células imunológicas periféricas. A ativação da microglia em resposta a alfa-sinucleína desencadeia um ciclo vicioso de libertação de mais fatores pró-inflamatórios e mais agregação de alfa-

sinucleína. Existe a hipótese de a alfa-sinucleína agregada ser proveniente do SNE e ser posteriormente transportada como um príão até ao SNC, onde, por sua vez, desencadeia a neuroinflamação.

2. Microbiota intestinal na doença de Parkinson

Os dois principais *filos* presentes na MI e que representam 90% da MI do ser humano são os *Firmicutes* e os *Bacteroidetes* (35,36). Também se pode classificar a MI com base na proeminência de uma das seguintes espécies: *Prevotella*, *Bacteroides* ou *Ruminococcus*. Estas espécies são classificadas como enterotipos e julga-se que a sua prevalência relativa se deva aos hábitos alimentares dos indivíduos (36). A MI pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles a dieta, os antibióticos que tomamos, as condições do parto, assim como a amamentação. Por conseguinte, a MI vai sofrendo alterações ao longo da vida, tanto devido aos fatores ambientais como devido aos fatores do próprio indivíduo (35).

O papel da MI na homeostase do organismo humano e na saúde humana ainda não é completamente entendido e continua a ser estudado, mas o que é certo é que a MI é essencial para o bem-estar intestinal e corporal (36). Algumas das funções conhecidas da MI para garantir a homeostase são, por exemplo, o impedimento da colonização do intestino por agentes patogénicos; a síntese de moléculas, como os ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs), as vitaminas, o folato e a tiamina, bem como a síntese de neurotransmissores, como a serotonina e o ácido γ -aminobutírico (35). Além da homeostase, a MI é responsável pela absorção de vitaminas, nutrientes, medicação e produtos tóxicos e pela regulação das respostas imunológicas locais (12,35,36).

Hoje em dia, apesar de ainda não serem conhecidos todos os fatores ambientais desencadeantes da patologia da DP, julga-se que um agente patológico ambiental possa desempenhar um papel fundamental num contexto de vulnerabilidade genética (7,14,37). O conhecido envolvimento precoce do trato gastrointestinal, sobretudo a obstipação precoce na DP, apoia a hipótese de que um agente patológico ambiental pode exercer as suas influências principalmente através do intestino (30,37). Muitos estudos revelaram que a composição da MI nos doentes com DP está alterada e está relacionada com os fenótipos da doença (12,13).

As interações entre a MI e os macrófagos endógenos do cérebro, a microglia, foram analisadas num estudo realizado por Erny e os seus colegas. No estudo, observaram que a colonização do intestino em condições homeostáticas, com uma MI normal complexa, estimula a ativação da microglia e a sua maturação. A depleção da MI normal do intestino, como, por exemplo, o que ocorre em ratos *germ-free*, ou a depleção induzida, por exemplo por antibióticos, pode comprometer marcadamente a maturação e o formato celular da microglia. Esta depleção leva a respostas imunitárias precoces após a estimulação por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou por contato com agentes inflamatórios, como os lipopolissacarídeos (LPS) (38).

2.1 Disbiose intestinal

As evidências de que os fatores ambientais influenciam tanto as bactérias do intestino quanto a DP sustentam o papel da disbiose na DP, que corresponde a um perfil alterado da MI normal (17).

O estudo conduzido por Scheperjans analisou a microbiota fecal de 72 doentes com DP e comparou-a à dos controlos saudáveis. Foi observada uma redução da abundância da família de bactérias *Prevotellaceae* nos doentes com DP comparativamente aos controlos saudáveis. Uma abundância de *Lactobacillaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Clostridiales incertae sedis IV* foram independentemente associados à DP. Além disso, observou-se uma maior abundância de *Enterobacteriaceae* entre os doentes com um fenótipo mais grave de instabilidade postural e dificuldade na marcha, em comparação àqueles que apresentavam apenas tremor, estabelecendo-se a hipótese de que poderá haver uma associação entre a abundância de *Enterobacteriaceae* e os sintomas axiais mais severos da DP (12). Um outro estudo encontrou achados semelhantes ao analisar o microbioma fecal de doentes com DP. Observou-se igualmente uma redução de *Prevotellaceae* e um aumento de *Enterobacteriaceae*. No entanto, não se observaram diferenças na concentração de *Enterobacteriaceae* entre os diferentes fenótipos dos doentes com DP. Além disso, ao contrário do estudo anterior, observou-se uma redução nas *Lactobacillaceae*. Algumas destas bactérias podem ter efeitos anti-inflamatórios, o que seria compatível com a hipótese de que há uma redução de bactérias na MI que são potencialmente benéficas na DP (39). Unger e colaboradores demonstraram assim, tal como no estudo de Keshavarzian e colaboradores, que havia uma redução de *Faecalibacterium prausnitzii* nas biópsias do colón sigmoide dos doentes com DP (13,39). Os efeitos anti-inflamatórios e benéficos sobre a barreira epitelial intestinal estavam relacionados com a presença de *Faecalibacterium prausnitzii* (40). Assim, uma redução no *Faecalibacterium prausnitzii* em combinação com uma abundância aumentada de *Enterobacteriaceae* na MI dos doentes com DP pode comprometer a barreira epitelial intestinal e, assim, tornar o SNE mais suscetível a agentes patogénicos do lúmen (39).

Sabe-se que as *Prevotellaceae* são bactérias comensais e estão envolvidas na síntese da camada de mucina na mucosa intestinal e também na produção de AGCCs neuroativos através da fermentação de fibras, e também libertação de tiamina e folato. Por conseguinte, a redução da concentração de *Prevotellaceae* pode resultar na diminuição da síntese de mucina e, conseqüentemente, no aumento da permeabilidade intestinal, uma vez que permite uma maior exposição local e sistémica da mucosa intestinal às endotoxinas bacterianas (12). Estas podem, por sua vez, desencadear a acumulação excessiva de alfa-sinucleína no cólon ou até mesmo promover a agregação desta proteína (41). Outro estudo em murganhos reforçou ainda mais esta ideia, uma vez que se observou que as alterações

inflamatórias da DP não só acontecem nos doentes com DP, mas também nos modelos de animais da doença, e estas estão também associadas a um aumento da permeabilidade intestinal, neste caso ao LPS (41,42).

Outro estudo nesta área demonstrou alterações em duas populações microbianas: na fecal e na da mucosa intestinal dos doentes com DP. Observou-se uma maior abundância da *Proteobacteria* pró-inflamatória do género *Ralstonia* e um nível reduzido de bactérias dos géneros *Blautia*, *Coprococcus* e *Roseburia*, envolvidos na produção de butirato, um AGCC associado a propriedades anti-inflamatórias. Foi também evidente a existência de concentrações diminuídas de AGCCs em doentes com DP, o que poderia estar associado a alterações na regulação peristáltica pelo SNE e consequente presença de dismotilidade intestinal. Neste estudo também se observou que, a nível do genoma, a MI de doentes com DP tem maior expressão de genes implicados na secreção de LPS, que podem ser responsáveis pela perda neuronal através do processo inflamatório e dano por *stress* oxidativo (13).

Apesar de ainda não se saber ao certo como a MI atua na fisiopatologia da DP, um estudo de Sampson e colegas com murganhos com excesso de alfa-sinucleína concluiu que a MI é necessária para desencadear os défices motores, ativar a microglia e promover a agregação da alfa-sinucleína. Os autores observaram que, ao administrar antibiótico, a sintomatologia da doença melhorava, enquanto que a recolonização microbiana do intestino promovia a fisiopatologia da doença nos murganhos adultos, o que sugere que a sinalização pós-natal entre o intestino e o cérebro é capaz de modular a doença. Ademais, os autores relataram que a colonização de murganhos que apresentam sobre-expressão de agregados de alfa-sinucleína, com uma MI de doentes com DP, aumenta a manifestação de défices motores em comparação aos transplantes de MI de doadores humanos saudáveis. Estes achados revelam que as bactérias intestinais são capazes de regular os distúrbios do movimento em murganhos, o que sugere que também as alterações na MI humana podem representar um fator de risco para a DP (43).

2.2 Supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SIBO)

Existem mecanismos intrínsecos que controlam a composição da MI do intestino delgado, como, por exemplo, o ácido gástrico, que pode destruir um número considerável de bactérias, ou as secreções biliares e pancreáticas, que limitam o crescimento bacteriano (17), entre outras.

As alterações da motilidade gastrointestinal que ocorrem na DP, especialmente do intestino delgado, podem favorecer a ocorrência de supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SIBO), conforme foi demonstrado por um estudo que relatou uma prevalência significativamente maior de SIBO em doentes com DP do que nos controlos saudáveis (44). A

prevalência de SIBO em doentes com DP com sintomas gastrointestinais e motores, reportada em estudos, ronda os 54% a 67% (45). Isto foi comprovado por um estudo ainda mais recente em população chinesa onde foram analisados 182 doentes com DP e 200 sem DP, em que se revelou uma prevalência de SIBO em doentes com DP de 70,9 % (46). Além disso, estes estudos revelaram que o SIBO pode estar associado a flutuações mais severas dos sintomas motores e a uma pior resposta à medicação para os sintomas motores (44,45). Outro estudo detetou o SIBO em apenas 25% dos doentes com DP; no entanto, existem inúmeras razões para esta discrepância, como, por exemplo, o facto de uma pequena parte dos doentes estudados estar a tomar antiácidos, algo que era um critério de exclusão específico para o recrutamento do estudo. Estes agentes causam hipocloridria, que, por sua vez, pode causar supercrescimento bacteriano no estômago e no intestino delgado superior. Por outro lado, até a própria dieta dos doentes pode afetar estes resultados. Ademais, este estudo revelou que o SIBO estava associado a uma predisposição para sintomas motores mais graves, mas não estava associado a sintomas gastrointestinais mais graves (47).

Um estudo analisou doentes recém-diagnosticados com DP. Observou-se que a permeabilidade intestinal destes doentes era relativamente mais elevada do que nos controlos saudáveis. Estes achados foram associados a uma coloração positiva para a *Escherichia coli* na mucosa do intestino e a uma exposição sistémica a LPS. Chegou-se, então, à hipótese de que este aumento da permeabilidade intestinal na DP era resultado de uma exposição da mucosa intestinal e do sistema imunológico da mucosa aos produtos das bactérias que se encontram no lúmen do intestino, que, por conseguinte, desencadeiam uma resposta inflamatória periférica (41). Neste estudo observaram-se, ainda, alterações nos doentes com DP que estavam relacionadas com a acumulação de alfa-sinucleína agregada no SNE. O SIBO pode induzir um estado inflamatório periférico, que, por sua vez, pode contribuir para o aumento da permeabilidade intestinal, promovendo a translocação de bactérias e endotoxinas através do epitélio intestinal, desencadeando a ativação microglial e estimulando o processo neurodegenerativo (Figura 5) (17,47).

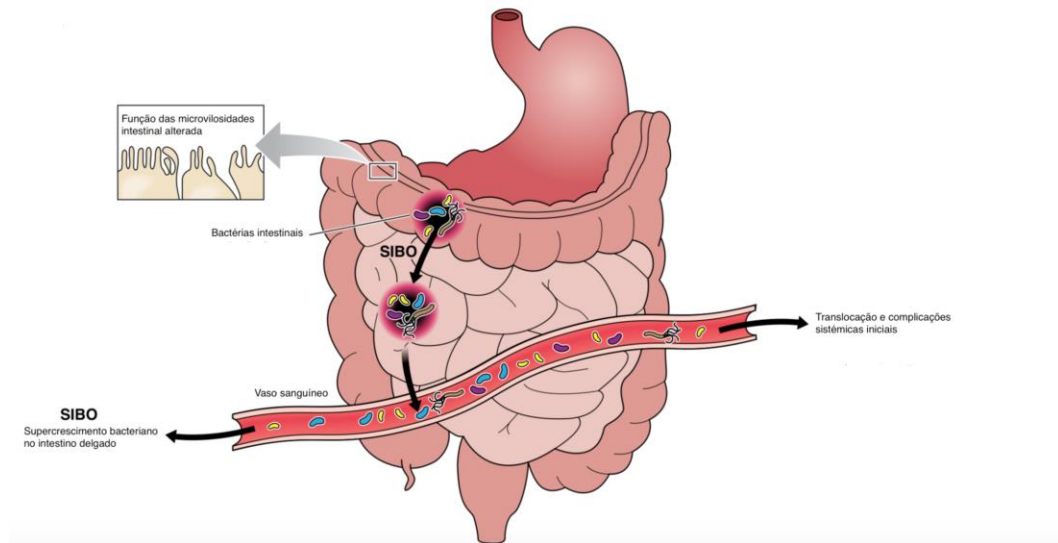


Figura 5 - Translocação da MI do cólon para o intestino delgado, causando SIBO. Através da ruptura da barreira endotelial intestinal, o SIBO facilita a entrada de uma parte da MI translocada na corrente sanguínea (Adaptado de Sekirov et al.) (48).

Estes achados reforçam a associação entre o SIBO e as alterações neurodegenerativas, que se podem dever a um aumento da inflamação periférica.

A nível global, estes estudos mostram que os fatores externos e internos associados à DP são capazes de alterar o microbioma entérico, o que, por sua vez, piora a patologia e os sintomas da DP. Por sua vez, a MI pode estar implicada na regulação da resposta inflamatória local e sistémica e na produção de mediadores pró-inflamatórios.

3. Eixo cérebro-intestino-microbiota na fisiopatologia inflamatória da doença de Parkinson

3.1 Mimetismo molecular

Foi proposto que a MI pode estar envolvida na neurodegeneração através do mecanismo de mimetismo molecular (MM). Friedland e colaboradores sugeriram que as proteínas bacterianas podem desencadear *cross-seed misfolding*, inflamação e *stress* oxidativo, além de toxicidade celular na neurodegeneração, iniciando ou influenciando a progressão da DP (2,49).

O MM é explicado pelas semelhanças nas sequências nucleotídicas ou na própria configuração proteica que existem entre algumas proteínas microbianas e algumas proteínas humanas. Estas podem cruzar-se entre si, levando a uma resposta inadequada do sistema imunitário. As respostas podem ser positivas ou negativas, podendo contribuir tanto para a promoção de respostas para a defesa do organismo, como para o desenvolvimento da doença (49). Na DP foi proposto que o cruzamento poderia acontecer entre uma proteína fibrilar exógena de origem bacteriana e uma proteína fibrilar endógena do humano, neste caso a alfa-sinucleína.

A vigilância imunológica que ocorre no intestino deve-se à capacidade de as células imunológicas, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e algumas células epiteliais, reconhecerem os microrganismos através da presença de PAMPs (50). Proteínas fibrilares das bactérias da MI intestinal são reconhecidas como PAMPs e causam ativação do recetor do tipo Toll 2 (TLR2), bem como de outros mediadores importantes da inflamação, como o fator nuclear-kappa B (NF- κ B), que é uma molécula mestre-reguladora da inflamação, assim como do recetor do tipo Toll 1 (TLR1) e do *cluster* de diferenciação 14 (CD14) (51). Os TLRs são expressos nas células do sistema imunológico e também em neurónios, e influenciam a produção de moléculas inflamatórias, como citocinas e quimiocinas (Figura 6). Uma ampla gama de moléculas ativa o TLR2, incluindo os peptidoglicanos e o ácido lipoteicóico, assim como o amiloide bacteriano, o péptido beta-amiloide e a alfa-sinucleína (50).

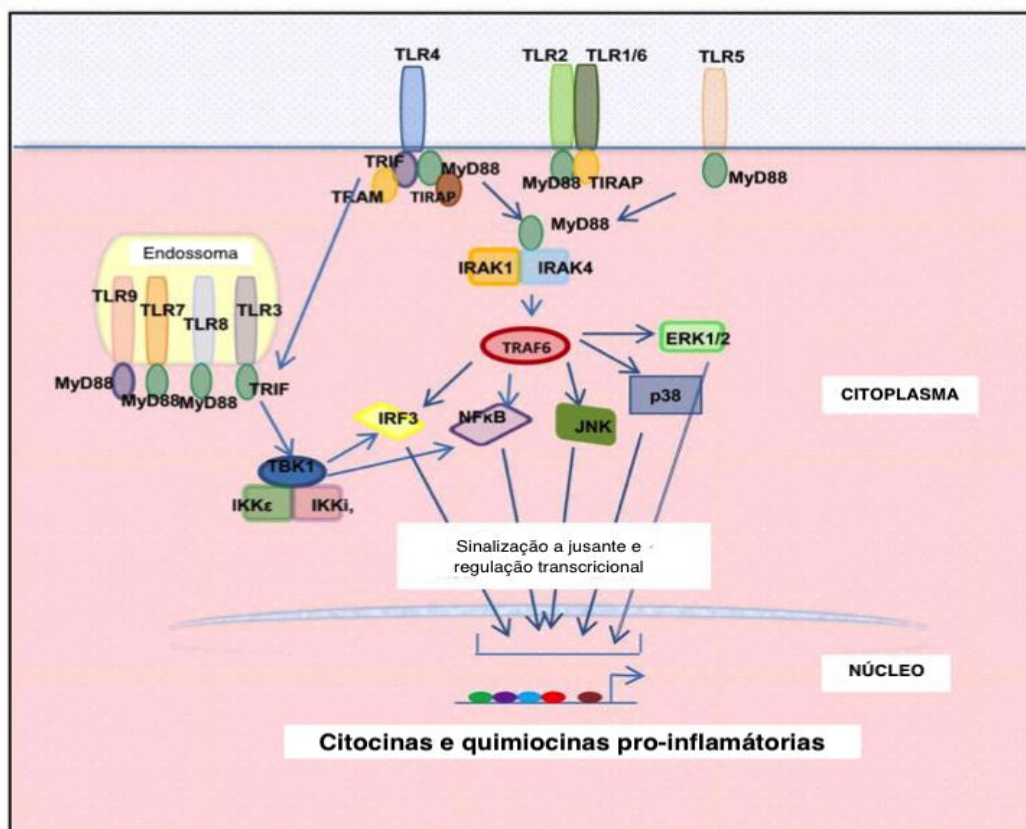


Figura 6 - Reconhecimento pelos TLRs de estruturas especializadas localizadas nos microrganismos denominadas de PAMPs. A distribuição celular dos TLRs representa o local do seu encontro com os agentes patogênicos - os TLRs que reconhecem as porções da parede celular destes agentes (TLR-2, -4, -5) estão presentes na membrana celular, ao passo que os TLRs que reconhecem os ácidos nucleicos (TLR3, -7, -8, -9) estão localizados no compartimento endossomal. TLR1 e TLR6 sinalizam através da heterodimerização com o TLR2 e, por isso, estão localizados na membrana celular. Após a ligação ao ligando, o domínio do receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR) dos TLRs associa-se ao domínio do receptor TIR das proteínas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM. O MyD88 é necessário para a sinalização de todos os TLRs, exceto o TLR3, que sinaliza juntamente com TLR4 através do caminho independente do TRIF dependente-MyD88. O TLR4 é único porque utiliza todas as quatro proteínas adaptadoras para sinalização. O uso de adaptadores alternativos fornece especificidade para a via de sinalização dos TLRs através da interação com os seus domínios da morte. Isto conduz à ativação de TRAF6, que ativa adicionalmente várias moléculas efetoras, tais como os fatores de transcrição NF- κ B, IRF3 e MAP quinases como p38, ERK1/2 e JNK. A jusante, os eventos de sinalização realizados por estas moléculas regulam a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Adaptado de Tarang S., et al.) (52).

Estudos demonstraram que bactérias residentes na MI produzem proteínas amiloides extracelulares (49). Curlin, uma proteína amiloide sintetizada pela *Escherichia coli* e pela *Salmonella typhimurium*, mostrou aumentar a colonização e a formação de biofilme. Foi demonstrado neste estudo que o TLR2 interage com TLR1 para reconhecer as fibrilas amiloides desta proteína (51). Concluíram que as fibrilas amiloides de curlin, presentes nos biofilmes enterobacterianos, podem contribuir significativamente para as respostas mediadas por TLR1/TLR2 do hospedeiro contra as células bacterianas intactas.

A ideia de que a inflamação no cérebro pode estar associada a um amiloide bacteriano foi proposta pela primeira vez por Trudler e seus colegas. Na hipótese proposta, o amiloide cerebral poderia mimetizar as infecções virais ou bacterianas que ocorrem no

organismo, ativando a via inflamatória através da ativação da glia por via da sinalização dos TLRs presentes na sua superfície (53), como acontece com o amiloide bacteriano. As células imunológicas expostas previamente ao amiloide bacteriano podem ser mais responsivas à presença do péptido beta-amiloide e da alfa-sinucleína no cérebro, uma vez que estas são também reconhecidas como PAMS. São considerados neste processo de reconhecimento tanto a microglia residente no cérebro, como os macrófagos circulantes que têm acesso ao cérebro (49).

3.2 Permeabilidade intestinal e as endotoxinas

O LPS é um dos principais componentes da parede bacteriana das bactérias gram-negativas e é responsável pela modulação da motilidade gastrointestinal, mas quando ultrapassa os seus efeitos fisiológicos, pode aumentar a permeabilidade do intestino (Figura 7). O LPS tem sido associado a reações pró-inflamatórias, através da via de sinalização LPS/TLR/NF-KB, e à produção de citocinas inflamatórias no intestino (54).

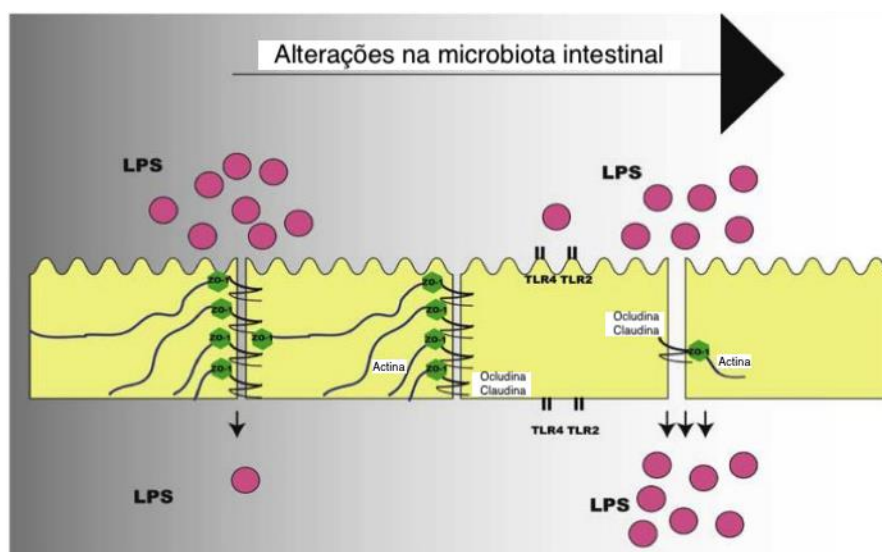


Figura 7 - Alterações na permeabilidade intestinal após alterações na MI (Adaptado de Caricilli et al.) (55).

Acredita-se que a fisiopatologia da DP possa ser influenciada por uma barreira epitelial intestinal alterada e por um processo pró-inflamatório subjacente, uma vez que se observou uma redução da expressão de ocludina nesta barreira (uma proteína das junções de oclusão), bem como alterações morfológicas (56). Foi também observado um aumento da expressão de RNA mensageiro das citocinas pró-inflamatórias nas biópsias colónicas de doentes com DP (57). Uns estudos mostraram que há uma disfunção das células gliais entéricas ao nível do SNE na DP (2). Estas células, que representam no trato digestivo o equivalente a astrócitos no cérebro, podem estar envolvidas na inflamação intestinal e na modulação da integridade da barreira epitelial intestinal. Devos e os seus colegas verificaram

que a expressão de citocinas e marcadores glias pró-inflamatórios está aumentada nas biópsias colônicas de doentes com DP e que esta está correlacionada com a duração da doença (57).

Uma das consequências negativas relacionadas com as alterações no perfil microbiano do intestino é o aumento da permeabilidade epitelial do intestino, que pode levar a inflamação local e sistêmica, provavelmente devido à translocação de bactérias ou antígenos bacterianos e endotoxinas (58). Acredita-se que a translocação de tais substâncias seja um fator ambiental que desencadeia a acumulação e a agregação da alfa-sinucleína no intestino dos doentes com DP (Figura 8) (12).

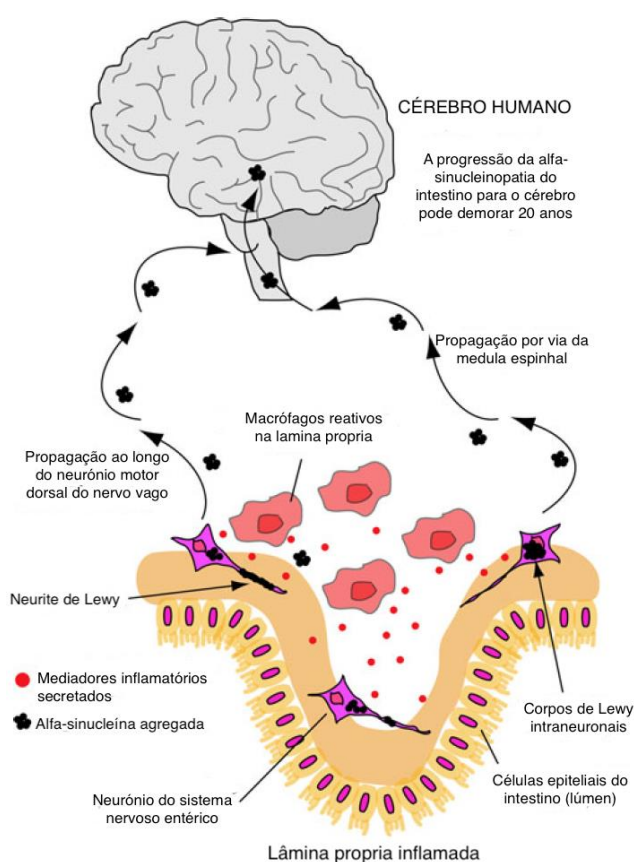


Figura 8 - Um possível caminho de disseminação da alfa-sinucleinopatia do SNE para o SNC. Os macrófagos da lâmina própria são reativos aos agentes patogênicos naturais (por exemplo, bactérias, vírus, etc.) ou induzidos (toxinas). Estas células reagem através da secreção de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, ROS, etc.), que podem danificar o tecido circundante e podem induzir a acumulação de alfa-sinucleína nos nervos entéricos. Isso pode alterar a atividade intestinal, o que, no início, pode ser observado por motilidade intestinal anormal e obstipação. A alfa-sinucleína agregada pode ser libertada pelas células nervosas danificadas, o que pode ativar ainda mais os macrófagos locais. Além disso, a transmissão célula a célula pode contribuir para a progressão da alfa-sinucleinopatia, que acabaria por se propagar do SNE para o SNC através do nervo vago e da medula espinhal (Adaptado de Lema Tomé C. M. et al.) (19).

Forsyth e os seus colaboradores mostraram que havia uma exposição excessiva a LPS em doentes com DP, dado que havia menos proteínas séricas de ligação a LPS (LBP) no plasma de doentes com DP em comparação aos indivíduos saudáveis. Observaram também que havia uma coloração positiva do antigénio da *Escherichia coli* nas biópsias colhidas da mucosa do colón sigmoide. Estes achados sugeriram fortemente que a permeabilidade intestinal aumentada observada na DP pode ser uma consequência da exposição da mucosa intestinal e do sistema imunitário da mucosa aos produtos das bactérias que se encontram no lúmen do intestino, como, por exemplo, aos LPS. A translocação de produtos das bactérias que estão no lúmen pode levar a lesão oxidativa dos neurónios entéricos da mucosa intestinal e a agregação de alfa-sinucleína. Além disso, a presença de *Escherichia coli* na mucosa do colón sigmoide nos doentes com DP não suporta apenas a conclusão de que há uma maior permeabilidade para os LPS através das células epiteliais intestinais, mas também que há uma possibilidade de os LPS ficarem presos na mucosa intestinal (41).

Num modelo experimental, foi sugerido que a endotoxina LPS poderia ser um possível desencadeante da inflamação na DP através do TNF α (41). A administração de LPS sistemicamente ou diretamente no SNC tem sido utilizada em vários estudos com modelos de animais no estudo da fisiopatologia inflamatória da DP. No estudo de Qin e os seus colegas, com base em murganhos adultos, foi demonstrado que uma única injeção intraperitoneal de LPS era capaz de iniciar a produção de TNF α na periferia, o que, por sua vez, desencadeou o início da produção de TNF α também no cérebro e que continuou durante vastos meses mesmo após o cessar do agente desencadeante. Isto quer dizer que bastou um único evento pró-inflamatório na periferia para induzir neuroinflamação crónica no cérebro do murganho adulto. O TNF α sistémico e a administração de LPS desencadeou a ativação da microglia e aumentou a expressão de fatores pró-inflamatórios no cérebro. Eles também observaram que a administração de LPS em murganhos adultos estava relacionada com uma perda tardia e progressiva dos neurónios dopaminérgicos, mecanismo semelhante ao que ocorre na DP (59).

3.3 Ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs)

Os AGCCs são produzidos endogenamente no intestino grosso e são conhecidos por modular as funções intestinais. Os AGCCs são gerados no intestino grosso como resultado da fermentação bacteriana das fibras provenientes da dieta e do amido (60). Acetato, propionato e butirato são os principais AGCCs presentes no lúmen do colón, onde são utilizados pelos hospedeiros como substrato energético e como moléculas sinalizadoras (61).

Os estudos conduzidos por Scheperjan e por Keshavarzian demonstraram que havia associação entre a abundância de uma certa microbiota no intestino e a DP, e que as bactérias com capacidade de produzir AGCCs são reduzidas na DP (12,13). Os AGCCs são

capazes de modular a atividade do SNE e, por sua vez, aumentar a motilidade gastrointestinal. O butirato parece ser capaz de regular a homeostase da mucosa do cólon e modular a excitabilidade neuronal (60).

No estudo de Unger e dos seus colegas, identificou-se uma redução significativa de acetato, propionato e butirato nas amostras fecais dos doentes com DP em comparação aos controlos saudáveis. Quanto às concentrações de butirato, tanto as absolutas como as relativas estavam significativamente reduzidas nos doentes com DP. O butirato atua localmente na mucosa do cólon, mas também pode exercer efeitos remotos através do SNE, como, por exemplo, na alteração da atividade dos neurónios entéricos por hiperpolarização reversível. As concentrações de butirato nas fezes dos doentes com DP parecem exercer efeitos relevantes sobre o SNE e contribuir para a dismotilidade gastrointestinal, um sintoma não motor frequente na DP (39).

Num estudo em murganhos, analisou-se a função da MI do hospedeiro na homeostase da microglia. Murganhos *germ-free* apresentaram defeitos globais na microglia, como, por exemplo, proporções celulares alteradas e um fenótipo imaturo, o que desencadeou respostas imunológicas inatas inadequadas por parte da microglia. Observou-se que uma erradicação temporal da MI hospedeira afeta severamente as propriedades da microglia e uma MI pouco complexa também. Em contraste, a recolonização dos murganhos com uma MI complexa restaurou parcialmente os recursos necessários para a maturação da microglia. Foi demonstrado que produtos bacterianos ou metabólitos das bactérias da MI, como os AGCCs, são moléculas-chave que modulam a maturação, a morfologia e a função da microglia. Os AGCCs podem translocar-se da mucosa intestinal para a circulação sistémica, onde podem afetar a regulação imunológica e a função do SNC. Murganhos sem o recetor FFAR2 para os AGCC mostraram possuir defeitos na maturação da microglia em condições livres de agentes patogénicos (38). Estas alterações na microglia podem levar a respostas imunológicas precoces após exposição a padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) ou devido a estimulação por agentes patogénicos, como os LPS.

Em resumo, a MI parece influenciar o processo inflamatório da DP através dos seus produtos, alguns dos quais mostraram ser prejudiciais e outros benéficos. A alfa-sinucleína agregada no SNC pode imitar, através do mecanismo do MI, as infeções bacterianas e virais, que podem, através dos TLRs, desencadear a ativação da microglia. A translocação de endotoxinas, como o LPS, através de uma membrana intestinal com permeabilidade alterada, pode desencadear um processo inflamatório local que leva a lesão dos tecidos circundantes e a agregação da alfa-sinucleína nos nervos entéricos. Por outro lado, a falta de certas bactérias na MI leva à falta de produção de AGCCs, o que parece influenciar a função da microglia, importante na neuroinflamação.

4. TLRs (recetores do tipo Toll)

4.1. TLRs na doença de Parkinson

Apesar de ainda não se saber a verdadeira etiologia da DP esporádica, há evidências de que agregados de alfa-sinucleína com conformação alterada ativam as células da microglia no SNC, promovendo a inflamação e o *stress* oxidativo e levando à neurodegeneração (2,49). A alfa-sinucleína é reconhecida como um PAMP ou um padrão molecular associado a danos (DAMP) pelos TLRs presentes na membrana da microglia, levando a translocação nuclear de NF- κ B e ao aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias, TNF α e IL-1 β , através do envolvimento do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (22).

Há uns anos, um estudo constatou a existência de uma regulação “positiva” do TLR2 em vários modelos de animais de doenças neurodegenerativas, incluindo modelos da doença de Alzheimer e da DP. Nos estudos, foi argumentado que esta resposta pelo TLR2 poderia fazer parte de uma fase efetora neuroinflamatória não específica, em vez de uma causa específica da doença (62). Julga-se que o que poderá ser específico é a forma como o processo inflamatório é ativado através dos TLRs.

Outro estudo revelou que os agregados proteicos patogénicos existentes no corpo humano, que se encontram dentro dos neurónios, podem atuar como um agonista endógeno para ativar a via do TLR2. Assim, os agregados de alfa-sinucleína podem ser considerados como agonistas endógenos do TLR2 que ativam a microglia, a qual se torna neurotóxica, promovendo a neurodegeneração (21). Neste estudo foi também questionado o porquê de a alfa-sinucleína oligomérica ser considerada a forma neurotóxica na DP e não a forma fibrilar (16,22). Revelou-se que a ativação de TLR2 pela alfa-sinucleína é altamente sensível à conformação da proteína. A alfa-sinucleína puramente monomérica e fibrilar não consegue ativar o TLR2. Os oligómeros de alfa-sinucleína, através da ativação do TLR2, são indutores de imunidade inata inflamatória no sistema nervoso. No entanto, a oligomerização em si também não parece ser suficiente para a ativação do TLR2, pelo que foi sugerido que deve haver alguma modificação nos monómeros ou nos dímeros, que ocorre nas células, e que é necessária para a atividade agonista do TLR2 (21).

O receptor do tipo Toll 4 (TLR4) também tem sido implicado na DP. O TLR4 parece interagir com a alfa-sinucleína, ativar a microglia, assim como intervir em processos como captação da alfa-sinucleína, libertação de citocinas pró-inflamatórias e promoção do *stress* oxidativo. Um estudo *in vivo* em murganhos, realizado por Fellner e colaboradores, revelou que o TLR4 tem um papel modulatório importante nas respostas pró-inflamatórias da glia e na produção de ROS quando estimulado pela alfa-sinucleína. Demonstrou que a fagocitose

microglial, a libertação de moléculas pró-inflamatórias e a produção de óxido nítrico diminuem após a exposição da alfa-sinucleína às células microgliais desprovidas de recetores TLR4 (63). Outro estudo prévio já tinha demonstrado que ratos deficientes em TLR4 são menos vulneráveis à intoxicação por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), toxina usada para induzir Parkinsonismo nos modelos animais com DP, do que nos murganhos normais. Os murganhos sem os recetores TLR4 exibem um número menor de células microgliais ativadas após a estimulação por MPTP, comparativamente aos que possuem estes recetores. Desta forma, sugere-se que a via de sinalização de TLR4 está envolvida na DP experimental, isto é, a ausência genética da sinalização de TLR4 parece proteger os ratos da neurodegeneração, o que destaca o papel primordial do TLR4 no desenvolvimento da DP (64).

De todos os tipos de TLRs existentes, os que mais parecem contribuir para o desenvolvimento da DP são o TLR2 e o TLR4. No entanto, o estudo de Stefanova e colegas, demonstraram que podem existir duas vertentes diferentes do comportamento do TLR4 na DP. Por um lado, a sinalização do TLR4 desequilibrada pode desempenhar um papel crucial na progressão da alfa-sinucleinopatia, através da libertação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF α , pela microglia, que leva ao comprometimento motor e à perda de neurónios e fibras dopaminérgicas nigroestriatais. No estudo acima, este mecanismo foi observado em murganhos desprovidos de recetores TLR4 (63). Por outro lado, a expressão do TLR4 na microglia pode desempenhar um mecanismo importante na depuração da alfa-sinucleína, que foi observado em murganhos transgênicos que expressavam TLR4 especificamente em oligodendrócitos. Eles sugeriram com este estudo que a progressão da DP e os distúrbios relacionados com as características patológicas da alfa-sinucleína podem ser resultado de um comprometimento primário da microglia a longo prazo, que pode dever-se a uma disfunção relacionada com a idade ou até mesmo a uma predisposição genética do humano e a fatores externos. A alfa-sinucleína extracelular é reconhecida como uma DAMP e a falta de TLR4 tem mostrado prejudicar a resposta fagocítica da microglia à alfa-sinucleína, com consequente acumulação de alfa-sinucleína e aumento da neurodegeneração dopaminérgica na *substantia nigra*, destacando-se o efeito neuroprotetor da sinalização de TLR4 (65).

A função dos TLRs na DP pode, então, ter duas funções, que ainda estão em investigação. Por um lado, a sua ativação na microglia pode desencadear neurotoxicidade, e, por outro, pode ser essencial para remover a alfa-sinucleína agregada, tendo, portanto, uma função neuroprotetora (21).

4.2 Interação da microbiota intestinal com os TLRs na doença de Parkinson

Os TLRs são também capazes de reconhecer as moléculas de origem microbiana, denominadas MAMPs. Recentemente, os TLRs demonstraram ter uma nova função no controlo da homeostase do epitélio intestinal e na proteção do dano epitelial (66). A expressão de TLRs em células do epitélio intestinal está associada à regulação das funções da barreira (61).

O estado ativado adquirido da microglia em resposta à acumulação de agregados de proteínas de conformação alterada e à neurodegeneração é um processo denominado por *priming* microglial, semelhante à teoria emergente de “imunidade treinada” ou “memória imunológica inata”, consistindo na reprogramação epigenética e metabólica das células imunológicas inatas após um estímulo inicial (67). Um estudo evidenciou que macrófagos derivados das células-tronco hematopoiéticas humanas, estimulados por um agonista TLR2 durante a sua diferenciação e posteriormente inoculados em murganhos irradiados, evidenciam uma resposta ao estímulo inflamatório mais suave, libertando uma quantidade reduzida de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigénio (68). Foi, assim, demonstrado que possuíam um fenótipo mais tolerante, sendo sugestivo que o mesmo aconteça com a microglia.

A função da barreira intestinal está prejudicada em doentes com DP, colocando-os em maior risco de exposição a produtos microbianos, pelo que a translocação de bactérias ou produtos derivados de bactérias, como os LPS (um ligante de TLR4), pode induzir uma inflamação sistémica, produzindo neurodegeneração mais grave (67). Recentemente, um estudo de Rumio e dos seus colegas demonstrou (em humanos e murganhos) que as células do músculo liso do intestino e as células do plexo mioentérico expressam o recetor TLR4, recetor específico do LPS. Neste estudo, o tratamento *in vivo* com o LPS induziu translocação nuclear de NF- κ B em células do músculo liso intestinal e células do plexo mioentérico em murganhos do tipo selvagem, mas não em murganhos desprovidos de TLR4. Nos humanos, a túnica muscular humana, desprovida de tecido epitelial e conjuntivo, produziu grandes quantidades de IL-8. Estes resultados apontaram para a hipótese de que as células do músculo do jejuno têm uma função na produção de IL-8 induzida por LPS *in vivo*. O estudo também revelou que os enterócitos do intestino delgado são desprovidos de TLR4 ou apresentam apenas quantidades pequenas de TLR4 (69). Outro estudo posterior revelou que o TLR4, que reconhece o LPS, está presente nos plexos mioentérico e submucoso do intestino de roedores e no íleo humano, assim como nos neurónios sensoriais primários dos gânglios da raiz dorsal inferior. O mesmo estudo também demonstrou que a imunomarcação de TLR4 é mais forte no intestino grosso distal dos roedores. Neste tecido, a expressão de TLRs estava presente tanto nos neurónios como nas células gliais entéricas do SNE. Estas observações indicam que a rede neural entérica pode ser diretamente ativada por componentes bacterianos e virais e,

portanto, está mais na linha da frente do que se previa anteriormente nas respostas de defesa da parede intestinal e na interação cruzada com a MI (70).

O estudo de Anitha e colaboradores demonstrou o lado positivo da interação entre a MI e os TLR4, isto é, a sinalização de TLR4 é importante nos neurónios entéricos e pode participar na modulação da motilidade intestinal. A ativação de TLR4 e de NF- κ B pelos LPS parece promover a sobrevivência dos neurónios entéricos. A falta de TLR4 está associada à redução da motilidade GI e de respostas imunológicas através da via MyD88. A interação entre os neurónios entéricos e a MI aumenta a sobrevivência de neurónios nos murganhos (71).

Em relação aos AGCCs, produtos derivados de bactérias da MI, achados recentes revelaram a presença de butirato em alta concentração no cólon nos humanos. Foram usadas células-L enteroendócrinas humanas que respondem à fermentação microbiana através do aumento da expressão dos recetores de MAMP, aumentando a sensibilidade da MI. Além disso, observamos uma expressão aumentada de TLR4 dependente do butirato e uma regulação positiva de outros TLRs dependente também do butirato, que, por sua vez, levou a uma maior resposta de NF- κ B. Por conseguinte, foi proposto que o butirato poderia participar nas respostas imunológicas das células-L, aumentando a sensibilidade microbiana através da regulação positiva da expressão de TLRs (61). Este estudo revelou, assim, a importância do butirato na regulação da identificação microbiana através de TLRs.

O transplante de microbiota fecal de murganhos saudáveis para os murganhos com DP revelou ser capaz de reduzir a ativação da microglia e dos astrócitos na *substantia nigra* e reduzir a expressão dos componentes da via de sinalização de TLR4/TNF α no intestino e no cérebro destes murganhos. Neste estudo, demonstrou-se que a disbiose microbiana intestinal está envolvida na patologia da DP e que o transplante de microbiota fecal de controlos saudáveis pode proteger os modelos animais de DP através da supressão da neuroinflamação e da redução da sinalização de TLR4/TNF α (72).

A MI corresponde a uma enorme carga antigénica residente no intestino e pode constituir um perigo potencial significativo se não for mantida sob vigilância contínua, como, por exemplo, pelo mecanismo de deteção dos TLRs. No entanto, a MI comensal necessária para a estimulação constante do sistema imunitário e para a deteção mediada por TLRs dos micro-organismos pode desempenhar um papel duplo no desenvolvimento da doença. Por um lado, como fonte de sinais inflamatórios patogénicos que podem levar à doença, mas, por outro, apresentar uma função reguladora, isto é, protetora (70).

De seguida, é apresentada uma tabela (Tabela 1) com os principais achados desta dissertação, relativamente à relação entre a microbiota e os seus produtos e a fisiopatologia inflamatória da DP.

Tabela 1 - Tabela dos principais achados.

Microbiota e os seus produtos	Fisiopatologia da DP	Referências
Disbiose intestinal	Alteração da permeabilidade intestinal	(39,58)
	Ativação da microglia	(38,43)
	Redução de AGCCs e da mucina	(12)
	Redução dos efeitos anti-inflamatórios	(39,40)
SIBO	Aumento da permeabilidade intestinal	(17,47,48)
Endotoxinas, p. ex.: LPS	Aumento da permeabilidade intestinal	(41,42)
	Stress oxidativo e agregação de alfa-sinucleína	(41)
	Sinalização por TLRs no intestino	(54, 67, 69, 70)
	Estimulação da produção de citocinas inflamatórias	(59)
Proteínas bacterianas	Inflamação, <i>stress</i> oxidativo	(49)
	Ativação dos TLRs	(51)
	Mimetismo com amiloide cerebral, que ativa a glia	(53)
Redução de AGCCs	Alteração da maturação da microglia	(39)
	Alterações no SNE e dismotilidade gastrointestinal	(38)
	Sinalização por TLRs	(61)

Conclusão e cenários futuros

A DP esporádica é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, e foi proposto que esta poderia iniciar-se no intestino, através do SNE, e não no cérebro. Neste trabalho observamos que a MI na DP sofre alterações, podendo haver uma ausência ou uma redução de micro-organismos protetores ou um aumento de micro-organismos patogénicos, ou até ambas as situações em simultâneo. Por sua vez, esta disbiose pode resultar na produção diferencial de moléculas microbianas no intestino e alterar a permeabilidade da barreira epitelial intestinal. Os produtos produzidos por esta MI alterada podem entrar na circulação (ou até mesmo no cérebro) e afetar a função neurológica. No intestino, os produtos das bactérias podem desencadear um processo inflamatório que conduzirá à agregação da alfa-sinucleína no SNE e que, posteriormente, poderá migrar até ao SNC. A conformação específica da alfa-sinucleína ativa a microglia e induz uma resposta imunológica complexa, aumentando a expressão de TLRs e de vários mediadores pró-inflamatórios e causando neuroinflamação, que, por sua vez, causará a neurodegeneração na DP (Figura 9).

Os produtos microbianos identificados na DP poderão servir como biomarcadores da doença ou até mesmo como alvos de medicamentos. As intervenções que corrijam a disbiose podem fornecer tratamentos seguros e eficazes para retardar ou interromper a progressão de sintomas motores frequentemente debilitantes.

A maior parte das interações entre o eixo cérebro-intestino-microbiota dá-se através dos TLRs. As evidências emergentes descritas acima sugerem a existência de uma rede de sinalização de TLRs multifacetada que influencia os circuitos neurais e os processos mediados pelo sistema imunológico, tanto no intestino como no cérebro. A realização de outros estudos no futuro, focados na descoberta dos fatores derivados da MI responsáveis pela sinalização dos TLRs e os consequentes resultados da ativação dos TLRs, tanto no SNE quanto no SNC, fornecerão novas luzes sobre o complexo diálogo entre o hospedeiro e a MI na DP, bem como noutras doenças neurodegenerativas.

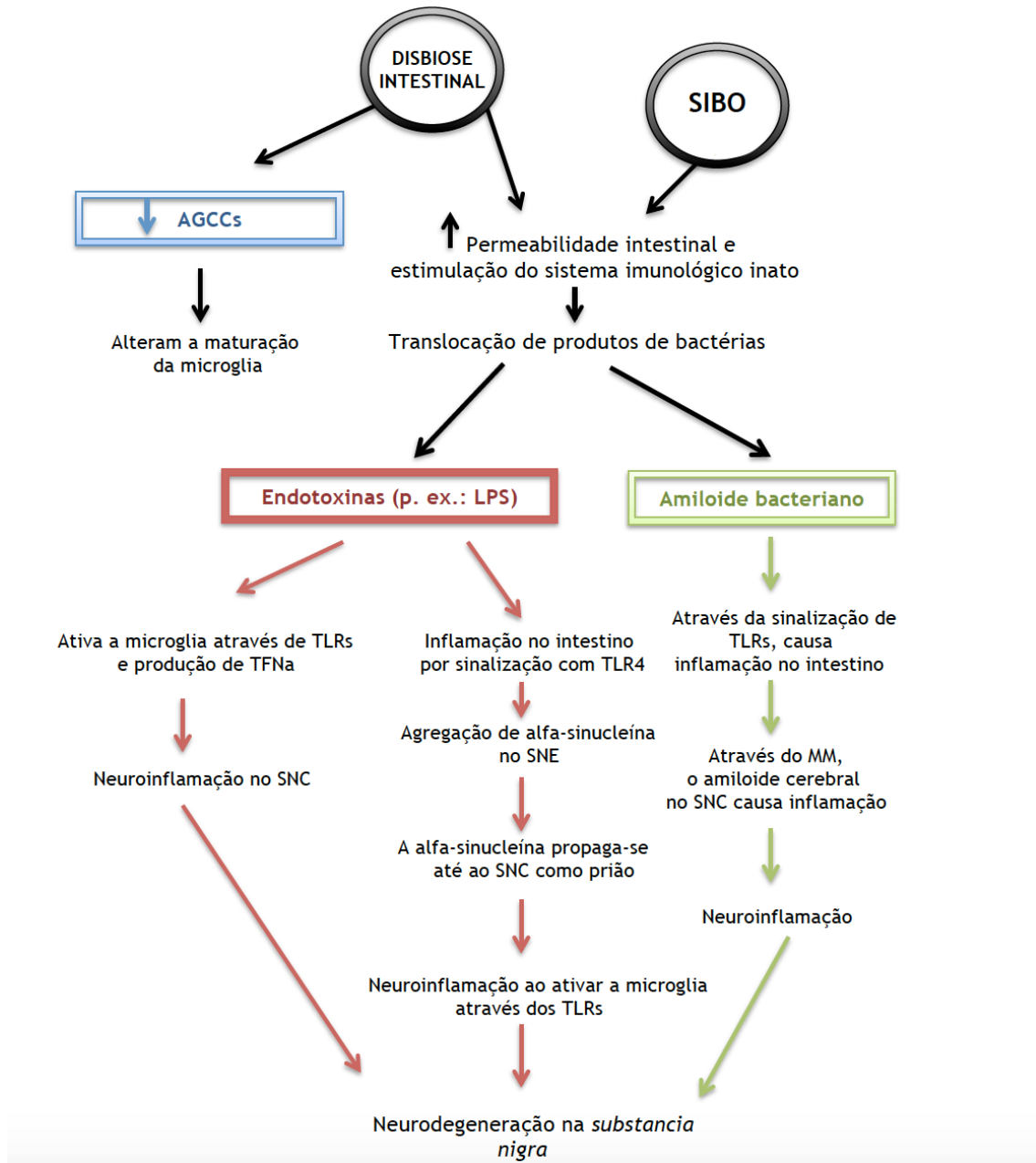


Figura 9 - Figura resumo.

Bibliografia

1. Parashar A, Udayabanu M. Gut microbiota: Implications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017 May;38:1-7.
2. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct;21(37):10609-20.
3. Mukherjee A, Biswas A, Das SK. Gut dysfunction in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol*. 2016 Jul;22(25):5742-52.
4. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar;464(7285):59-65.
5. Franzosa EA, Huang K, Meadow JF, Gevers D, Lemon KP, Bohannan BJM, et al. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jun;112(22):E2930-8.
6. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2017 Mar;3:17013.
7. Jellinger KA. The pathomechanisms underlying Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 2014 Feb;14(2):199-215.
8. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res*. 2018;2018:4784268.
9. Calabrese V, Santoro A, Monti D, Crupi R, Di Paola R, Latteri S, et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2018 Feb;115:80-91.
10. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016 Aug;353(6301):777-83.
11. Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2018 Jan;109(Pt B):249-57.
12. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015 Mar;30(3):350-8.
13. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015 Sep;30(10):1351-60.
14. Kalia L V, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*. 2015 Aug;386(9996):896-912.
15. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 2014 Sep;46(9):989-93.

16. Li X, Yang W, Li X, Chen M, Liu C, Yu S. Age-dependent elevations of oligomeric and phosphorylated alpha-synuclein synchronously occurs in the brain and gastrointestinal tract of cynomolgus monkeys. *Neurosci Lett*. 2018 Jan;662:276-82.
17. Fasano A, Visanji NP, Liu LWC, Lang AE, Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2015 Jun;14(6):625-39.
18. Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, Pellene A, Calandra CR, Gutierrez C, et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol*. 2013 May;260(5):1332-8.
19. Lema Tome CM, Tyson T, Rey NL, Grathwohl S, Britschgi M, Brundin P. Inflammation and alpha-synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link?. *Mol Neurobiol*. 2013 Apr;47(2):561-74.
20. Harms AS, Delic V, Thome AD, Bryant N, Liu Z, Chandra S, et al. α -Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. *Acta Neuropathol Commun*. 2017 Nov 21;5(1):85.
21. Kim C, Ho D-H, Suk J-E, You S, Michael S, Kang J, et al. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*. 2013;4:1562.
22. Daniele SG, Beraud D, Davenport C, Cheng K, Yin H, Maguire-Zeiss KA. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded alpha-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal*. 2015 May;8(376):ra45.
23. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *Lancet Neurol*. 2009 Apr;8(4):382-97.
24. Bottner M, Zorenkov D, Hellwig I, Barrenschee M, Harde J, Fricke T, et al. Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol Dis*. 2012 Dec;48(3):474-80.
25. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen J-M, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*. 2010 Sep;5(9):e12728.
26. Olanow CW, Brundin P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder?. *Mov Disord*. 2013 Jan;28(1):31-40.
27. Klingelhoefer L, Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol*. 2015 Nov;11(11):625-36.
28. Ruffmann C, Parkkinen L. Gut Feelings About alpha-Synuclein in Gastrointestinal Biopsies: Biomarker in the Making?. *Mov Disord*. 2016 Feb;31(2):193-202.
29. Kuo Y-M, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani AK, Orrison BM, et al. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet*. 2010 May;19(9):1633-50.

30. Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. 2006 Mar;396(1):67-72.
31. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Jul;1170:615-22.
32. Ubeda-Banon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A. alpha-Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology. *Brain Struct Funct*. 2014 Sep;219(5):1513-26.
33. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Bjorklund T, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol*. 2014 Dec;128(6):805-20.
34. Svensson E, Horvath-Puho E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2015 Oct;78(4):522-9.
35. Cassani E, Barichella M, Canello R, Cavanna F, Iorio L, Cereda E, et al. Increased urinary indoxyl sulfate (indican): new insights into gut dysbiosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015 Apr;21(4):389-93.
36. Quigley EMM. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017 Oct;17(12):94.
37. Kiebertz K, Wunderle KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord*. 2013 Jan;28(1):8-13.
38. Erny D, Hrabé de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. 2015 Jul;18(7):965-77.
39. Unger MM, Spiegel J, Dillmann K-U, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;32:66-72.
40. Martin R, Miquel S, Chain F, Natividad JM, Jury J, Lu J, et al. Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol*. 2015 Mar;15:67.
41. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH, Voigt RM, Shaikh M, Jaglin JA, et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One*. 2011;6(12):e28032.
42. Kelly LP, Carvey PM, Keshavarzian A, Shannon KM, Shaikh M, Bakay RAE, et al. Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2014 Jul;29(8):999-1009.
43. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016 Dec;167(6):1469-1480.e12.

44. Gabrielli M, Bonazzi P, Scarpellini E, Bendia E, Lauritano EC, Fasano A, et al. Prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011 Apr;26(5):889-92.
45. Fasano A, Bove F, Gabrielli M, Petracca M, Zocco MA, Ragazzoni E, et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013 Aug;28(9):1241-9.
46. Niu X-L, Liu L, Song Z-X, Li Q, Wang Z-H, Zhang J-L, et al. Prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in Chinese patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2016 Dec;123(12):1381-6.
47. Tan AH, Mahadeva S, Thalha AM, Gibson PR, Kiew CK, Yeat CM, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 May;20(5):535-40.
48. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904.
49. Friedland RP. Mechanisms of molecular mimicry involving the microbiota in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2015;45(2):349-62.
50. Li J, Lee DSW, Madrenas J. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol.* 2013 Oct;4:347.
51. Tukel C, Nishimori JH, Wilson RP, Winter MG, Keestra AM, van Putten JPM, et al. Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell Microbiol.* 2010 Oct;12(10):1495-505.
52. Tarang S, Kumar S, Batra SK. Mucins and toll-like receptors: kith and kin in infection and cancer. *Cancer Lett.* 2012/02/03. 2012 Aug 28;321(2):110-9.
53. Trudler D, Farfara D, Frenkel D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1-12.
54. Fang X. Potential role of gut microbiota and tissue barriers in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci.* 2016 Sep;126(9):771-6.
55. Caricilli AM, Saad MJA. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients.* 2013 Mar;5(3):829-51.
56. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, Bourreille A, Le Dily S, Vavasseur F, et al. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2015 Mar;3:12.
57. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, et al. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2013 Feb;50:42-8.
58. Felice VD, Quigley EM, Sullivan AM, O'Keefe GW, O'Mahony SM. Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Jun;27:1-8.

59. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong J-S, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr;55(5):453-62.
60. Soret R, Chevalier J, De Coppet P, Poupeau G, Derkinderen P, Segain JP, et al. Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1772-82.
61. Larraufie P, Dore J, Lapaque N, Blottiere HM. TLR ligands and butyrate increase Pyy expression through two distinct but inter-regulated pathways. *Cell Microbiol*. 2017 Feb;19(2):e12648.
62. Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, et al. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging*. 2009 May;30(5):759-68.
63. Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, et al. Toll-like receptor 4 is required for alpha-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. 2013 Mar;61(3):349-60.
64. Noelker C, Morel L, Lescot T, Osterloh A, Alvarez-Fischer D, Breloer M, et al. Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. *Sci Rep*. 2013;3:1393.
65. Stefanova N, Fellner L, Reindl M, Masliah E, Poewe W, Wenning GK. Toll-like receptor 4 promotes alpha-synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *Am J Pathol*. 2011 Aug;179(2):954-63.
66. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb;124(4):783-801.
67. Caputi V, Giron MC. Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun;19(6):1689.
68. Yanez A, Hassanzadeh-Kiabi N, Ng MY, Megias J, Subramanian A, Liu GY, et al. Detection of a TLR2 agonist by hematopoietic stem and progenitor cells impacts the function of the macrophages they produce. *Eur J Immunol*. 2013 Aug;43(8):2114-25.
69. Rumio C, Besusso D, Arnaboldi F, Palazzo M, Selleri S, Gariboldi S, et al. Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. *J Cell Physiol*. 2006 Jul;208(1):47-54.
70. Barajon I, Serrao G, Arnaboldi F, Opizzi E, Ripamonti G, Balsari A, et al. Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem*. 2009 Nov;57(11):1013-23.
71. Anitha M, Vijay-Kumar M, Sitaraman S V, Gewirtz AT, Srinivasan S. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*. 2012 Oct;143(4):1006-16.e4.
72. Sun M-F, Zhu Y-L, Zhou Z-L, Jia X-B, Xu Y-D, Yang Q, et al. Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF-alpha signaling pathway. *Brain Behav Immun*. 2018 May;70:48-60.

