

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Atividade das β -glucanas secretadas pelo *Ganoderma lucidum* na microbiota intestinal em modelos experimentais de colite ou Doença de Parkinson.

Thaís Bergmann de Castro

Brasília

2020

Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Atividade das β -glucanas secretadas pelo *Ganoderma lucidum* na microbiota intestinal em modelos experimentais de colite ou Doença de Parkinson.

Dissertação de Mestrado
apresentado para obtenção do
título de Mestre no programa de
pós-graduação de Patologia
Molecular – Faculdade de
Medicina – Universidade de
Brasília

AUTORA: THAÍS BERGMANN DE CASTRO

ORIENTADORA: ANAMÉLIA LORENZETTI BOCCA

Brasília

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Sigrid e Luiz, por todo apoio dado não só durante esses dois anos, mas durante uma vida inteira de paciência, exemplos e infinitos auxílios para que eu chegasse aqui e concretizasse esse objetivo.

Aos meus irmãos, Daniel e Felipe, obrigada pelas risadas, pelas diversas ideias biotecnológicas milionárias e por todos os momentos felizes e acolhedores vividos em família, somos extremamente diferentes, mas complementares nas mais diversas situações.

À minha cunhada Laís, obrigada por ser uma adição tão positiva e animada a nossa família e por todas garrafas de champagne divididas.

Ao meu companheiro durante esses 2 anos, João, que não poupou esforços para me apoiar, motivar e ajudar durante todo esse percurso. Sou eternamente grata por todo aprendizado e paciência durante essa fase.

Às minhas cachorras, Maya, Mischa e Mocha, pelas recepções calorosas e animadas em cada retorno, pela companhia e por tornar suportável até os piores dias.

Às minhas amigas e aos meus amigos, Beatriz Cavendish, Marina Carvalho, Julia Faure, Caroline Fernandes, Letícia François, Luciana Galliac, Isabela Czarneski, Camila Bontempo, Priscilla Dias, Gabriel Malachias e tantos outros, obrigada por uma vida de boas memórias, por todas as noites escutando meus problemas nessa fase e por todo apoio dado. Um agradecimento especial à Bia, que me fez sentir acolhida por compartilhar dos mesmos sofrimentos e vitórias.

A todos os membros do LIA, que tornaram esses anos mais fáceis compartilhando conhecimento e dicas.

Aos meus colegas de laboratório, Clara Luna, Pedro Burgel, Stephan Oliveira, Raffael Castro, Tatiana Herman, Camila Goersch, Luísa Favilla, Lucas Las Casas, Paulo Veloso, Karina Simon, Mariana Miguel e Angelina Basso, que tornaram esses anos mais felizes e divertidos, obrigada por todos os conselhos no dia a dia e por todas as fofocas de bar. Um agradecimento especial a Clara que me acompanhou com toda a paciência do mundo na saga dos PCRs e ao Raffa que sempre foi minha enciclopédia ambulante.

Aos meus novos colegas, Camila Cardador e Mosar Correa, que trouxeram novas oportunidades e aprendizados.

À minha orientadora, Anamélia Bocca, por ter me acolhido durante esses anos, por todo apoio intelectual e emocional dado e por ser um exemplo a ser seguido tanto pela bondade quanto pela inteligência e engajamento.

Aos colaboradores, Leonora Vianna, Christian Hoffman e José Luiz Jivago pela importante contribuição a este trabalho.

À banca, Aldo Tavares, Márcia Mortari e Ricardo Titze, agradeço por terem aceitado participar desse momento e por todos os comentários e críticas construtivas que virão dessa defesa.

Finalmente, à FAPDF, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Resumo	10
Abstract.....	12
Introdução	14
Microbiota	14
Fatores Moduladores da microbiota	18
Modulação da microbiota pela β -glucana do <i>Ganoderma lucidum</i>	22
Capítulo I	24
Introdução	24
Colite	24
Objetivo	28
Objetivo Geral	28
Objetivos específicos.....	28
Materiais e métodos.....	29
Cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i>	29
Obtenção de β -glucanas de <i>Ganoderma lucidum</i>	29
Quantificação de β -glucanas	30
Animais	30
Indução de colite	31
Real Time PCR.....	32
Análises histopatológicas.....	33
Resultados	33
Influência da β -glucana na indução de colite em modelo experimental.	33
Discussão	42
Capítulo II.....	47
Introdução	47
Doença de Parkinson	47
Objetivo	49
Objetivo Geral	49
Objetivos específicos.....	49
Materiais e Métodos.....	50

Indução de Parkinson	50
Análise estatística	55
Resultados	56
Influência da microbiota no desenvolvimento da doença de Parkinson.	56
Discussão	60
Capítulo III	63
Materiais e Métodos.....	63
Atividade da β -glucana em duas populações de bactérias	64
Resultados	64
Ação direta da β -glucana.....	64
Conclusão	67
Lista de Abreviaturas.....	68
Referências	70

Índice de Figuras

Figura 1 – Relação dos organismos da microbiota e seus metabolitos com o sistema imunológico.....	16
Figura 2 – Rede de citocinas e células imunes na reposta ativada pela microbiota.	17
Figura 3 - Estímulo de <i>G. lucidum</i> em células KO para TLR2 e Dectina-1..	20
Figura 4 - Reconhecimento de β -glucanas pelos receptores TLR2 e Dectina 1.....	21
Figura 5 - HeatMap da cinética da população bacteriana da microbiota intestinal com o passar do tempo.	26
Figura 6 - Comparativo entre o cenário intestinal saudável e frente a um quadro inflamatório.....	24
Figura 7 Interações entre as diversas populações microbianas, a mucosa e o sistema imune no intestino.	27
Figura 8 - Lâminas de histopatológico de tecido intestinal retirado do colon dos animais.....	35
Figura 9 - Imagens de histopatológico de Ceco e Colón dos animais WT.....	36
Figura 10 - PCRs do experimento de colite com animais WT feito para os genes GATA3, IL1beta, IL22, Lipocalin2, PTX3, STAT1, TBET e TNFalpha.	38
Figura 11 Imagens de histopatológico do Ceco e Colón dos animais KO para dectina-1..	39
Figura 12 Caracterização da microbiota intestinal em animais WT (A) e Knockout para o receptor Dectina-1 (B) nos dias T01 (vermelho) e T03 (verde).	42
Figura 13 Via de ativação celular desencadeada pelo estímulo com glucanas na presença ou ausência de dectina-1.....	45
Figura 14 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu tempo de permanência no RotaRod medido após cinco dias da cirurgia.....	56
Figura 15 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu número de giros contabilizados durante cinco minutos após trinta minutos da injeção de apomorfina subcutânea.....	58
Figura 16 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu tempo de permanência no RotaRod medido após cinco dias da cirurgia.....	59
Figura 17 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu número de giros contabilizados durante cinco minutos após trinta minutos da injeção de apomorfina subcutânea.....	60
Figura 18 Mecanismo intracelular de ação do MPTP e da 6OHDA.	62
Figura 19 <i>E.coli</i> e <i>S.aureus</i> foram cultivadas na presença (vermelho e roxo) ou na ausência (azul e verde) de β -glucana proveniente de <i>G.lucidum</i>	65

Figura 20 Placas de meio LB semeadas com a bactéria E.coli na presença (B) ou na ausência (A) de β -glucana por 24 horas a 37°C. 66

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Desenho experimental do experimento com modelo murino de colite, tanto para os camundongos selvagens como os knockouts para o receptor de Dectina-1.	32
Tabela 2 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo Controle.	51
Tabela 3 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo Controle sem Antibióticos..	52
Tabela 4 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo SHAM.....	53
Tabela 5 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo 6OHDA.....	53
Tabela 6 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo SHAM +AB.....	54
Tabela 7- Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo 6OHDA +AB.....	55
Tabela 8 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo 6OHDA +AB + BG.	55
Tabela 9 - Morte de animais durante os experimentos dos grupos com ou sem indução da doença e com ou sem diminuição da microbiota.....	Erro! Indicador não definido.

Resumo

A microbiota intestinal é composta por vírus, fungos e bactérias, que interagem com o sistema imune do indivíduo, por meio da produção de metabolitos e pelo reconhecimento direto de padrões associados à patógenos. Esta interação pode afetar o desenvolvimento de doenças e conseqüentemente sua patogênese, além de controlar a microbiota, favorecendo o crescimento de uma determinada população e/ou controlando a entrada dos microrganismos na mucosa. Durante o desenvolvimento da colite, observa-se o estabelecimento de uma inflamação exacerbada do cólon, que causa danos na mucosa, provocando dor, sangramento e outras manifestações clínicas nos pacientes acometidos. A microbiota pode ser modulada para diminuir essa resposta inflamatória e melhorar o prognóstico do paciente. Uma outra doença que já foi descrita como modulada pela microbiota, é a Doença de Parkinson, com o acúmulo proteico, conhecido como corpos de Levy, que causa a morte de neurônios dopaminérgicos e uma falha na via desses neurotransmissores no cérebro. Dependendo da composição da microbiota, os sintomas motores diminuem e ativa o chamado *brain-gut-axis*. Diversos compostos são capazes de modular a microbiota, entre eles os cogumelos medicinais. Estudos prévios com a espécie *Ganoderma lucidum* demonstraram sua eficácia na modulação do sistema imune, razão pela qual este modelo foi adotado no presente estudo. A indução da Doença de Parkinson no estudo foi obtida pela injeção intracerebral de 6OHDA. Partindo-se da hipótese de que o *brain-gut-axis* poderia influenciar a progressão dos sinais no Parkinson, microbiota bacteriana dos animais tratados com a 6OHDA foi removida. Os resultados destes grupos, quando comparados aos grupos com microbiota intacta, não demonstraram nenhuma diferença estatisticamente significativa na alteração do curso da doença ou seus sintomas. Tampouco houve diferença estatística entre os grupos tratados ou não com a β -glucana extraída do cogumelo. Entretanto, os resultados nos experimentos de indução de colite por sulfato de sódio dextran (DSS) demonstraram alterações na expressão gênica e diminuição da inflamação gerada no intestino quando os animais foram tratados com a fração secretada do *Ganoderma lucidum*. Para comprovar que a ligação da β -glucana com o do receptor dectina-1 era imprescindível para os dados obtidos, utilizou-se animais knockout para o receptor. Este grupo não apresentou alterações nas populações microbianas identificadas bem como não houve alteração no padrão inflamatório quando comparado com os animais selvagens que não receberam a β -glucana. Estes dados comprovam que a Dectina-1 é capaz de modular a resposta imune local, com redução do processo inflamatório observado no modelo de colite utilizado neste trabalho, porém

não foi capaz de modular a evolução do modelo de Parkinson. Outros modelos experimentais de Parkinson precisam ser testados para que a atividade anti-inflamatória da β -glucana seja descartada nesta doença.

Abstract

The intestinal microbiota is composed of viruses, fungi and bacteria, which interact with the individual's immune system, through the production of metabolites and through the direct recognition of patterns associated with pathogens. This interaction can affect the development of diseases and consequently their pathogenesis, in addition to controlling the microbiota, favoring the growth of a certain population and / or controlling the entry of microorganisms in the mucosa. During the development of colitis, an exacerbated inflammation of the colon is observed, which causes mucosal damage, causing pain, bleeding and other clinical manifestations in the affected patients. The microbiota can be modulated to decrease this inflammatory response and improve the patient's prognosis. Another disease that has been described as modulated by the microbiota is Parkinson's disease, with protein accumulation, known as Levy's bodies, which causes the death of dopaminergic neurons and a failure in the pathway of these neurotransmitters in the brain. Depending on the composition of the microbiota, motor symptoms decrease and activate the so-called brain-gut-axis. Several compounds are capable of modulating the microbiota, including medicinal mushrooms. Previous studies with the species *Ganoderma lucidum* demonstrated its effectiveness in modulating the immune system, which is why this model was adopted in the present study. The induction of Parkinson's disease in the study was achieved by intracerebral injection of 6OHDA. Based on the hypothesis that the brain-gut-axis could influence the progression of signals in Parkinson's, bacterial microbiota from animals treated with 6OHDA was removed. The results of these groups, when compared to groups with an intact microbiota, did not show any statistically significant difference in altering the course of the disease or its symptoms. There was also no statistical difference between the groups treated or not with the β -glucan extracted from the mushroom. However, the results in the dextran sodium sulphate (DSS) colitis induction experiments demonstrated changes in gene expression and decreased inflammation generated in the intestine when the animals were treated with the secreted fraction of *Ganoderma lucidum*. To prove that the binding of β -glucan with that of the dectin-1 receptor was essential for the data obtained, knockout animals for the receptor were used. This group showed no changes in the microbial populations identified, as well as no changes in the inflammatory pattern when compared to wild animals that did not receive β -glucan.

These data prove that Dectin-1 is able to modulate the local immune response, with a reduction in the inflammatory process observed in the colitis model used in this study, but it was not able to modulate the evolution of the Parkinson's model. Other experimental models of Parkinson's need to be tested so that the anti-inflammatory activity of β -glucan is discarded in this disease.

Introdução

Na última década, houve um grande interesse no estudo entre a correlação dos microrganismos presentes no corpo humano e diversas doenças. Avanços na área demonstraram que estes seres interagem com diversos órgãos por meio da produção de metabolitos e de antígenos. Tais interações podem modular a resposta inflamatória e alterar a progressão de doenças e seus sintomas, mesmo em sítios distantes de onde estes microrganismos habitam. (Marchesi et al 2016).

Microbiota

O corpo humano é colonizado por milhões de microrganismos distintos e vírus em uma variada porção de órgãos (cavidade oral, pele, vagina, pulmão, intestino, bexiga). Estes dividem-se em diversas composições de vírus, bactérias, fungos e archeas que juntos recebem o nome de microbiota. (Shen,T-C D 2017).

A relação do hospedeiro com a microbiota começa no nascimento, durante o parto normal com a passagem do recém-nascido pela microbiota vaginal na fase expulsiva. Após o nascimento, a microbiota é modulada pela escolha alimentar do indivíduo, pela localização geográfica e o clima em que reside, a dieta da mãe no período de lactação, a idade em que é feito o desmame e pela interação com outros indivíduos em todas as fases da vida (Milani C et al 2017). A mudança da composição da microbiota depende de fatores como pH, disponibilidade de nutrientes, água, temperatura e de oxigênio (Ursell et al 2012; Kim et al 2017). A microbiota se renova diariamente, mas a idade do seu hospedeiro é um importante fator para a sua composição e relevância, sendo um exemplo a terceira idade, onde a microbiota converge para um cenário com mais bacteroidetes e menos diversidade quando comparado com jovens adultos (Otoole P.W. & Jeffery I.B 2015).

Mais de 50 filas de bactérias já foram encontrados na microbiota, dentre estes os mais abundantes, representando 90% da microbiota, são os firmicutes e os bacteroidetes [Sekirov et al (2010)]. Além destes, as actinobacterias e as proteobacterias são as populações comuns na microbiota intestinal. Os bacteroidetes são bactérias gram-negativas, sem esporo e que são conhecidas pela sua capacidade de digerir polissacarídeos complexos gerando os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA). Os firmicutes são bactérias gram-positivas, produtoras de endósporo e

que conseguem sobreviver em ambientes hostis na sua forma dormente. Assim como os bacteroidetes, as actinobacteria são gram negativas e conseguem proteger o hospedeiro contra possíveis patógenos, por meio de competição e pelo mecanismo de liberação de hidrolases. As proteobacterias também são gram negativas e possuem mecanismos de ação e influência na homeostase ainda pouco conhecidos. (Kim et al 2017).

Se o indivíduo está saudável, a relação entre o hospedeiro e microbiota é equilibrada e, em muitos casos, funciona como uma barreira de proteção contra doenças, além de ajudar na digestão de alimentos. Já em estado de desequilíbrio (disbiose), os organismos oportunistas existentes na microbiota ganham espaço podendo causar danos ao tecido intestinal, gerando doenças (Ianiro 2016). A disbiose pode ser desencadeada por vários fatores, como infecções, intoxicações e uso de medicamentos. Dentre os medicamentos associados com a disbiose, os antibióticos ocupam uma posição de destaque. O uso indiscriminado desta classe medicamentosa causa a morte de algumas espécies de bactérias, conforme o espectro de ação do medicamento utilizado, alterando a composição da microbiota, podendo favorecer algumas espécies potencialmente danosas. (Ianiro 2016). Os efeitos da administração de antibióticos são duradouros e estudos mostram potencial na diminuição da diversidade da microbiota de 6 meses a 2 anos após uso de glicopeptídeos como a vancomicina ou lincosamidas como a clindamicina por apenas uma semana. Uma única dose de clindamicina cursa com uma maior susceptibilidade a infecção por *C. difficile* no hospedeiro por um período prolongado. A mudança é gerada pela morte seletiva de bactérias, causando um desequilíbrio em populações que apresentam interdependência entre si e aumentando as populações resistentes aos antimicrobianos administrados (Becattini S et al 2016).

A microbiota interage intimamente com o sistema imune do indivíduo, apresentando um fino equilíbrio entre tolerância e proteção tecidual. A microbiota é capaz de modular a imunidade tanto no local em que reside, como o intestino, quanto na imunidade sistêmica, afetando tecidos adjacentes ou distantes de si (Tomkovich 2016).

Esta interação entre a imunidade do indivíduo e a microbiota ocorre por diferentes mecanismos, sendo alguns destes pelos metabólitos secretados, a taxa de crescimento dos microrganismos, a presença de moléculas imunogênicas na composição da membrana celular das espécies encontradas e os componentes do sistema imune do indivíduo. Quando segmentos de bactérias filamentosas (SFB) são apresentados via Complexo de Histocompatibilidade de classe II (MHCII) por células dendríticas (DC), ocorre a ativação de uma resposta imune perfil

Th17. Todavia, quando os SFB são apresentados por células linfoides inatas (ILCs), esta resposta é reprimida. Os SFB também aumentam produção de SIgA (um precursor do IgA) nas placas de Peyer. Outra função dos SFB é o aumento do número de neutrófilos na corrente sanguínea e a diminuição de células T ‘natural killer’ (iNKT) no pulmão e no colón (Figura 1).

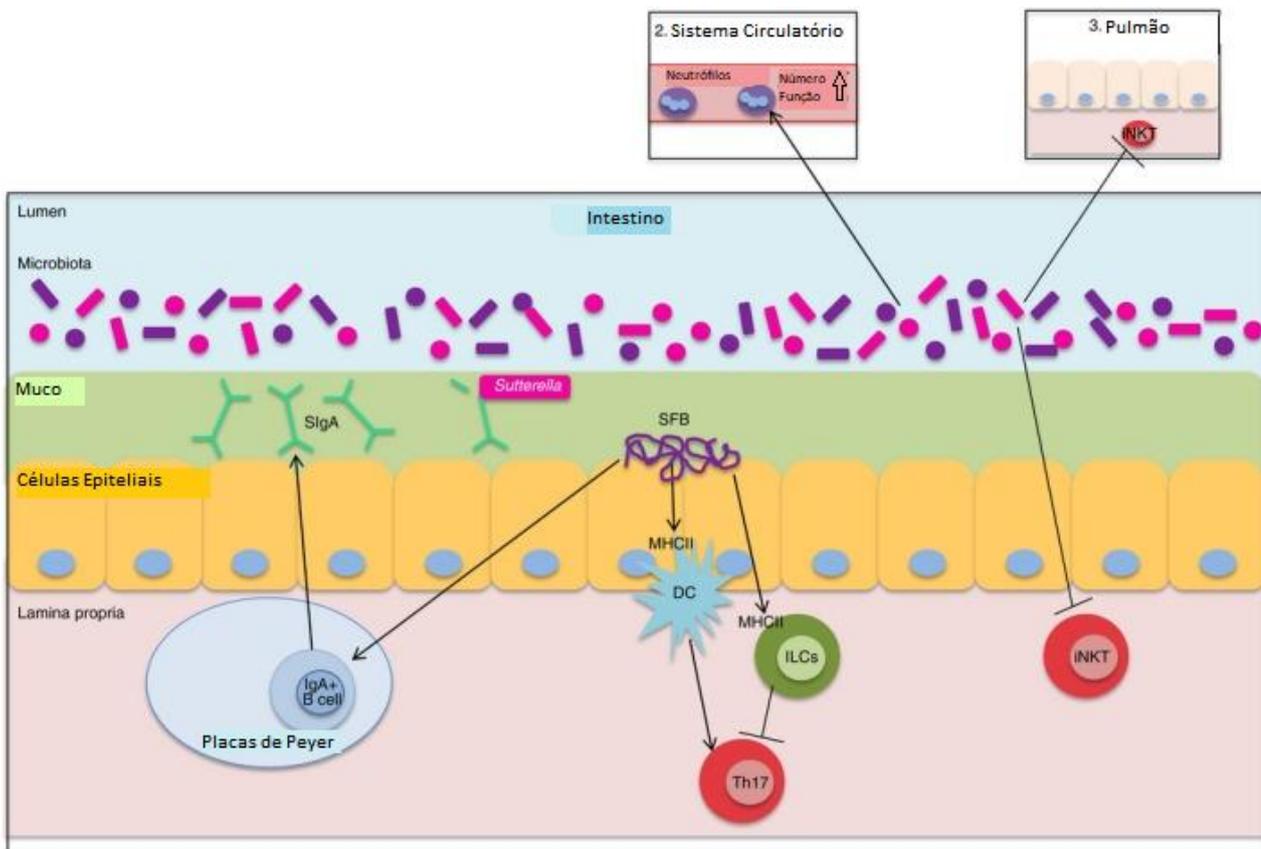


Figura 1 – Relação dos organismos da microbiota e seus metabolitos com o sistema imunológico. Os microrganismos presentes na microbiota intestinal são capazes de estimular as placas de peyer a produzir IgA, além de serem reconhecidos por células dendríticas e células linfoides inatas e induzir uma resposta Th17. Imagem retirada e legenda adaptadas de Tomkovich S & Jobin C. 2016

A interação entre o sistema imune e sua microbiota é uma rede complexa e variada que consegue, por meio de indução direta a partir de metabolitos ou pela apresentação via células dendríticas, estimular resposta Th1, Th17 e a produção de diversas citocinas e quimiocinas. Microrganismos fagocitados por macrófagos induzem a produção de IL10 e TGF β repressoras da resposta Th1 e IL12 que ativa uma resposta tipo Th1. Essa ativação gera a produção de IFN γ que age no recrutamento de macrófagos. Microrganismos fagocitados por células dendríticas induzem a produção de IL12, que além de ativar a resposta Th1, ativa células NK. A ativação

Fatores Moduladores da microbiota

A microbiota é sensível a diversas mudanças e uma delas, talvez a mais significativa, é a dieta. Os alimentos ou medicamentos ingeridos tem um impacto relevante na composição da microbiota, podendo modular essa população e conseqüentemente pré-dispor o indivíduo à doenças como a colite, doença de Parkinson, aterosclerose, câncer e obesidade (de Clercq et al 2016; Li DY et al 2017; Garret WS et al 2015; Uyar GO et al 2019).

Os probióticos e o transplante fecal vêm sendo estudados como formas alternativas de tratamento para as mais diversas doenças por interferirem na composição da microbiota (Nishida 2017). O uso de probióticos é considerado seguro quando feito em doses baixas, como os encontrados em leites fermentados e iogurtes. Já o efeito de altas doses de probióticos ainda não é bem determinado, mas pode gerar infecções oportunistas por desbalancear a microbiota local. Infecções intestinais, como a infecção por *C. difficile*, podem ser tratadas com a realização de um transplante fecal, impedindo a colonização do intestino por microrganismos oportunistas (Crow JR et al 2015).

O uso de probióticos frente a uma disbiose é amplamente disseminado, mas ao contrário do que se imagina, a administração de uma ou poucas linhagens de bactérias não ajuda a recolonização da microbiota. Inclusive, o uso de probióticos simples atrasa a recuperação da microbiota original. A administração de um conjunto complexo de micro-organismos, por outro lado, é benéfica no repovoamento da microbiota e diminuição dos sintomas da disbiose (Suez 2018). O uso de probióticos como tratamento médico é um desafio. Existem pacientes susceptíveis ao tratamento, que tomam probióticos ou são submetidas a um transplante fecal e rapidamente incorporam a nova microbiota e permanecem com tal microbiota mesmo após o fim do tratamento, enquanto há pessoas resistentes a essa mudança e que retornam a microbiota original assim que o tratamento cessa, tornando difícil a padronização de um tratamento padrão usando essa ferramenta (Kim et al 2017).

Um composto capaz de modular a microbiota apresenta diferentes mecanismos de ação, variando da toxicidade para alguns micro-organismos e levando a diminuição da sua prevalência e com aumento da de outras populações ou pela modulação do sistema imunológico do hospedeiro (Wischmeyer, et al 2016).

Alterar o fino equilíbrio entre o sistema imune e a microbiota existente é uma das ferramentas que os alimentos podem apresentar, com o objetivo de amenizar ou resolver o

surgimento de algumas doenças. A ingestão de alimentos que podem modificar a microbiota intestinal tem impacto significativo em algumas doenças (Shandu et al 2017).

Dentre os alimentos utilizados com finalidade terapêutica, os cogumelos ocupam uma posição de destaque, sendo muito utilizados na culinária e cultura asiática como tratamentos e para manutenção de homeostase (Rathee et al 2011). Os cogumelos são corpos frutíferos de fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota que são encontrados nos mais diversos habitats, com cores e formatos variados. Alguns cogumelos são tóxicos e não devem ser ingeridos, enquanto outros cogumelos são comestíveis e apresentam benefícios terapêuticos (Rai M. et al 2005).

O fungo *Ganoderma lucidum*, conhecido popularmente como Reishi, é usado há milhares de anos como tratamento e é considerado um cogumelo sagrado em algumas culturas, como a chinesa e japonesa (Wachtel-Galor et al 2011). Nos dias atuais, é um cogumelo facilmente encontrado, em forma de cápsulas ou pó, sendo amplamente comercializados. Seus benefícios vêm sendo estudados e já foram publicados estudos mostrando dados positivos no tratamento de câncer (Ahmet Unlu et al 2016). O nosso grupo de trabalho tem realizado experimentos que comprovam a capacidade imunomodulatória de um dos componentes da parede deste fungo. A função da parede celular presente nos fungos é fundamental para a viabilidade destas células com importante papel na estruturação e proteção da célula. Um outro papel importante é a capacidade de interação da parede celular com o sistema imune do indivíduo, modulando a ativação da sua resposta imune. Os componentes da parede são diversos e incluem glicoproteínas como as mananas, e polissacarídeos como a α -glucana e a β -glucana além de outros componentes que ajudam a estruturar a parede como a quitina (Neil et al 2017). Esses polissacarídeos já tiveram sua capacidade de imunomodulação demonstrado em vários artigos, como o zymosan por exemplo, que é uma β -glucana é capaz de estimular diretamente o aumento de fagocitose, produção de óxido nítrico e capacidade fagocitária de macrófagos e células dendríticas. Esta atividade é dependente do seu reconhecimento pelos receptores Dectina-1, CR3 do sistema complemento e receptor do tipo Toll 2 (TLR2) (Akramiené et al 2007). Nossos dados demonstraram que a β -glucana obtida do fungo *Ganoderma lucidum* é capaz de interagir com os receptores Dectina-1 e TLR-2. A ausência dos receptores TLR2 e Dectina 1 reduzem a produção de TNF- α induzida pela fração obtida a partir do fungo *G.lucidum* na concentração de 100 μ g (Figura 3).

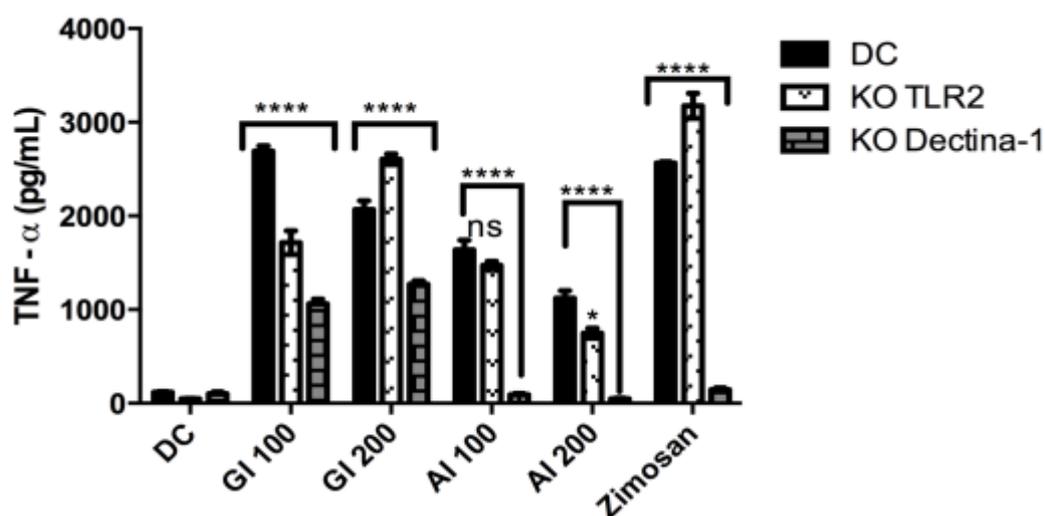


Figura 3 - Estímulo de *G. lucidum* em células KO para TLR2 e Dectina-1. *G. lucidum* identificado como GI 100 e GI 200 dependendo de sua concentração o controle positivo foi realizado com zimosan depletado. Imagem retirada e legenda editada de Basso MMA, 2017.

O receptor Dectina-1 é um receptor transmembrana, com um domínio extracelular do domínio de lectina tipo C expresso em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, que reconhece polissacarídeos do tipo 1,3 β -glucana presente na parede de fungos e plantas (Reid et al 2009). TLR2 é um receptor tipo Toll (TLR) capaz de reconhecer glicoproteínas, lipomananas, β -glucanas entre outras moléculas presentes em patógenos e é expresso em células dendríticas, linfócitos B e T, monócitos e macrófagos (Borrello et al 2011).

O reconhecimento da β -glucana pelo receptor Dectina-1 expresso em macrófagos e células dendríticas gera uma cascata intracelular dependente de Syk, que por sua vez permite a ativação de Card9 ou estimula Raf1. Independentemente da via, ocorre a ativação do fator de transcrição NFkB gerando a produção de citocinas (Wagener et al 2018). O receptor TLR2 tem a resposta ao reconhecimento de β -glucanas dependente de Myd88, também ativando NFkB e estimulando a produção de citocinas (Reid et al 2009) (figura 4).

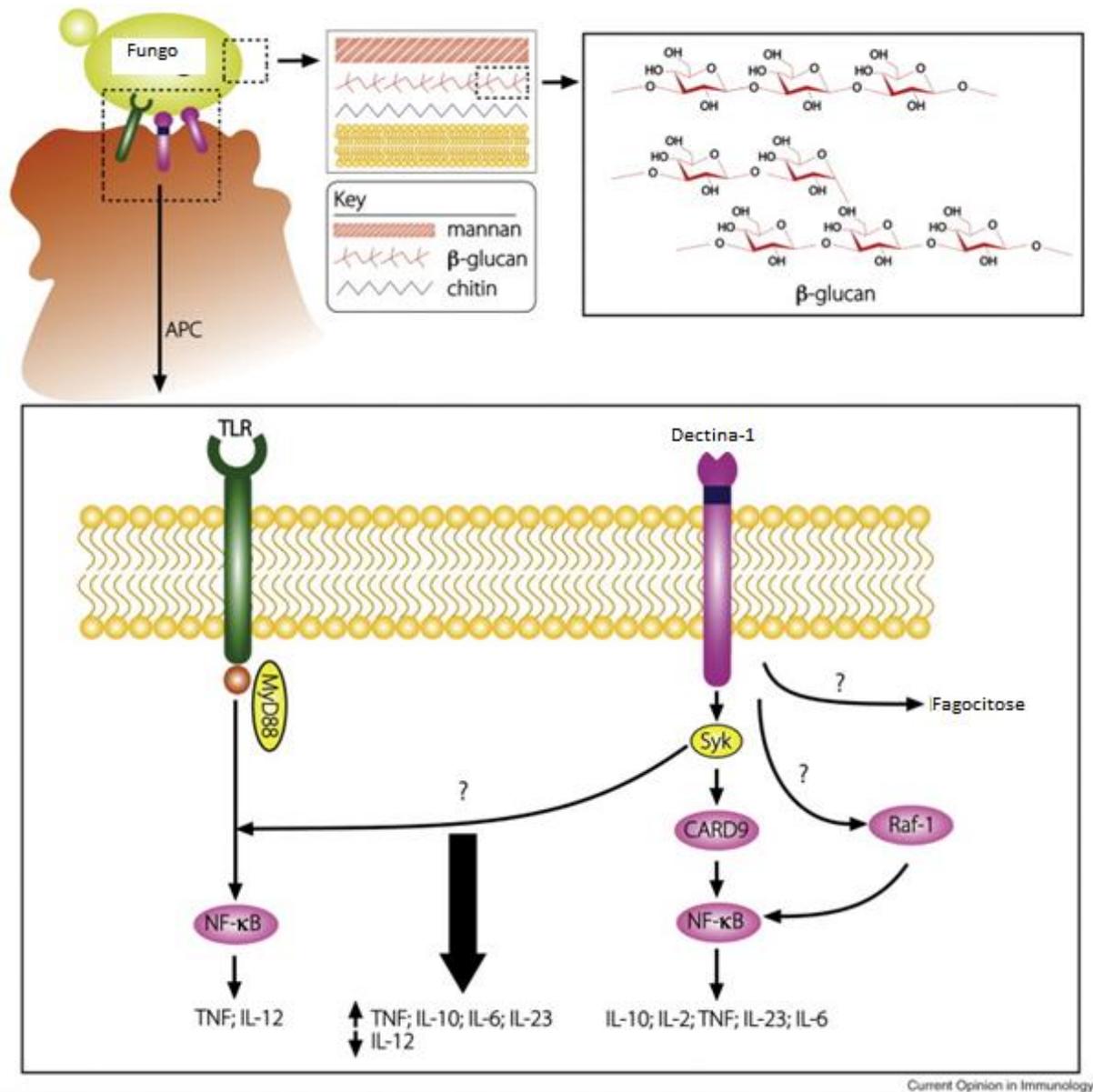


Figura 4 - Reconhecimento de β-glucanas pelos receptores TLR2 e Dectina 1. O reconhecimento é feito por meio dos receptores citados, que iniciam uma via intracelular estimulando a resposta imunológica. Imagem retirada e legenda adaptada de (Delyth et al 2009)

A modulação do sistema imune feita pela microbiota e seus metabólitos é um importante regulador da inflamação e da resposta imune, o que reflete na resposta do organismo a doenças e sua modulação poderia ser usada como um tratamento.

Modulação da microbiota pela β -glucana do *Ganoderma lucidum*

Dados previamente obtidos por nosso laboratório mostraram que a administração de β -glucana levou a uma mudança na microbiota dos camundongos. A β -glucana utilizada, além de apresentar baixa toxicidade, foi também capaz de modular a produção de citocinas, aumentando a produção de TNF- α e melhorando a resposta imune contra infecções fúngicas com nas infecções experimentais *in vitro* e *in vivo* com o *Criptococcus neoformans* (Basso et al 2019). Este efeito foi observado apenas após 72h após a administração, tempo que sugere que as alterações estão relacionadas à ativação do sistema imune local e não pela metabolização deste carboidrato pelas bactérias. Analisando a cinética das populações de bactérias presentes no intestino, observamos que a mudança de microbiota acontece a partir do segundo dia após a terceira doses de β -glucanas e se mantem na nova conformação mesmo após o fim da administração das frações (Figura 5). Análise feita conforme Hoffmann C. et al 2013.

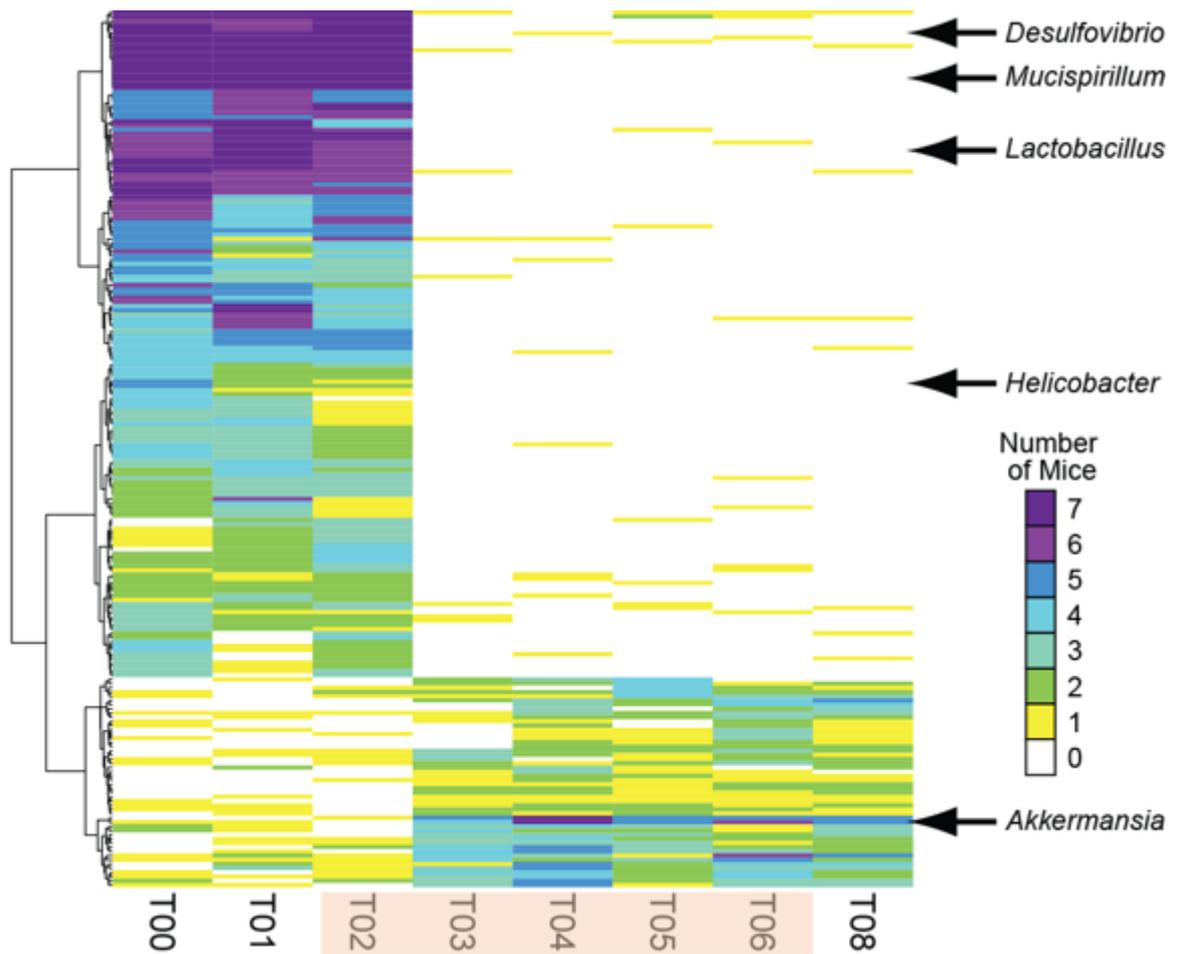


Figura 5 - HeatMap da cinética da população bacteriana da microbiota intestinal com o passar do tempo. O tratamento com as frações foi realizado nos primeiros três dias (T01 a T03) e a modificação da população se deu após 48h da primeira administração do tratamento.

Capítulo I

Introdução

Colite

A colite é termo utilizado para caracterizar o processo inflamatório no cólon. Ela está presente no grupo de afecções conhecidas por Doenças Inflamatórias Intestinais, que engloba a Doença de Crohn, Colite Ulcerativa e Síndrome do Intestino Irritado. A colite pode ser causada por infecção bacteriana ou viral, ação de medicamentos ou toxinas, reação autoimune e intoxicação alimentar. Apesar das doenças citadas apresentarem manifestações clínicas distintas, estas compartilham sintomas comuns, como a diarreia, a febre, a fadiga, a dor abdominal, a perda de peso e as fezes mucossanguinolentas (Kathleen A. Head, ND 2003).

A colite pode apresentar uma evolução gradual e lenta, intermitente ou até se manifestar de forma aguda e rapidamente progressiva. Sua grande maioria tem características crônicas e multifatoriais, tendo o ambiente, a alimentação, a variabilidade genética e a ativação do sistema imunológico do indivíduo como fatores importantes. Apesar de grandes avanços nas ciências médicas no último século, sua fisiopatologia ainda é incerta. No desenvolvimento da colite, observa-se que os mediadores inflamatórios estão alterados, além dos sinais de stress oxidativo, a quantidade de espécies de oxigênio reativo (ROS), a quantidade reduzida de glicosaminoglicanos na mucosa (que gera aumento em sua permeabilidade), a diminuição de níveis de ácidos graxos de cadeia curta, o aumento da produção de sulfeto e diminuição da metilação nos colonócitos, importante via para a eliminação de sulfetos tóxicos a célula do cólon (Kathleen A. Head, ND 2003).

A incidência da colite varia entre os países desenvolvidos e os países subdesenvolvidos. Nos países europeus e América do Norte a incidência varia entre 0,6 a 20 pessoas afetadas a cada cem mil habitantes. Nos países asiáticos e do Oriente Médio a incidência varia de 0,1 a 6,3 pessoas afetadas a cada cem mil habitantes. Tal diferença poderia ser explicada pelo avanço das medidas higiênicas encontradas em países desenvolvidos, diminuindo a incidência de infecções intestinais e fazendo com que a imunidade intestinal não se module conforme as infecções ocorridas ao longo da vida (Ford et al 2013). No Brasil não existem dados concretos que demonstrem a incidência desta doença.

A diferenciação entre a Colite Ulcerativa e a Doença de Crohn é que a primeira atinge somente o reto e cólon, poupando ânus e outras partes do intestino, com inflamação na porção mucosa da parede intestinal, gerando úlceras (motivo pelo qual recebe seu nome) (Ordás et al 2012). Já a segunda é caracterizada por resposta inflamatória em todas as camadas da parede intestinal envolvendo todo o trato gastrointestinal (da boca ao ânus), com suas principais manifestações no cólon (Ballester et al 2018).

O diagnóstico diferencial das colites é feito através colonoscopia e a confirmação pela análise da de inflamação tecidual na biópsia. O prognóstico da Colite Ulcerativa é bom, sendo que menos de 10% dos pacientes diagnosticados são submetidos a proctocolectomia, com retirada total ou parcial do cólon e reto. O tratamento consiste no uso de fármacos como imunomoduladores, corticoides, imunossupressores e aminossalicilatos levando ao desaparecimento dos sintomas. Apesar disto, a recidiva ocorre em torno de 90% dos pacientes tratados (Ford et al 2013). A Doença de Crohn é mais agressiva, podendo se manifestar com fístulas anorretais e estenoses no trânsito intestinal devido os períodos de exacerbação e supressão da resposta imune, cursando com pior prognóstico e qualidade de vida do paciente (Freeman 2014).

O cólon apresenta uma barreira epitelial íntegra, impedindo a entrada de microrganismos, secreção de muco, secreção de IgA e outros fatores antimicrobianos como RegIIIy mantendo a homeostase do tecido. Com o início da colite, ocorre o aumento da permeabilidade intestinal permitindo a interação dos micro-organismos da microbiota intestinal com as células do sistema imune do tecido, iniciando uma resposta inflamatória. O primeiro reconhecimento ocorre pelos por macrófagos residentes, com produção do fator de necrose tumoral (TNF), que ativa os linfócitos inatos (ILCs). Essa via é um dos alvos para terapias com anticorpos monoclonais, cujo objetivo de impedir a continuação da cascata inflamatória e a diminuição dos sintomas nos pacientes. Além da inflamação gerada, as células Th9 promovem a apoptose dos enterócitos e impedem a cicatrização tecidual juntamente com a produção de IL-13 pelas células NK T (Figura 6).

No estabelecimento da colite, a estrutura do epitélio intestinal é comprometida gerando permeabilidade e entrada de microrganismos da microbiota no tecido. A invasão no tecido intestinal gera uma resposta inflamatória mediada por células dendríticas e macrófagos residentes que a partir da produção de $TNF\ \alpha$ começa uma resposta inflamatória ativando células linfoides inatas (ILC). A perpetuação da inflamação gera um ciclo vicioso de maior dano ao tecido e conseqüentemente maior invasão de microrganismos, tratamentos com anticorpos monoclonais agem impedindo essa perpetuação (Figura 6).

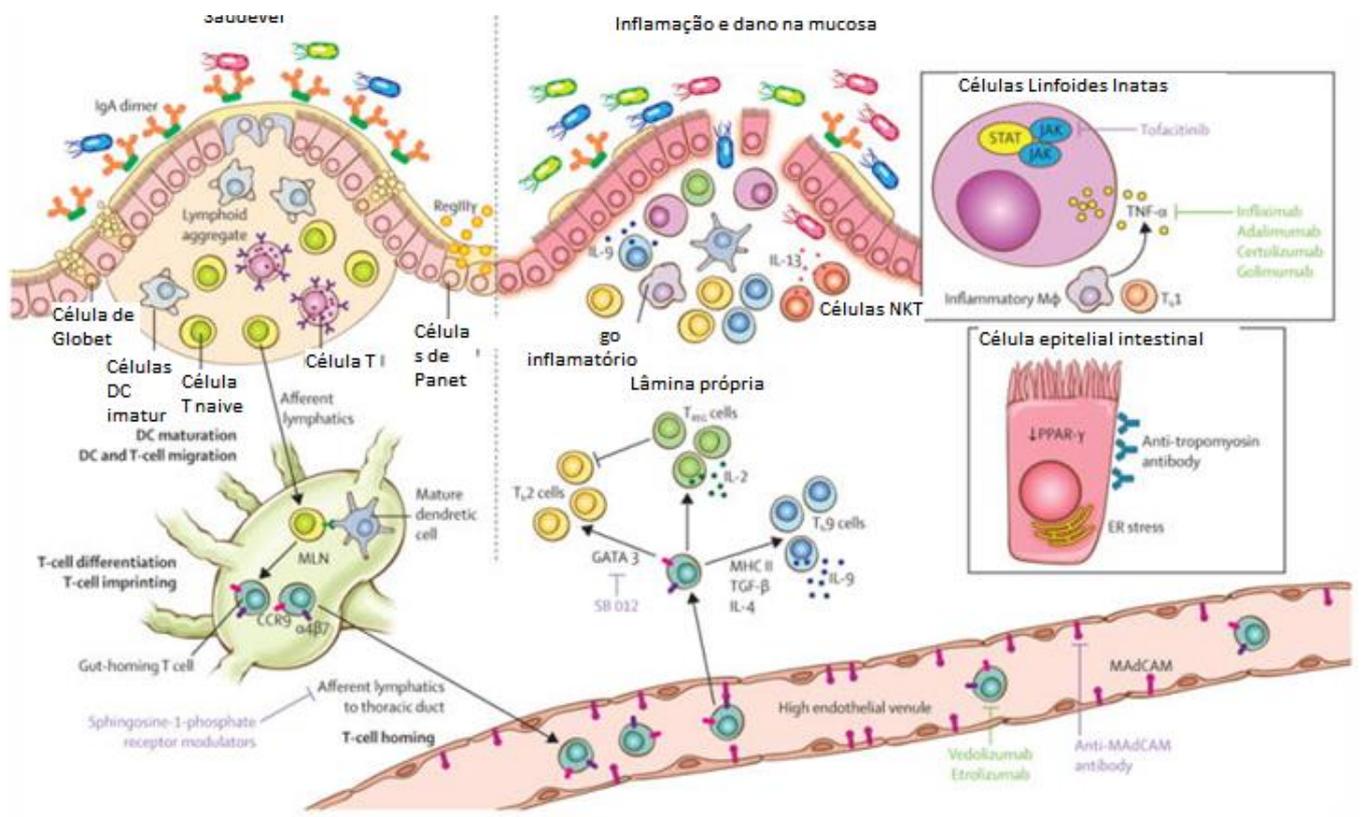


Figura 6 – Comparativo entre o cenário intestinal saudável e frente a um quadro inflamatório. A relação entre a microbiota e o sistema imune é modificada com a invasão de microrganismos na mucosa, gerando uma resposta inflamatória. Imagem retirada e modificada de (Ungaro R et al 2017).

A produção de metabolitos como butirato, ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e PSA, ativam células dendríticas residentes, estimulando a produção de IL-10 e a ativação de células T regulatórias para uma resposta anti-inflamatória por meio da produção de $TGF\beta$ que suprime a resposta inflamatória enquanto a ativação de células $TCD4^+$ podem gerar a produção tanto de IL-10 em uma resposta anti-inflamatória, quanto de $IFN\gamma$ em uma resposta pró-inflamatória. (Figura 7).

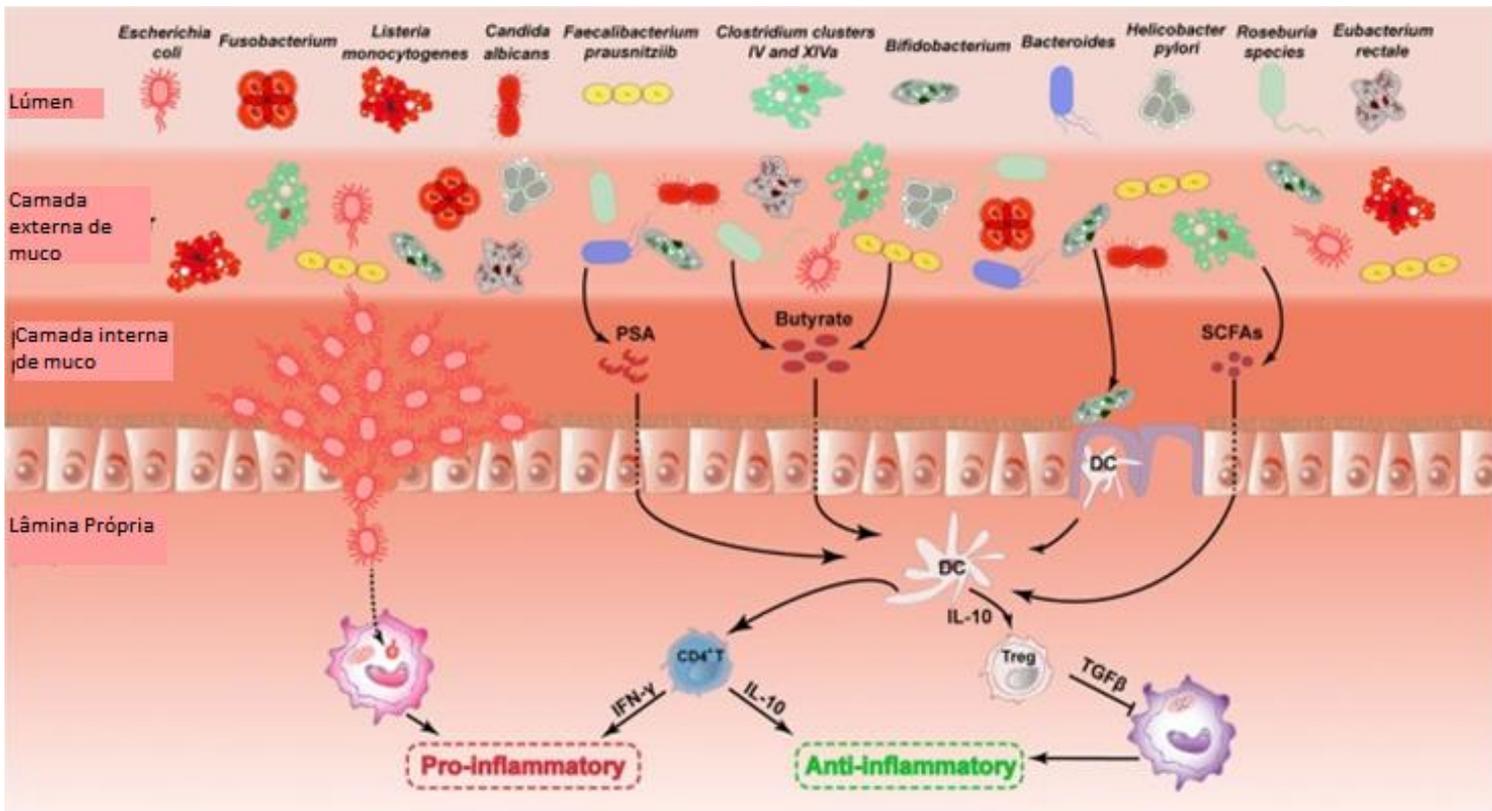


Figura 6 Interações entre as diversas populações microbianas, a mucosa e o sistema imune no intestino. Os metabólitos produzidos pelos microrganismos encontrados na microbiota intestinal, são capazes de estimular células DC e gerar uma resposta imune. Imagem retirada e modificada de (Zhang SL et al 2017)

Objetivo

Objetivo Geral

Sabendo da atividade da β -glucana na microbiota bacteriana de camundongos e do efeito da microbiota sobre doenças como colite e Doença de Parkinson, o objetivo deste trabalho foi determinar a importância da modulação da microbiota bacteriana pelo *Ganoderma lucidum* em modelos murinos experimentais de colite induzida por sulfato de sódio dextran (DSS) e Parkinson induzido por 6OHDA (6-hidroxidopamina).

Objetivos específicos

1. Avaliar o impacto da administração de *Ganoderma lucidum*, nos genes inflamatórios e nos histopatológicos do tecido intestinal de animais submetidos a indução de colite por administração de DSS.
2. Avaliar o impacto da administração de *Ganoderma lucidum*, nos histopatológicos do tecido intestinal de animais KO para Dectina-1 submetidos a indução de colite por administração de DSS.

Materiais e métodos

Cultivo de *Ganoderma lucidum*

Uma amostra de *Ganoderma lucidum* armazenada no banco de germoplasma da Embrapa (autorização de acesso ao Patrimônio Genético CNPq 010342/2014-1) foi recebida para a realização dos trabalhos no Laboratório de Imunologia Aplicada/UnB. Uma parte da amostra foi inoculada em meio Sabouroud ágar (Acumedia) por 10 dias até que a placa fosse completamente colonizada pelo fungo.

O substrato de cultivo do cogumelo foi feito com 20% farelo de trigo e 80% serragem de eucalipto, essa mistura foi hidratada até que estivesse igualmente úmida. O pH desse substrato foi medido por meio da diluição em água e foi acertado para 6.5 com o uso de cal agrícola. O substrato final foi colocado em sacos de autoclave, fechado com fita e autoclavados a 121°C por 2 horas. Após a esterilização, o substrato foi inoculado com fragmentos de 2 placas de petri de cultivo previamente descrito. O substrato inoculado foi mantido em local com pouca iluminação, alta umidificação com umidificadores de ambiente, e temperatura amena. Após 20 dias nestas condições, o substrato foi envolvido em sacos pretos e foram feitas pequenas aberturas. O saco foi então colocado em ambiente úmido, de temperatura ambiente amena e com incidência de sol média. Após 20 dias nestas condições, a formação de corpos frutíferos já era visível e quando alcançaram tamanho igual ou maior a 2cm, os cogumelos foram retirados do substrato.

Os corpos frutíferos dos cogumelos foram então lavados com água miliQ estéril por 3 vezes dentro do fluxo laminar. O líquido resultante desta lavagem foi descartado. O cogumelo, com a ajuda de um bisturi, foi seccionado e seu interior foi raspado e inoculado em placas de petri descartáveis com meio Sabouroud (Acumedia).

Obtenção de β -glucanas de *Ganoderma lucidum*

Fragmentos da placa de petri, já tomada pelo fungo, foram retirados e colocados em um pré-inóculo de 250ml de meio líquido Sabouroud, com adição de 270 μ l de ácido láctico a cada 100ml de meio, por 10 dias em shaker a 130 rpm e 30 °C. Após 10 dias, o pré-inóculo foi transferido para um inóculo de 500ml de meio líquido Sabouroud nas mesmas condições e tempo de cultivo que o pré-inóculo.

Ao final dos 10 dias, o inóculo foi centrifugado a 5000 rpm, 4°C por 12 minutos, o sobrenadante foi descartado, foi adicionado água miliQ estéril e agitamos. A lavagem foi realizada 3 vezes. No fim das centrifugações, o sobrenadante foi descartado, o fungo restante foi devolvido ao Erlenmeyer com 500ml de água miliQ estéril por 24 horas nas mesmas condições que anteriormente.

No dia seguinte, o cultivo passou por novas lavagens com centrifugações como feitas anteriormente, mas o sobrenadante foi guardado e o fungo descartado. O sobrenadante foi congelado a -80°C e liofilizado. O produto liofilizado resultante foi ressuspendido em água e sonificado por 9 minutos a amplitude de 30%, o produto foi então centrifugado e a fração solúvel foi separada da fração insolúvel, neste trabalho usamos as frações insolúveis. As frações foram mantidas a 4°C.

Quantificação de β -glucanas

A quantificação das β -glucanas obtidas foi feito com base no método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico desenvolvido por Dubois et al (1956). Uma curva de concentrações é feita usando como amostra açúcar padrão, essa curva é usada para quantificar as amostras obtidas. A amostra é adicionada em um tubo de ensaio contendo 500 μ L de fenol 4% e 2,5 mL de ácido sulfúrico, essa mistura é transferida para uma cubeta e lida em um espectrofotômetro a 490nm. A absorbância achada é, então, jogada na curva feita com o açúcar padrão para determinar a concentração da amostra de interesse.

Animais

Foram utilizados 127 animais da linhagem Swiss entre 8 a 12 semanas de idade provenientes do Biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília e 16 animais da linhagem C57/Bl6 da mesma faixa etária foram comprados do Biotério Central da Unicamp e 17 animais da linhagem C57/Bl6 Dec 1 KO foram comprados do Biotério Central da Unicamp. Todos os experimentos usando animais foram aprovados pelo comitê de ética e estão descritos no CEUA nº 18/2019.

Indução de colite

A indução de colite foi feita com o Dextrano Sulfato de Sódio (DSS) na concentração de 2% na mamadeira de água dos camundongos por um total de 6 dias. O tratamento com β -glucanas foi feito após protocolo de obtenção de β -glucanas descrito acima. Cada animal recebeu 100 μ g de β -glucana em um volume de 100 μ L como tratamento por 3 dias antes do início da administração de DSS ou nos 3 últimos dias de administração de DSS, conforme tabela abaixo (tabela 1). Fezes foram coletadas diariamente. No sétimo dia, os animais foram eutanasiados por asfixia por meio da câmara de CO₂ e tiveram seu intestino e conteúdo fecal recolhidos para análises futuras.

Sadios	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	β -glu											
	DSS											
	Coleta											
DSS	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	β -glu											
	DSS											
	Coleta											
Tratamento Prévio	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	β -glu											
	DSS											
	Coleta											

Tratamento	Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Posterior	β -glu											
	DSS											
	Coleta											

Tabela 1 - Desenho experimental do experimento com modelo murino de colite, tanto para os camundongos selvagens como os knockouts para o receptor de Dectina-1. Os grupos Sadio, DSS, Tratamento Prévio e Tratamento Posterior tiveram fezes coletadas durante todo o experimento (verde), a indução de colite foi feita por sete dias (azul) e a administração de β -glucana foi feita antes ou após a indução (coral).

Animais da linhagem C57Bl/6 com idades entre 8 e 12 semanas foram divididos em grupos experimentais conforme exemplificado nos materiais e métodos deste trabalho (Tabela 1). O grupo controle recebeu água comum sem aditivos durante todo o processo, o grupo apenas com DSS recebeu o dextran na água sem qualquer tratamento com β -glucanas, o grupo de tratamento prévio recebeu três dias de tratamento com β -glucanas, sendo uma dose diária de 100ug em um volume de 100 μ L por gavagem, antes de receberem DSS na água e o grupo com tratamento posterior recebeu as três doses diárias de β -glucana após o início da administração de β -glucanas, conforme esquemas encontrados no material e métodos. O mesmo protocolo foi feito para os animais knockout para Dectina 1.

Real Time PCR

As amostras intestinais foram colocadas em eppendorfs e adicionado 1ml de QIazol lysis (QIAGEN), as amostras foram levadas ao tissue lyser por 15 minutos totais alternando em 5 minutos no gelo e 5 minutos no aparelho até completa lise do tecido. Foi adicionado 0,2ml de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a parte aquosa foi transferida para um eppendorf RNase free. Foi adicionado 0,5 ml de isopropanol a amostra e incubada por 10 minutos e centrifugada novamente nos mesmos padrões. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi lavada duas vezes com 1ml de álcool 75% e centrifugada a 7500g por 5 minutos a 4°C. A amostra foi ressuspensa em água RNase free.

A amostra de RNA foi transformada em cDNA por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits da AB conforme orientações do fabricante, 2µg de RNA foram separados em 10µL de água nucleasse free e adicionados de 10µL de 2x RT Master Mix (2µL 10x RT Buffer, 0,8µL 25x dNTP Mix, 2µL RT Random Primers e 4,2 µL de água nucleasse free). As amostras foram colocadas em um termociclador onde ficaram por 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 min a 85°C. O cDNA foi usado para a reação de PCR em tempo real usando Kit de GoTaq® qPCR Master Mix da Promega conforme instruções do fabricante usando o gene RSP9 para controle endógeno da expressão. Cada amostra era composta de 5µL de GoTAQ Master Mix, 2µL de cDNA, 2,6µL de água deionizada e 0,2mM de cada oligonucleotídeo específico forward na reverse. A reação foi feita com 2min a 50°C, 5min de 95°C e 30 ciclos alternados entre 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. A ciclagem foi setada para o reagente SyBr e corrida no modo Fast. Para controle, usamos o gene endógeno RSP9.

Análises histopatológicas

As amostras intestinais dos animais foram acondicionadas em cassetes e mantidas em formol até o seu encaminhamento ao Laboratório de Patologia Animal Histopato ou ao laboratório de Imunohistoquímica de Brasília. As amostras foram processadas e os cortes de 5mm foram corados com HE. As análises das amostras foram realizadas com o auxílio da professora da Faculdade de Medicina, Dr. Leonora Vianna e do Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto.

Resultados

Influência da β -glucana na indução de colite em modelo experimental.

Para determinar a influência da microbiota intestinal no modelo de colite induzida pela administração oral de Dextrano Sulfato de Sódio (DSS), camundongos C57Bl/6 foram divididos em grupos experimentais que receberam ou não DSS na água por sete dias, tratados ou não com as β -glucanas. Durante o período de 7 dias, amostras de fezes foram colhidas diariamente, para avaliar a mudança na microbiota destes animais. No sétimo dia, os animais tiveram seus intestinos retirados onde o cólon e o ceco foram separados e tiveram seu conteúdo

retirado. O tecido intestinal foi separado para realização de RT PCR e para análise histopatológica.

Como controle, animais normais foram tratados com 3 diferentes concentrações de β -glucana (100, 200 e 400 μ g/camundongo) durante 3 dias. Após 7 dias do último tratamento o cólon dos animais foi retirado e foram realizadas análises histopatológicas. Em nenhum dos animais, independentemente da concentração de β -glucana, observou-se alterações nos padrões normais do tecido, demonstrando que a β -glucana sozinha não é capaz de induzir um perfil inflamatório, mesmo em doses altas (Figura 8).

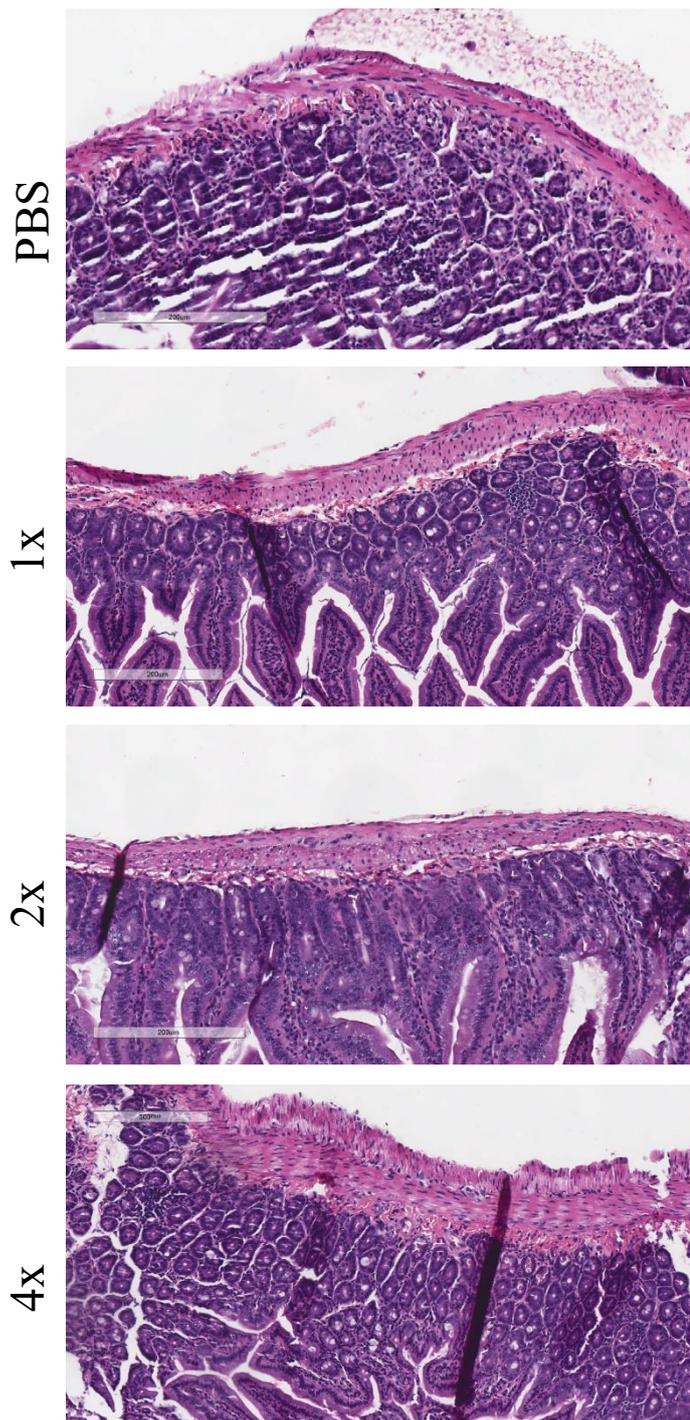


Figura 7 - Lâminas de histopatológico de tecido intestinal retirado do colon dos animais. Os grupos foram tratados com 100ug de β -glucana (1x), 200ug (2x) ou 400ug (4x) e um grupo recebeu PBS como controle.

Assim como os animais do grupo normal (sem administração do tratamento ou de DSS), os animais que somente receberam o tratamento com a β -glucana apresentam um intestino saudável tanto no colón proximal quanto no ceco. Os animais do grupo DSS, com o quadro de colite, apresentaram um padrão de inflamação nos tecidos, analisados com características

inflamatórias como edema e necrose. No grupo tratado previamente com a β -glucana, a inflamação é diminuída em comparação com o grupo colite. Avaliamos também se o tratamento posterior à indução da colite com β -glucana também apresentaria um papel anti-inflamatório, porém o processo inflamatório foi exacerbado, com deterioração da mucosa e presença de sangue nas fezes dos animais (Figura 9).

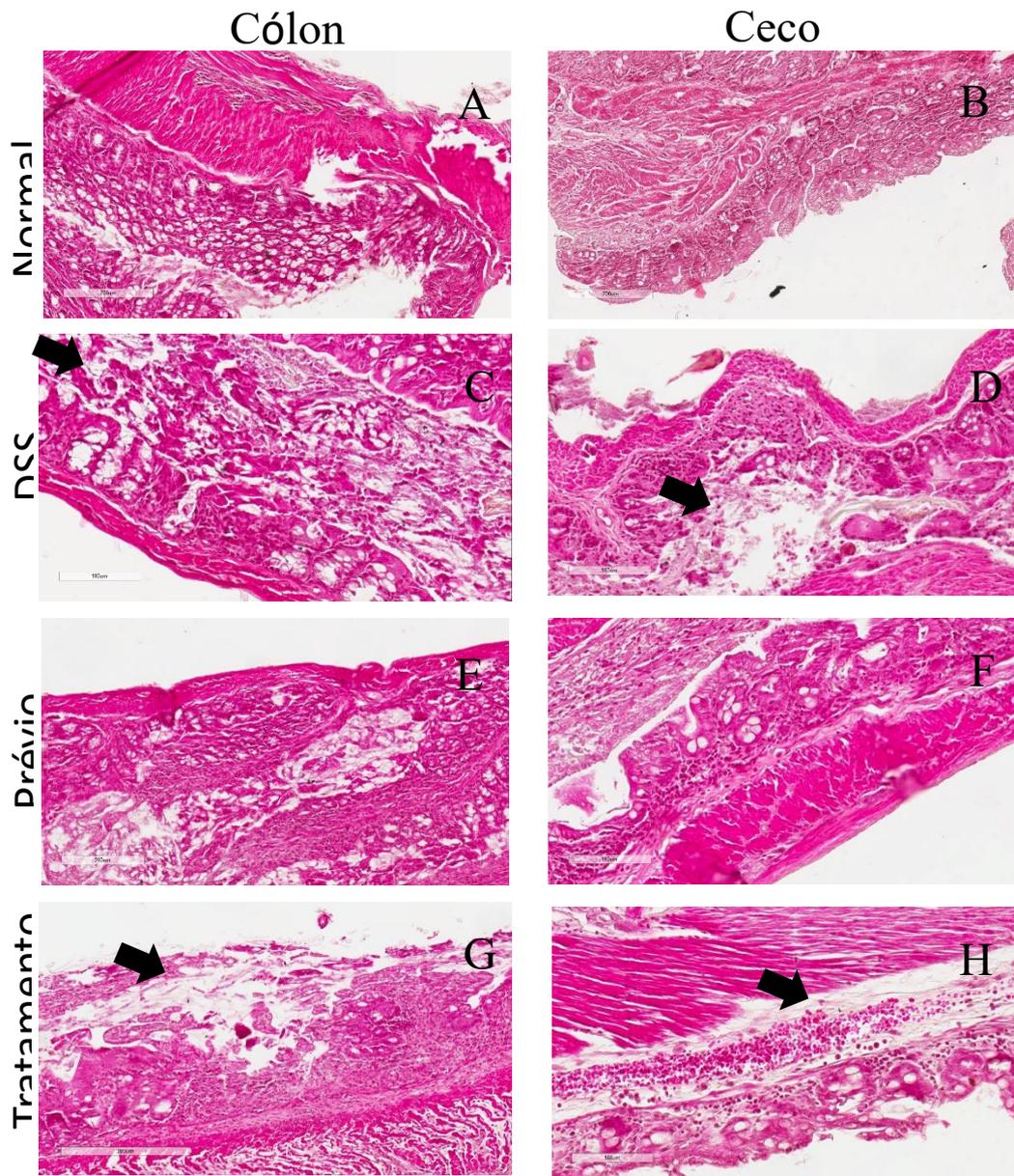


Figura 8 - Imagens de histopatológico de Ceco e Colón dos animais WT. Imagens A, C, E e G são lâminas feitas a partir do cólon proximal e as imagens B, D, F e H foram feitas a partir do ceco. As setas pretas apontam destruição tecidual causada pela inflamação.

Para confirmar os achados dos tecidos com diferentes graus de inflamação, os foram analisados os genes relacionados à inflamação e que estavam expressos no tecido. Os genes relacionados com a resposta inflamatória e que estavam expressos após a administração de DSS foram IL-1 β , IL 22, Lipocalin 2, PTX3, STAT 1, TBET e TNF- α , que são genes relacionados com um perfil inflamatório. Somente a administração de β -glucana apresentou aumento da expressão dos genes relacionados com uma resposta mais anti-inflamatória. Quando a β -glucana foi administrada antes da indução da colite, os genes relacionados com a resposta inflamatória não apresentaram um aumento de sua expressão com exceção da o IL-22, apesar de ser uma citocina pró-inflamatória em outros tecidos, no intestino apresenta um papel oposto. Outro gene que teve uma regulação positiva foi o PTX3, apesar de não ter havido aumento de TNF- α (Figura 10).

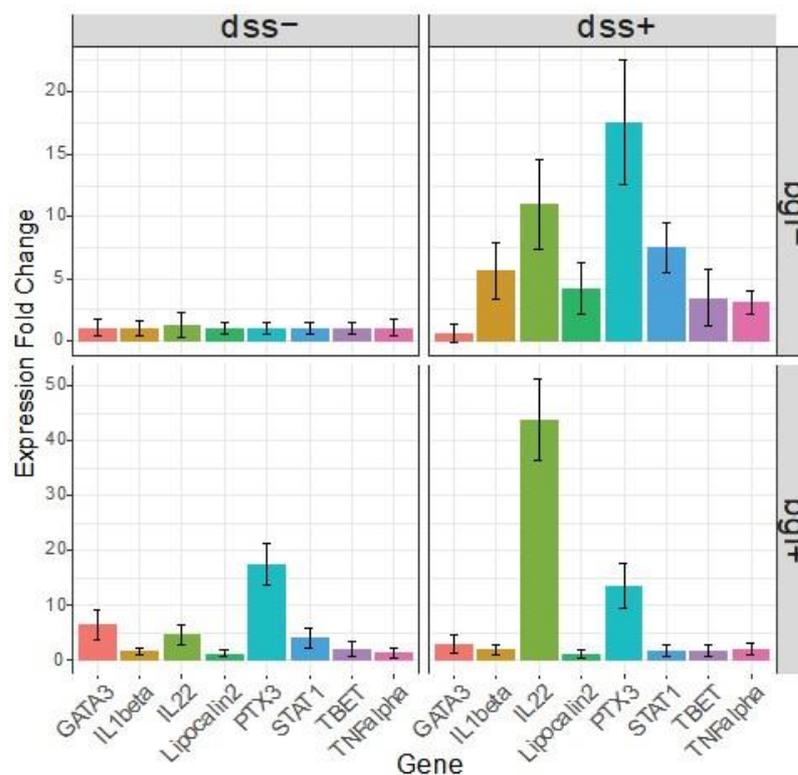


Figura 9 - PCRs do experimento de colite com animais WT feito para os genes GATA3, IL1beta, IL22, Lipocalin2, PTX3, STAT1, TBET e TNFalpha. Os quadrantes superiores mostram os grupos sem administração de β -glucana (bgl-), os inferiores representam os grupos com a administração de β -glucana (bgl+). Os quadrantes da direita são os grupos que tiveram colite induzida por DSS (dss+) e os quadrantes da esquerda, os grupos que não tiveram colite (dss-).

O efeito da β -glucana usada, como mencionado anteriormente, é obtido por meio de reconhecimento da molécula pelo receptor de Dectina-1. Para demonstrar que o efeito obtido é dependente desta via, animais knockout para o receptor em questão foram submetidos ao mesmo desenho experimental mostrado anteriormente para colite, uma vez que já havia sido demonstrado que a β -glucana utilizada neste projeto era capaz de interagir eficientemente com o receptor dectina-1. Para demonstrar que o efeito anti-inflamatório observado era dependente desta via, animais knockout para o receptor Dectina-1 foram submetidos ao mesmo desenho experimental com indução com tratamento e indução de colite (Figura 11). Os animais foram divididos nos grupos experimentais mostrados anteriormente e os animais seguiram o mesmo cronograma experimental que os animais selvagens.

A análise histopatológica comprova uma piora na inflamação e na integridade da mucosa no grupo DSS e que não foi tratado com a β -glucana. O tratamento com a β -glucana não mudou o padrão inflamatório do tecido, com destruição da mucosa, como observado nos

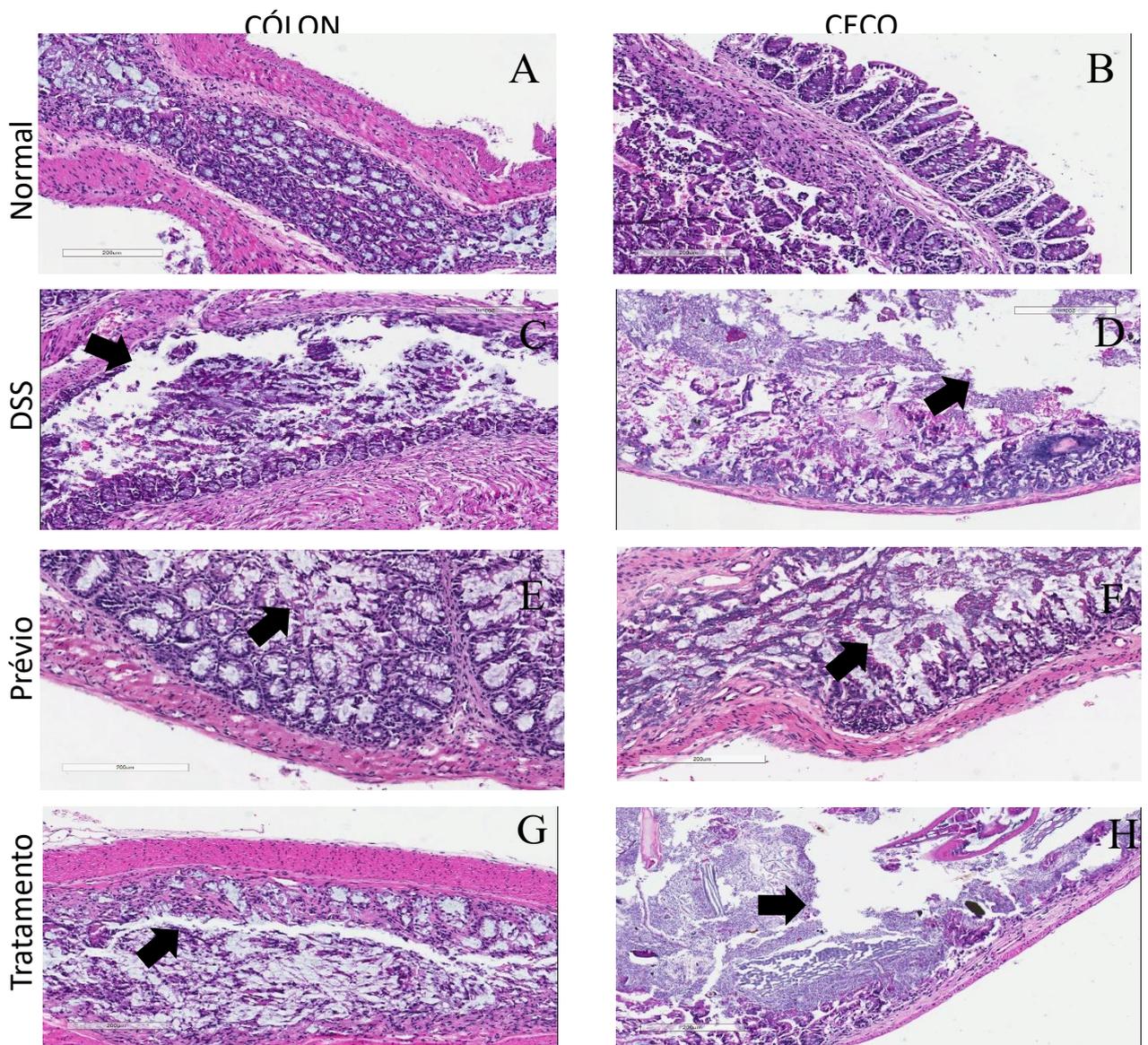


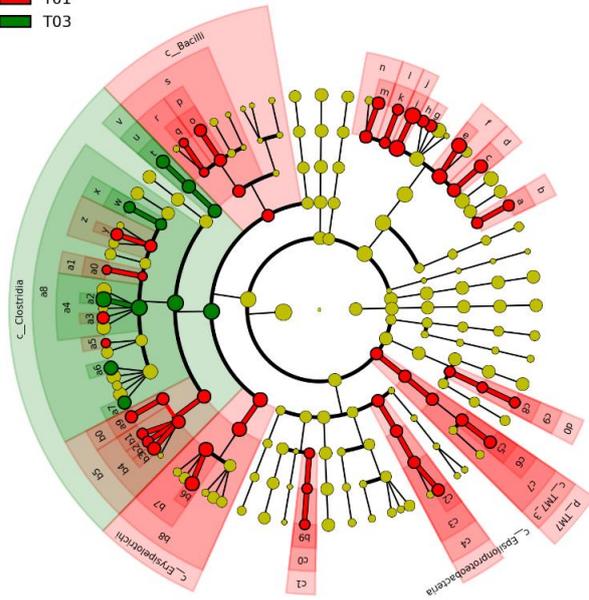
Figura 10 Imagens de histopatológico do Ceco e Colón dos animais KO para dectina-1. Imagens A, C, E e G são lâminas feitas a partir do cólon proximal e as imagens B, D, F e H foram feitas a partir do ceco. As setas pretas apontam destruição tecidual causada pela inflamação.

animais selvagens que receberam o mesmo tratamento, mostrando que o receptor de dectina-1 é importante para o efeito anti-inflamatório da molécula (Figura 11).

A microbiota dos animais *knockout* para Dectina-1 também foi sequenciada e caracterizada no laboratório do Prof.Dr. Christian Hoffman, sendo então comparada com a dos animais selvagens. A microbiota dos animais KO exibe não só uma mudança de microbiota com a administração de β -glucanas, quanto uma microbiota inicial diferente da encontrada nos animais WT (Figura 12). Diferentemente do que se observou para os animais selvagens, os

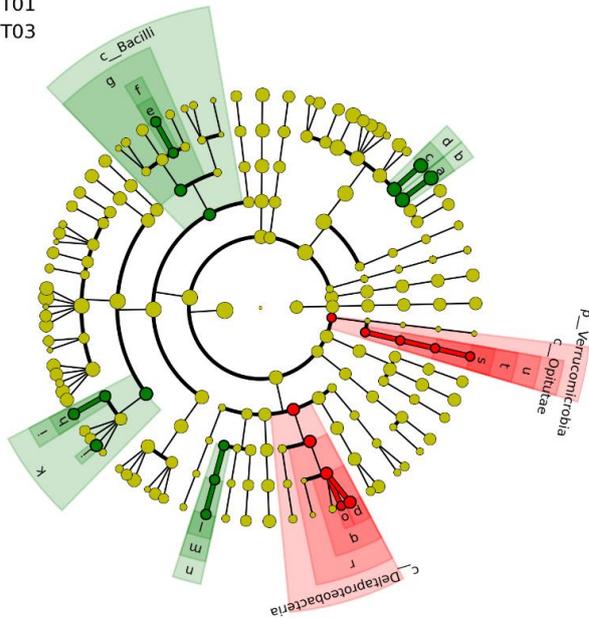
animais KO para dectina-1 apresentaram uma mudança no perfil no seu padrão de bactérias muito inferior, demonstrando a importância deste receptor no modelo estudado.

T01
T03



- a: Other
- b: Other
- c: g__Parabacteroides
- d: f__Porphyromonadaceae
- e: g__Prevotella
- f: f__Prevotellaceae
- g: g__AF12
- h: g__Rikenella
- i: g__
- j: f__S24_7
- k: g__Odoribacter
- l: f__Odoribacteraceae
- m: Other
- n: f__Paraprevotellaceae
- o: g__
- p: f__Lactobacillaceae
- q: Other
- r: f__Streptococcaceae
- s: o__Lactobacillales
- t: Other
- u: Other
- v: Other
- w: g__
- x: f__
- y: g__
- z: f__Clostridiaceae
- a0: g__Anaerofustis
- a1: f__Eubacteriaceae
- a2: g__
- a3: g__Dorea
- a4: f__Lachnospiraceae
- a5: g__
- a6: Other
- a7: g__Ruminococcus
- a8: o__Clostridiales
- a9: g__
- b0: f__
- b1: Other
- b2: g__
- b3: g__Adlercreutzia
- b4: f__Coriobacteriaceae
- b5: o__Coriobacteriales
- b6: g__Allobaculum
- b7: f__Erysipelotrichaceae
- b8: o__Erysipelotrichales
- b9: g__
- c0: f__
- c1: o__RF32
- c2: g__Helicobacter
- c3: f__Helicobacteraceae
- c4: o__Campylobacteriales
- c5: q

T01
T03



- a: g__Bacteroides
- b: f__Bacteroidaceae
- c: g__Parabacteroides
- d: f__Porphyromonadaceae
- e: g__Enterococcus
- f: f__Enterococcaceae
- g: o__Lactobacillales
- h: g__
- i: f__
- j: g__Adlercreutzia
- k: o__Coriobacteriales
- l: Other
- m: Other
- n: Other
- o: g__Bilophila
- p: g__Desulfovibrio
- q: f__Desulfovibrionaceae
- r: o__Desulfovibrionales
- s: g__
- t: f__
- u: o__HA64

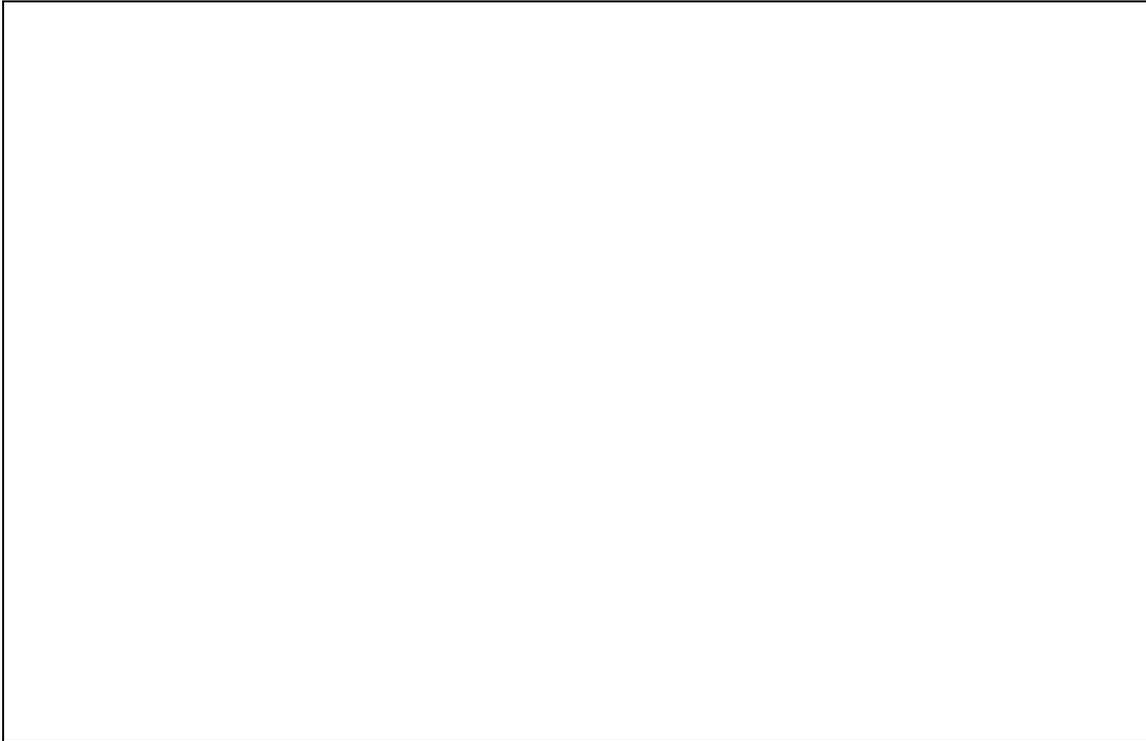


Figura 11 Caracterização da microbiota intestinal em animais WT (A) e Knockout para o receptor Dectina-1 (B) nos dias T01 (vermelho) e T03 (verde). Os animais receberam tratamento com β -glucana e as populações microbianas foram comparadas entre o início do tratamento e após a modificação gerada pelo tratamento.

Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a administração de β -glucana obtida do cogumelo *G. lucidum* seria capaz de modular duas patologias cuja microbiota já foi descrita como importante na evolução da doença.

No modelo experimental de colite a homeostase da mucosa é rompida com a administração de DSS gerando um quadro inflamatório agudo que se assemelha muito à colite humana. A colite induzida por DSS, usada neste trabalho, foi bem-sucedida gerando aumento da expressão de genes pró-inflamatórios além de gerar danos aos tecidos intestinais. A administração da β -glucana de *Ganoderma lucidum* anteriormente a indução de colite, gerou uma resposta inflamatória diminuída. No entanto, a administração posterior a indução da colite maximiza os efeitos da inflamação.

A colite induzida por DSS gera uma resposta inflamatória que, inicialmente, era relacionada com uma resposta Th2 (IL-5) mas já foram demonstrados que fatores de resposta Th1 (TNF α)

e Th17 (IL-17 e IL-23) são importantes nesse quadro inflamatório (Sands 2007; Fuss 1996). A resposta inflamatória está diretamente relacionada com a sintomatologia da colite. Produção de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-6, IL-33 e TNF α ajudam na manutenção e piora do quadro enquanto citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-37 e TGF β diminuem os efeitos danosos da inflamação (Tatiya-aphiradee 2018).

Dados prévios do laboratório já tinham observado que o tratamento com a β -glucana só alterava a população microbiana do intestino de animais saudáveis depois de 3 dias de tratamento, o que descartava a influência da metabolização do carboidrato e sugeria a participação da ativação da resposta imune neste quadro (Figura 12).

O receptor que reconhece a β -glucana, dada como tratamento, é a Dectina-1, e apresenta um papel dual no intestino. A função primária da ativação deste receptor é a eliminação e proteção do corpo contra fungos patogênicos pelo reconhecimento das moléculas na parede celular destes organismos, porém já foi mostrado também o papel do receptor Dectina-1 na resposta inflamatória como um potencializador da inflamação (Yoshitomi 2005). Inicialmente o papel do receptor Dectina-1 no intestino foi associado à melhora da indução da colite por DSS. Iliev e colaboradores (2012) observaram um aumento na produção de mediadores inflamatórios que levaram a um quadro mais grave da colite induzida por DSS em camundongos KO para o gene que codifica o receptor dectina-1, demonstrando apesar do seu papel protetor em infecções fúngicas, no intestino estava associado à resposta inflamatória. Utilizando o mesmo modelo experimental em camundongos *germ free*, Tang e colaboradores (2015) mostraram um efeito contrário, onde os camundongos knockouts para este receptor eram mais resistentes à colite quando comparados ao tipo selvagem. A importância da microbiota deste modelo foi verificada quando a transferência desta microbiota dos camundongos KO resistente para o tipo selvagem *germ-free* conferiu resistência à colite. Os autores observaram que a ausência do receptor dectina-1 inibiu a produção de peptídeos antimicrobianos, permitindo um aumento na população de *Lactobacilli*, e consequentemente aumento das células T regulatórias. No entanto, quando nesta microbiota observou-se a presença da *Candida tropicalis*, o fenótipo de resistência foi alterado para o de susceptibilidade à indução da colite (Iliev et al., 2015), sugerindo que esse papel duplo da dectina-1 é altamente dependente da composição da microbiota.

Os AMPs são pequenas proteínas secretadas por células do epitélio intestinal, células do sistema imune ou células de paneth. Dentre os AMPs secretados, a família S100A formada

por vários AMPs entre eles a calprotectina, que é eficaz na supressão do crescimento de bactérias e a família RegIII, que atacam especificamente bactérias gram-positivas, merecem um foco maior (Gallo and Hooper, 2012; Cash et al., 2006; Lehotzky et al., 2010)

A citocina IL-22 é capaz de induzir resposta inflamatória no corpo, mas no intestino exerce uma função diferente. No tecido intestinal, a expressão de IL-22 ajuda na manutenção da integridade tecidual e da produção de muco agindo na cicatrização e na recuperação tecidual, sendo assim, o aumento da expressão de IL-2 nos animais tratados anteriormente com β -glucana sugere uma integridade tecidual maior do que a encontrada nos controles (Sugimoto 2008; Mizoguchi 2018). Outro marcador inflamatório que está modulado no modelo da colite é a expressão do gene da pentraxina 3 (PTX3), que é expresso por diferentes tipos celulares, particularmente pelos fagócitos mononucleares, células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais em resposta à estímulos inflamatórios. O PTX3 é produzido e rapidamente secretado, se ligando com alta afinidade à proteína C1q do sistema complemento, proteína 6 de matriz extracelular induzida pelo TNF- α e alguns micro-organismos como o *Aspergillus fumigatus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O PTX3 facilita o reconhecimento dos patógenos uma vez que pode ser reconhecido por receptores do Sc ou pelo receptor Dectina-1 (Savchenko et al 2011). No modelo de colite estudada neste trabalho, está relacionado também com o processo inflamatório induzido na colite. Observou-se altos níveis de expressão de PTX3, indicando uma colite mais severa, porém nos animais tratados com β -glucanas previamente, o nível de expressão deste gene apresentou-se diminuído em comparação aos animais sem tratamento, indicando uma diminuição na inflamação associada a colite (Savchenko et al 2011). No grupo tratado apenas com a fração, o aumento do número de transcritos de PTX3 pode indicar uma maior infiltrado celular na área intestinal, porém sem caracterizar uma inflamação, já que esta não é corroborada nos outros marcadores inflamatórios dosados.

No modelo usado neste trabalho, os camundongos são livres de patógenos, mas não *germ free* e a estimulação do receptor dectina-1 pelas β -glucanas protegeu o camundongo da indução de colite, pela modulação da população bacteriana, como o aumento da *Akkermansia*. A ausência deste receptor manteve o padrão inflamatório observado nos animais selvagens sem tratamento.

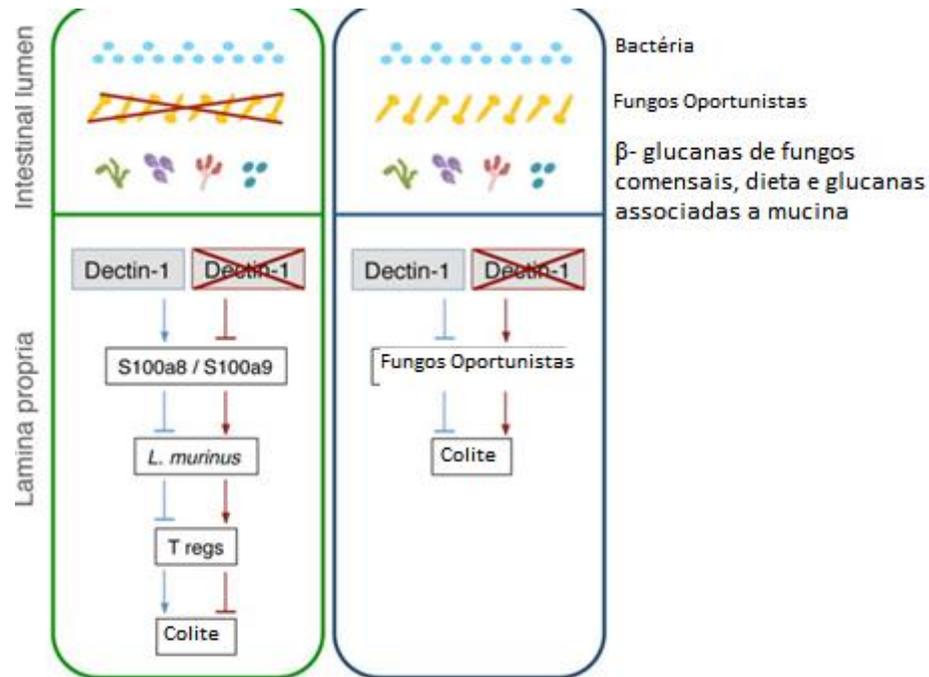


Figura 12 Via de ativação celular desencadeada pelo estímulo com glucanas na presença ou ausência de dectina-1. Modificado de Iliev et al., 2015

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os resultados encontrados por Xie e colaboradores (2019) onde animais que receberam dieta suplementada com β -glucanas de *G. lucidum* apresentaram sintomas mais brandos de colite do que os controles receberam dieta sem a suplementação. De acordo com o mesmo autor, a suplementação com β -glucanas é capaz de promover o aumento na população de *Ruminococcus* que são capazes de aumentar a secreção de SCFA além de diminuir as populações de linhagens possivelmente patogênicas como a *Escherichia-Shigella*. Dados do nosso trabalho mostraram que a β -glucana utilizada foi capaz de conter o crescimento de *E. coli*, um mecanismo que pode corroborar com o processo inflamatório no intestino (Figura 13).

A suplementação de dieta com β -glucana do *G. lucidum* tem mostrado resultados promissores em reduzir outras patologias intestinais, como o desenvolvimento de câncer colorretal com uma mortalidade 30% menor do que os grupos controles e diminuição da inflamação em quadros de doença de Chron, aumentando a robustez dos resultados de tal tratamento ser efetivo na proteção do tecido intestinal tanto no cenário de carcinogênese quanto na colite associada a esse quadro. (Luo et al 2018; Sliva et al 2012; Liu 2015),

Em resumo, observamos neste trabalho que o tratamento prévio com frações de β -glucana do *G. lucidum* preveniram o quadro de colite induzida por DSS. Tal melhora pode ser explicado tanto pela contenção direta do crescimento de algumas populações presentes na microbiota, como foi visto com *E. coli*, como pela modulação da expressão de citocinas inflamatórias induzidas por meio de reconhecimento pelo receptor Dectina 1 e seus efeitos subsequentes ou pela modificação da microbiota frente ao tratamento. A importância independente de cada um destes fatores ainda deve ser estudada.

Capítulo II

Introdução

Doença de Parkinson

As doenças neurodegenerativas se baseiam na incapacidade do corpo em regenerar certas linhagens de células neurais, causando danos em funções que dependem de tais vias. A doença de Parkinson é uma doença multifatorial e com determinantes genéticos ainda pouco conhecidos, apesar de 10% dos pacientes terem antecedentes na família. Com o aumento da expectativa de vida, houve um aumento considerável de casos de Doença de Parkinson, hoje totalizando 1-2% de pessoas acima de 65 anos e 4-5% em pessoas acima de 85 com a doença. A estimativa atual é que existam 6,3 milhões de pacientes diagnosticados com a doença e que em 2030, esse número chegue em 8,3 milhões de acometidos (Pavlou et al 2017).

A morte de neurônios dopaminérgicos e a incapacidade de reposição destes neurônios causam o quadro clínico de Parkinson. A perda neuronal é dada devido ao acúmulo de α -sinucleína, uma proteína abundante nos terminais pré-sinápticos que, em condições normais, é quebrada e eliminada sem causar danos. Contudo, na Doença de Parkinson, estas proteínas se apresentam aglomerados, com conformações anormais, denominados corpúsculos de Lewis. Estas proteínas alteram o funcionamento mitocondrial e consequente causam a morte celular. (Burré et al 2018).

A redução do número de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal leva o paciente a apresentar problemas de controle motor, tendo como manifestações clínicas o tremor, dificuldade de iniciar movimentos, instabilidade postural e bradicinesia. Concomitantemente, há o surgimento de sintomas não motores como a depressão, apatia, dores e dificuldades no controle de movimentos peristálticos (Jankovic 2008).

A dopamina é um neurotransmissor importante no aprendizado, movimento, humor e emoções. Pertencente à família das catecolaminas, a dopamina exerce diferentes funções no cérebro e no corpo e é reconhecida pelos receptores D1, D2, D3, D4 e D5 que estão distribuídos pelo cérebro. A dopamina está relacionada a motivação e ativação do sistema de recompensa, além de ser um precursor natural de noradrenalina e adrenalina (Chakravarthy, S et al 2018).

Aproximadamente 50% da dopamina periférica é produzida no intestino por nervos entéricos e células intestinais epiteliais, apresentando diferentes afinidade aos diferentes tipos

de receptores (D3 > D5 > D4 > D2 > D1). Estes receptores estão presentes nas células intestinais e em células do sistema imune inato e adaptativo presente no intestino. Essa diferença de afinidade e a distribuição destes receptores é responsável pela diversidade da modulação do sistema imune e o trato intestinal pela dopamina (Xue et al 2018).

O diagnóstico da Doença de Parkinson é feito clinicamente a partir de critérios pré-estabelecidos para fechar o diagnóstico de Parkinson ou um diagnóstico alternativo (Tolosa et al 2006). Exames de imagem e exames histopatológicos *post mortem* podem ser usados para respaldar o diagnóstico (Pagano et al 2016). O tratamento dessa enfermidade é feito com medicamentos que aumentam o nível de dopamina no cérebro, tentando restaurar as funções normais e diminuir os sintomas da doença. A dopamina não pode ser administrada diretamente por ser incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica para atingir seu alvo, então são utilizados precursores da dopamina que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e são convertidos em dopamina no cérebro, como a L-dopa, agonistas do receptor de dopamina que mimetizam o efeito da dopamina no cérebro como bromocriptina e o pergolide ou inibidores de monoamina oxidase (MAO B) e Catecol O-Metiltransferase (COMT) que são enzimas responsáveis pela quebra e metabolização da dopamina. Também podem ser administrados amantadina e anticolinérgicos que contribuem para a diminuição dos sintomas motores (Ferri FF 2018; Tarsy D 2018).

Estudos recentes mostram que a microbiota intestinal é responsável por parte da produção de serotonina, um importante neurotransmissor. Mudanças na microbiota geram diferenças no comprometimento motor dos pacientes com Parkinson, podendo apresentar melhoras significativas. A comunicação entre o intestino e o sistema nervoso central se dá por três vias: (a) produção de ácidos graxos de cadeia curta, (b) o nervo vago e (c) o sistema imune. Pela capacidade da microbiota de modular o sistema imune, a neuroinflamação presente nas doenças neurodegenerativas também é diminuída na ausência de populações microbianas produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) (Sampson et al 2016).

Objetivo

Objetivo Geral

Sabendo da atividade da β -glucana na microbiota bacteriana de camundongos e do efeito da microbiota sobre doenças como colite e Doença de Parkinson, o objetivo deste trabalho foi determinar a importância da modulação da microbiota bacteriana pelo *Ganoderma lucidum* em modelos murinos experimentais de colite induzida por sulfato de sódio dextran (DSS) e Parkinson induzido por 6OHDA (6-hidroxidopamina).

Objetivos específicos

1. Avaliar o impacto da ausência da microbiota bacteriana na capacidade motora de animais submetidos a indução de Parkinson.
2. Avaliar o impacto da administração de *Ganoderma lucidum*, na capacidade motora de animais submetidos à indução de Parkinson.

Materiais e Métodos

Indução de Parkinson

No modelo experimental de doença de Parkinson, os animais Swiss seguiram um protocolo de indução com 6-hidroxidopamina (6OHDA) por injeção intracerebral (Thiele 2012). Os animais foram divididos entre os grupos experimentais de maneira aleatória e os animais dos grupos sem microbiota receberam um mix de antibióticos que consiste em vancomicina (50mg/kg), kanamicina (100mg/kg), ampicilina (100mg/kg) e metronidazol (100mg/kg), que foi administrado por meio de gavagem em um volume de 100ul por animal a cada 12 horas por um período de 10 dias.

No 11º dia, os animais foram anestesiados usando ketamina(150mg/kg) e xilazina (10mg/kg) injetados via intra-peritonial. Anestesiados, os animais foram imobilizados em um esterotáxico, tiveram o local da cirurgia limpo com iodo, os pelos cortados, anestesia local aplicada afim de diminuir sangramentos e quaisquer desconfortos e o crânio exposto, o crânio aparente foi limpo usando água oxigenada 10 volumes e, finalmente, a 6OHDA injetada no cérebro de acordo com as coordenadas: Antero Posterior = +1,0; Meso Lateral= +1,8 e Dorso Ventral= -3,5 a partir do bregma com o auxílio de uma broca cirúrgica. Após o procedimento, o local da perfuração é fechado com um curativo de algodão e o crânio exposto é coberto com acrílico auto polimerizante. Após a cirurgia, os animais ficavam em ambiente aquecido até retomada de consciência. Durante os 3 primeiros dias de pós-operatório, os animais receberam uma injeção diária de 500ul de soro glicosado subcutâneo e oferecimento de alimento (ração batida com soro glicosado) para facilitar a alimentação.

Nos três dias antes da cirurgia os animais foram submetidos a treinamentos no RotaRod por 5 minutos intercalados com 5 minutos de descanso por 5 vezes. No quinto dia após a cirurgia, os animais foram desafiados com RotaRod por no máximo 5 minutos para medir a capacidade motora após a indução da doença, para determinar capacidade motora. O teste mede o tempo em que o animal consegue permanecer em cima de uma roda em movimento contínuo. A permanência do animal no aparelho por cinco minutos confere a ele uma capacidade motora saudável, tempos menores indicam uma capacidade motora diminuída.

No sétimo dia após a cirurgia, os animais foram injetados com apomorfina (0,00057mg por animal) subcutânea e após 30 minutos, os animais foram observados por 5 minutos e tiveram a quantidade de giros contada para estimar o tamanho da lesão causadas. A apomorfina é um agonista dopaminérgico e sua aplicação gera rotações contralaterais, a quantidade de giros

é proporcional ao tamanho da lesão. Após o teste de apomorfina, os animais foram eutanasiados por asfixia com uso de câmara de CO₂. Intestino foi retirado para análises futuras.

Os animais foram divididos em: um grupo com animais saudáveis que não passaram por nenhuma cirurgia (Grupo Controle), um grupo de animais saudáveis que passaram pelo procedimento cirúrgico mas que tiveram solução salina injetada ao invés de 6OHDA (Grupo SHAM), um grupo saudável que passou pelo procedimento cirúrgico com a injeção de 6OHDA (Grupo 6OHDA), um grupo com a microbiota diminuída que passou pelo processo cirúrgico mas que tiveram solução salina injetada ao invés de 6OHDA (Grupo SHAM+AB), um grupo com a microbiota diminuída que passou pelo procedimento cirúrgico com injeção de 6OHDA (Grupo 6OHDA+AB). O modelo utilizado tem uma alta taxa de mortalidade e por isso, foi feito um n=7 para os experimentos sem adição de β -glucanas e com n=5 para os experimentos com adição de β -glucana, para atingir uma relevância estatística mínima desejável dentro das limitações impostas pela mortalidade excessiva.

Controle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia																	
Pós-Operatório																	
Apomorfina																	

Tabela 2 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo Controle. Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com RotaRod (verde), a cirurgia (azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

Controle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia																	
Pós-Operatório																	
Apomorfina																	

Tabela 3 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo Controle sem Antibióticos. Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com RotaRod (verde), a cirurgia

azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

6OHDA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia-6OHDA																	
Pós-Operatório																	
Apomorfina																	

Tabela 4 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo SHAM (cirurgia sem injeção de droga). Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com RotaRod (verde), a cirurgia (azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

SHAM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia-salina																	
Pós-Operatório																	
Apomorfina																	

Tabela 5 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo 6OHDA (cirurgia com injeção da droga). Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com

RotaRod (verde), a cirurgia (azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

SHAM+AB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia-salina																	
Pós-Operatório																	
Apomorfina																	

Tabela 6 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo SHAM +AB (cirurgia sem injeção da droga e com administração de antibióticos). Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com RotaRod (verde), a cirurgia (azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

6OHDA+AB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia-6OHDA																	
Pós-Operatório																	
Apomorfina																	

Tabela 7- Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo 6OHDA +AB (cirurgia com injeção da droga e com administração de antibióticos). Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com RotaRod (verde), a cirurgia (azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

6OHDA BG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Antibióticos																	
RotaRod																	
Cirurgia																	
Pós-Operatório																	
β -glucana																	
Apomorfina																	

Tabela 8 - Desenho experimental de indução de Parkinson - Grupo 6OHDA +AB + BG (cirurgia com injeção da droga; com administração de antibióticos e com tratamento com frações de Ganoderma lucidum). Administração de antibióticos (coral), o treinamento/desafio com RotaRod (verde), a cirurgia (azul), o pós-operatório (amarelo), a administração de β -glucana (rosa) e o teste de apomorfina/sacrifício (preto) especificados dentre os 17 dias do experimento.

Análise estatística

Os gráficos e análises estatísticas deste trabalho foram feitos no programa Prism GraphPad 8.3. O teste estatístico escolhido foi o One-way anova, em que a significância foi considerada quando com *, quando $P < 0,05$; com **, quando $P < 0,01$; com ***, quando $P < 0,001$; com ****, quando $P < 0,0001$ e com ns, quando $P > 0,05$.

Resultados

Influência da microbiota no desenvolvimento da doença de Parkinson.

Para determinar a importância da microbiota bacteriana modulada pelo tratamento com a β -glucana, no modelo murino da doença de Parkinson, induzida pela injeção intracerebral unilateral de 6OHDA no estriato, os animais foram divididos em grupos conforme detalhado anteriormente. Conforme padronizado previamente, a injeção intracerebral de 6OHDA gerou uma lesão no estriato, especificamente em neurônios dopaminérgicos, com efeito similar à lesão encontrada nos casos naturais de Parkinson (Duty 2011).

Após cinco dias da cirurgia de indução da doença, os animais do grupo que tiveram a droga indutora injetada (6OHDA) apresentam uma diminuição da capacidade motora aferida pela diminuição do tempo de permanência no RotaRod sugerindo uma indução da destruição dos neurônios dopaminérgicos bem-sucedida, quando comparados com o grupo não operado (controle) ou que foram submetidos à cirurgia mas não receberam 6OHDA (SHAM) (Figura 14).

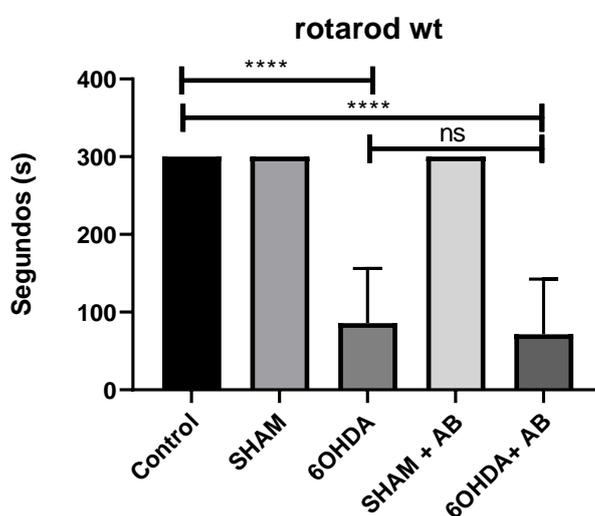


Figura 13 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu tempo de permanência no RotaRod medido após cinco dias da cirurgia. Os grupos controle e SHAM que não receberam a droga indutora de Parkinson, apresentam tempo máximo de permanência no aparelho enquanto os grupos que receberam o indutor mostram considerável redução no tempo.

Para analisar se a microbiota era capaz de interferir com o estabelecimento do Parkinson neste modelo experimental, os animais foram tratados com um coquetel de antibióticos. A taxa de mortalidade no grupo tratado com os antibióticos foi elevada, mesmo levando em consideração o modelo descrito na literatura. A tabela 9 demonstra que o grupo com microbiota diminuída teve mais que o dobro de mortes quando comparado aos animais com microbiota intacta. A morte dos animais pode estar associada a uma maior fragilidade destes animais, reforçando a importância da microbiota na doença de Parkinson. Analisamos então a modulação dos animais que permaneceram vivos mesmo com o uso dos antibióticos.

Mortes por grupo	Com injeção de Salina	Com injeção de 6OHDA
Com Antibióticos	0	14
Sem Antibióticos	1	5

Tabela 9 - Morte de animais durante os experimentos dos grupos com ou sem indução da doença e com ou sem diminuição da microbiota.

Conforme demonstrado na figura, a ausência da microbiota nos animais que sobreviveram, não interferiu nos resultados observados tanto do grupo SHAM quanto do grupo tratado (6OHDA). (Figura 13).

Após sete dias após a cirurgia de indução da lesão, os animais receberam inoculação de apomorfina (sc) para que o tamanho da lesão pudesse ser estimado. Animais do grupo controle ou SHAM apresentaram poucos ou nenhum giro contralateral. Os animais tratados com 6HODA apresentaram números maiores de giros, comprovando a indução da lesão cerebral. No entanto, a administração do coquetel de antibióticos não alterou os resultados observado nos animais com a microbiota intacta (Figura 15).

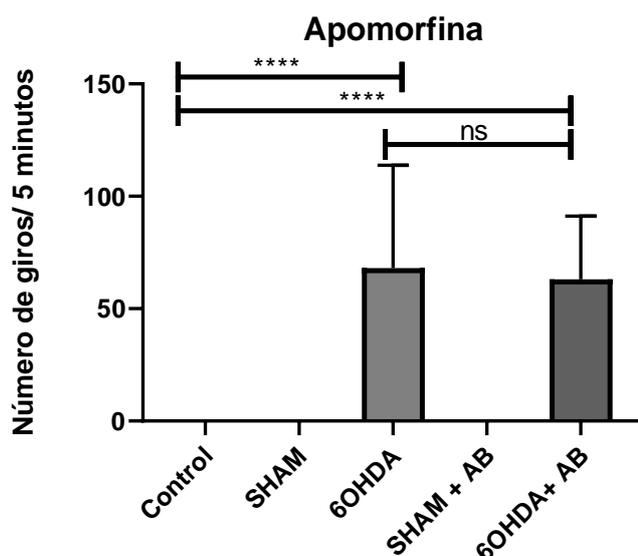


Figura 14 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu número de giros contabilizados durante cinco minutos após trinta minutos da injeção de apomorfina subcutânea. Os grupos controle e SHAM, que não receberam a droga indutora, apresentam número nulo de giros enquanto os grupos que receberam o indutor apresentam quantidade significativa de giros.

Considerando que, neste modelo onde grande parte dos animais tratados sucumbiram à doença de Parkinson, a presença da microbiota não foi determinante na avaliação da doença, utilizamos um modulador da microbiota, já padronizado pelo nosso grupo, a β -glucana do cogumelo *Ganoderma lucidum*. Conforme descrito anteriormente, a β -glucana foi administrada nos três primeiros dias de pós-operatório por gavagem, na tentativa que a modulação a população bacteriana da microbiota intestinal. Após cinco dias da cirurgia de indução do Parkinson, os animais foram submetidos ao teste de capacidade motora, o RotaRod (Figura 15). O resultado mostrou que a indução de doença de Parkinson foi bem-sucedida por apresentar diferenças estatísticas entre o grupo controle e o SHAM e os grupos que tiveram a droga indutora injetada 6HODA. A administração de β -glucanas após o procedimento cirúrgico não alterou a permanência dos animais no aparelho. (Figura 16).

No teste com apomorfina, após sete dias da administração da droga indutora da doença, os animais não apresentaram diferença estatística entre os grupos que foram tratados com a β -glucana (Figura 17).

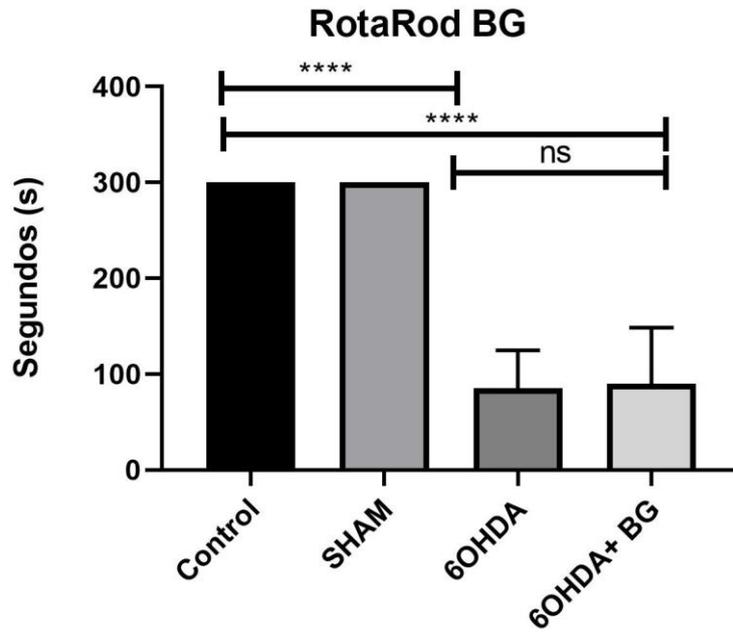


Figura 15 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu tempo de permanência no RotaRod medido após cinco dias da cirurgia. Os grupos controle e SHAM que não receberam a droga indutora de Parkinson, apresentam tempo máximo de permanência no aparelho enquanto os grupos que receberam o indutor mostram considerável redução no tempo apesar do tratamento com β -glucana (BG) não ter surtido efeito.

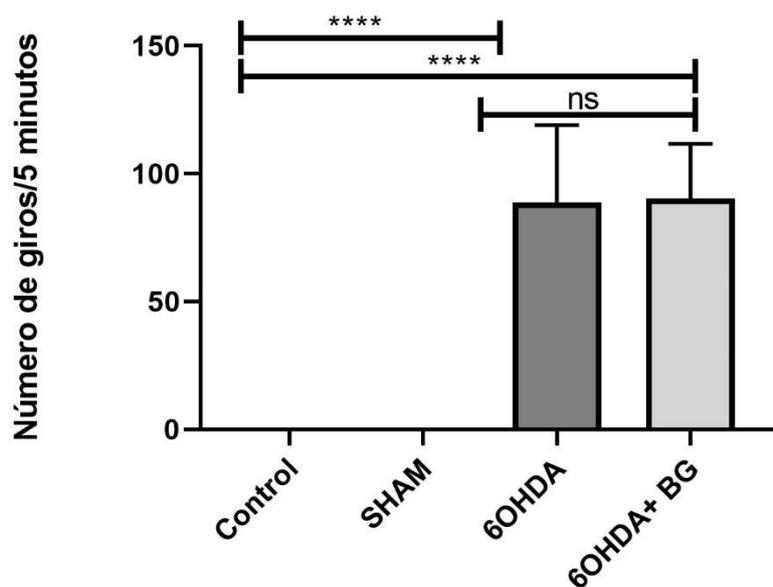


Figura 16 Animais Swiss de 8 a 12 semanas tiveram seu número de giros contabilizados durante cinco minutos após trinta minutos da injeção de apomorfina subcutânea. Os grupos controle e SHAM, que não receberam a droga indutora, apresentam número nulo de giros enquanto os grupos que receberam o indutor apresentam quantidade significativa de giros apesar do tratamento com β -glucanas não ter surtido efeito.

Com base nos resultados apresentados acima, podemos supor que a administração de β -glucana após indução de Parkinson por injeção de 6OHDA ou a administração de antibióticos anteriormente, não apresentaram efeito protetivo/deletério no efeito motor da doença.

Discussão

O outro modelo que testamos para analisar a atividade das β -glucanas foi a doença experimental de Parkinson induzido com a 6OHDA. Neste modelo não observamos qualquer atividade moduladora na gravidade dos sintomas apresentados.

Estudos recentes mostram que os pacientes com doença de Parkinson apresentam uma microbiota pouco diversa e com aumento de populações específicas, independentemente do estilo de vida destes pacientes. Em modelos animais, já foi demonstrado a importância da microbiota intestinal em animais que desenvolvem a doença naturalmente ou que tem a doença

induzida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) apresentando uma melhora significativa ($p < 0,001$) em testes motores quando houve o transplante de microbiota de um animal saudável para o doente (Langston JW 2017; Sun MF et al 2018). A disbiose encontrada no Parkinson em modelo animal, tanto natural quanto induzido por MPTP, é um fator importante na sintomatologia dos acometidos.

Alguns artigos relacionam a perda de diversidade na microbiota, que acontece naturalmente com o envelhecimento, com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas nesta mesma faixa etária (Sun MF et al 2018). Infecções intestinais, como a infecção por *Helicobacter pylori*, tiveram sua importância demonstrada em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (Shen et al 2017). A inflamação induzida pela *H. pylori*, aumenta a patogenicidade da doença de Parkinson e pacientes com PD são três vezes mais prováveis soro positivos para *H. pylori* do que controles (Charlett et al 1999). Doenças neurodegenerativas também foram relacionadas ao crescimento anormal de bactérias no intestino delgado (Fasano et al 2013).

O desenvolvimento da doença de Parkinson, causa modificações na microbiota que se afastam muito dos controles de mesma idade e estilo de vida. Entre as mudanças, a supressão da família *Prevotellaceae* e espécies com efeitos anti inflamatórios como as dos gêneros *Blautia*, *Coprococcus*, *Roseburia* e *Fecalibacterium*, *Erysipelotrichaceae* e *Ruminococcus* além do aumento de gêneros de bactérias com resultados pró-inflamatórios como *Enterococcaceae*, *Proteobacteria* e *Enterobacteriaceae*, *Akkermansia*, *Bifidumbacterium*, *Streptococcus* e *Proteus*. Tal mudança de composição, gera agravamento dos sintomas relacionados a doença de Parkinson (Scheperjans 2015; Keshavarzian 2015; Hopfner 2017; Hill-Burns 2017; Hasegawa 2015; Bedarf 2017).

O modelo usado para indução com MPTP tem a droga injetada no peritônio já que a droga ultrapassa a barreira hematoencefálica por ser lipofílica. O modelo não gera lesão pelo acúmulo de α -sinucleína como o modelo natural de Parkinson, mas ele passa por uma metabolização após chegar ao cérebro, processo que não acontece no modelo de indução por 6OHDA que tem a injeção feita já no local de ação. Ao passar a barreira hematoencefálica, o MPTP é convertido em MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina), composto altamente tóxico, que é convertido por meio da monoamino oxidase (MAO B) por meio dos astrócitos (Schober A. 2004). A alta concentração de MPP⁺ causa danos na mitocôndria e gera morte celular por stress oxidativo, forma similar à que acontece nos casos de Parkinson natural (Langston JW 2017),

dentro das células o metabólito pode se acumular na mitocôndria, afetando o processo de respiração celular por impedir a ação do complexo I mitocondrial (Nicklas et al. 1985; Mizuno et al. 1987)

Em contrapartida, a injeção de 6OHDA que é um análogo da dopamina, causa morte celular, também, por disfunções na mitocôndria já que tal molécula foi especulado ser tóxica para o complexo 1 mitocondrial (Cleeter et al. 1992; Betarbet et al.2002), mas não ultrapassa a barreira e por isso, não apresenta efeitos sistêmicos (Ren et al 2019) (Figura 18)

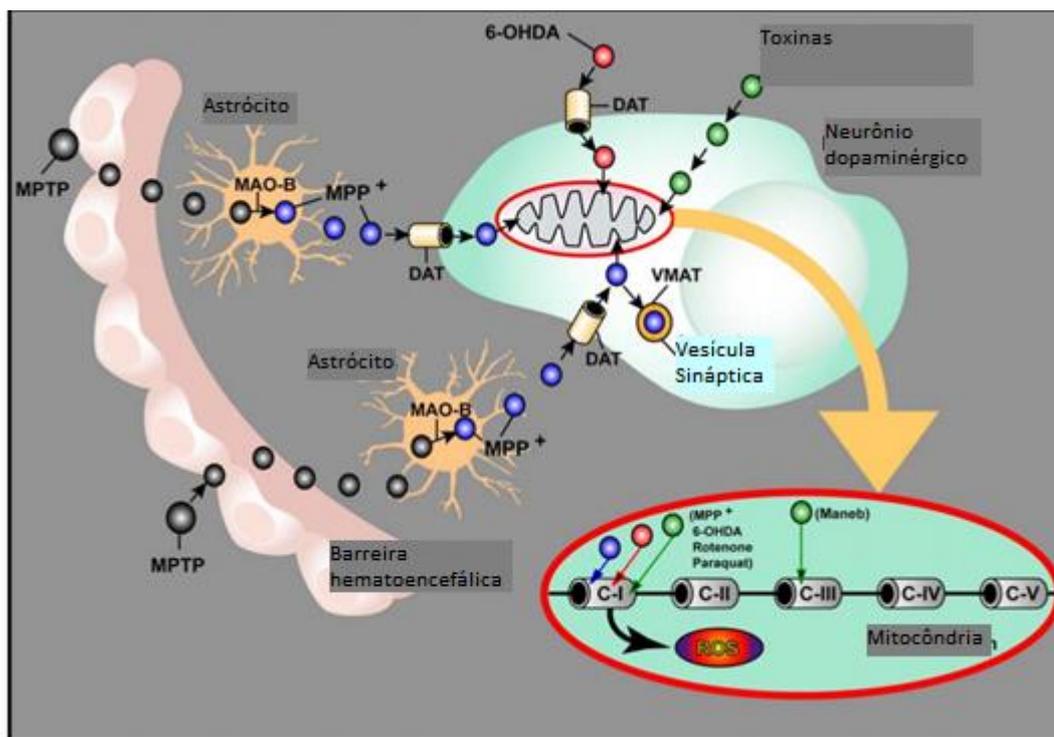


Figura 17 Mecanismo intracelular de ação do MPTP e da 6OHDA. O MPTP é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, é metabolizado pelo astrócito e compromete a função mitocondrial. Já a 6OHDA (Schober, A. et al 2004)

Esses dados levantam a hipótese de que tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica destas duas drogas geram diferentes fatores, que são determinantes na importância da microbiota nestes modelos. Com a administração sistêmica de MPTP ocasionada por uma injeção peritoneal, o efeito obtido, poderia ser dado pela possibilidade de ligação em neurônios dopaminérgicos periféricos causando efeitos em outros órgãos além do cérebro, o que explicaria o seu efeito sobre o intestino e a microbiota, apesar de nossos resultados não serem suficientes para confirmar essa hipótese. O tratamento local com 6OHDA, por sua vez, não tem ação sobre os neurônios periféricos e isso explicaria a falta de efeito dessa maneira de indução no intestino e na microbiota.

Era esperado que com o tratamento com a β -glucana, os animais tivessem diminuição dos sinais motores de Parkinson pela modificação gerada na microbiota como já foi mostrado em outros trabalhos que o transplante fecal, ou seja, a troca completa de microbiota gera uma melhora significativa nos sintomas motores dos animais. Dentre as limitações deste trabalho, a microbiota não sequenciada ainda não permite que seja afirmado que não houve alterações na microbiota podendo ter mudanças que apenas não fizeram a melhora desejada nos testes comportamentais. Também, não temos a confirmação de que o modelo de microbiota diminuída com os antibióticos tenha sido efetiva, mas com a ampla gama de antibióticos dados e a modificação da microbiota tanto com antibióticos quanto com a β -glucana não ter tido nenhum efeito, é provável que o modelo em questão não altere a microbiota e que o modelo de microbiota diminuída tenha sido efetivo.

Outra questão a ser explorada é a avaliação dos animais sobreviventes e seu microbioma. Os animais que sobrevivem a indução da doença e a retirada da microbiota poderiam ser considerados um grupo onde a microbiota bacteriana intestinal teve uma importância reduzida quando comparados aos animais não sobreviventes. Tal diferença pode ter comprometido o resultado encontrado.

Como sugestão para futuras análises que responderiam algumas das dúvidas apresentadas aqui, estariam o sequenciamento da microbiota para confirmação do modelo de microbiota diminuída e da mudança da microbiota induzida pelo 6OHDA. A administração de β -glucana em um modelo induzido por MPTP para confirmar a melhora esperada e a análise do comprometimento de neurônios periféricos no modelo de MPTP com o uso de bloqueadores em potencial que não ultrapassem a barreira hematoencefálica.

Capítulo III

Materiais e Métodos

Atividade da β -glucana em duas populações de bactérias

Inóculos de *E. coli* e *S. aureus* foram cultivados em meio LB líquido por 24 horas em estufa a 37°C. Os inóculos foram colocados em placa de 96 poços em triplicata biológica. Um grupo de cada linhagem foi colocado apenas com meio LB líquido e outro grupo de cada linhagem foi colocado com 100 μ g de β -glucana por poço. A placa foi colocada no Eon (marca) por 72h com rotação orbital contínua e temperatura de 37°C. Os parâmetros escolhidos foram usados para mimetizar as condições corporais, como a temperatura de 37°C, a mesma dosagem dada aos animais e o tempo que já foi mostrado anteriormente ser necessário para ver as mudanças na microbiota dos animais tratados.

Resultados

Ação direta da β -glucana

Para confirmar que as mudanças observadas na microbiota foram moduladas pela administração de β -glucanas pela atuação direta sobre a modulação no sistema imune e não por uma atividade microbicida, foi realizado a cinética de crescimento de uma bactéria gram-negativa, *Escherichia coli* (*E.coli*), e uma gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), por 72h a 37°C uma vez que estas duas bactérias estão presentes na microbiota intestinal.

Tanto a *E. coli* como o *S. aureus* apresentaram um crescimento exponencial até 30h de cultivo. A adição de β -glucana na cultura não interferiu no padrão de crescimento do *S. aureus*, o que mostra que não houve uma atividade direta deste carboidrato nas bactérias. Analisando o crescimento da *E. coli* incubada com a β -glucana, houve uma diminuição significativa do crescimento destas bactérias durante todo o tempo da cinética (Figura 19).

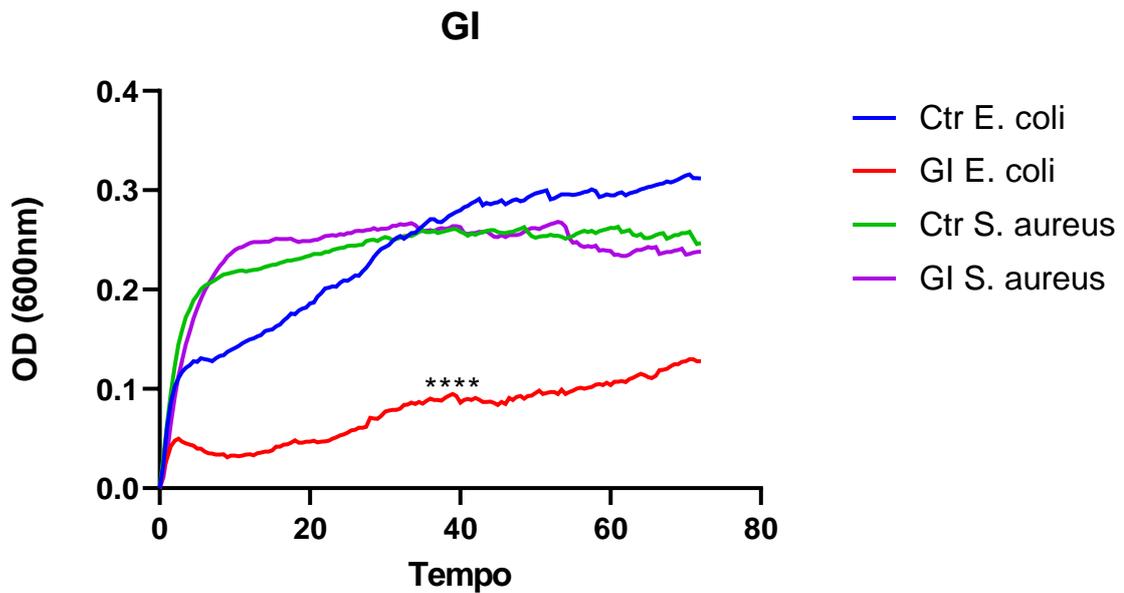


Figura 18 *E.coli* e *S.aureus* foram cultivadas na presença (vermelho e roxo) ou na ausência (azul e verde) de β -glucana proveniente de *G.lucidum*. O cultivo foi feito em placa de 96 poços e mantida no Eon por 72 horas a 37°C com OD (600nm) sendo medida a cada 30 min.

Após cinética de crescimento, as amostras de *E. coli* incubadas ou não com a β -glucana foram lavadas e plaqueadas em meio LB sólido para determinar se mecanismo da diminuição do crescimento era bacteriostático ou bactericida. Após 24 horas de incubação, as amostras foram analisadas (Figura 20). Observa-se que as amostras foram capazes de crescer por toda a placa. O crescimento do controle (esquerda) e do grupo tratado com β -glucana (direita) não teve alterações significativas indicando que a fração administrada não teve ação bactericida, mas sim, uma ação bacteriostática.

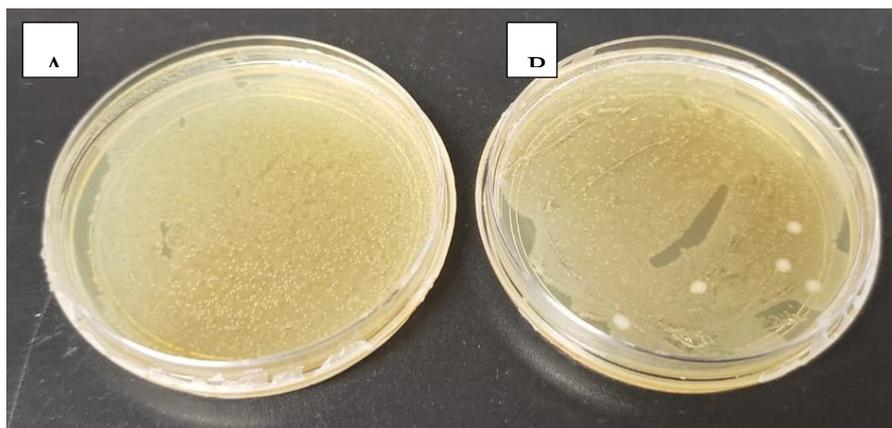


Figura 19 Placas de meio LB semeadas com a bactéria *E.coli* na presença (B) ou na ausência (A) de β -glucana por 24 horas a 37°C.

Conclusão

Os resultados obtidos nesse trabalho, mostram um potencial tratamento preventivo feito com a fração insolúvel da β -glucana em situações de crises inflamatórias recorrentes como a colite. Esse tratamento é feito tanto pela modulação do sistema imunológico do hospedeiro quanto pela ação direta da β -glucana que precisa ser melhor elucidada. No modelo de Parkinson, o modelo escolhido com aplicação local do indutor, se mostrou não efetivo para o estudo da influência da microbiota e novos ensaios com um modelo alternativo se mostram necessários.

Lista de Abreviaturas

AB	Antibióticos
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
AMP	Peptídeos antimicrobianos
cDNA	DNA Cíclico
CLR	Receptores de Tipo Lecitina
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de Carbono
COMT	Catecol O-Metiltransferase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSS	Sulfato de Sódio Dextrano
g	Força Centrífuga Relativa
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Citocinas da Família IL-1
m	Metro
MAO B	Monoamino Oxidase
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mg	Miligrama
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
ng	Nanograma

nm	Nanômetro
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por Minuto
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SNC	Sistema Nervoso Central
SyK	Tirosina Quinase Esplênica
Th	Linfócito T Auxiliar
TLR	Receptor do Tipo toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
O2	Oxigênio
UnB	Universidade de Brasília
USP	Universidade de São Paulo
WT	Wild Type – Animal selvagem
6OHDA	6-hidroxiopamina

Referências

- Adams JD Jr, Klaidman LK, Leung AC (1993) MPP⁺ and MPDP⁺ induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Radic Biol Med* 15:181–186
- Ahmet Unlu, Erdinc Nayir, Onder Kirca, Mustafa Ozdogan. *Ganoderma Lucidum (Reishi Mushroom) and cancer*. *JBUON* 2016; 21(4): 792-798
- Ballester Ferré, M. P., Boscá-Watts, M. M., & Mínguez Pérez, M. (2018). Enfermedad de Crohn. *Medicina Clínica*, 151(1), 26–33. doi:10.1016/j.medcli.2017.10.036
- Basso, A.M.M. Caracterização do potencial imunomodulador de polissacarídeos de basidiomicetos e aplicação em modelo de infecção fúngica experimental. Doutora (Doutorado em Patologia Molecular). 152 f. Universidade de Brasília – UnB. 2017
- Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med*. 2016;22(6):458–478. doi:10.1016/j.molmed.2016.04.003
- Bedarf JR, Hildebrand F, Coelho LP, Sunagawa S, Bahram M, Goeser F, et al. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson’s disease patients. *Genome Med*. 2017;9:39.
- Bedarf, J.R., Hildebrand, F., Coelho, L.P. et al. Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson’s disease patients. *Genome Med* 9, 39 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0428-y>
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson’s disease. *Bioessays* 24:308–318
- Borrello, S., Nicolò, C., Delogu, G., Pandolfi, F., & Ria, F. (2011). TLR2: A Crossroads between Infections and Autoimmunity? *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 549–556
- Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a024091. Published 2018 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a024091
- Cash, H. L. (2006). Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science*, 313(5790), 1126–1130. doi:10.1126/science.1127119

- Chakravarthy, S., Balasubramani, P. P., Mandali, A., Jahanshahi, M., & Moustafa, A. A. (2018). The many facets of dopamine: Toward an integrative theory of the role of dopamine in managing the body's energy resources. *Physiology & Behavior*, 195, 128–141. doi:10.1016/j.physbeh.2018.06.032
- Charlett A, Dobbs RJ, Dobbs SM, Weller C, Brady P, Peterson DW. Parkinsonism: siblings share *Helicobacter pylori* seropositivity and facets of syndrome. *Acta Neurol Scand*. 1999;99:26-35.
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem* 58:786– 789
- Collins, F. L., Rios-Arce, N. D., Schepper, J. D., Parameswaran, N., & McCabe, L. R. (2017). The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Microbiology Spectrum*, 5(4). doi:10.1128/microbiolspec.bad-0015-2016
- Crow, J. R., Davis, S. L., Chaykosky, D. M., Smith, T. T., & Smith, J. M. (2015). Probiotics and Fecal Microbiota Transplant for Primary and Secondary Prevention of *Clostridium difficile* Infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(11), 1016–1025. doi:10.1002/phar.1644
- Dalia Akramienė, Anatolijus Kondrotas, Janina Didžiapetrienė, Egidijus Kėvelaitis. Effects of b-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43(8)
- Wagener M, Hoving JC, Ndlovu H, Marakalala MJ. Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity. *Front Immunol*. 2018;9:225. Published 2018 Feb 13. doi:10.3389/fimmu.2018.00225
- de Clercq NC, Groen AK, Romijn JA, Nieuwdorp M. Gut Microbiota in Obesity and Undernutrition. *Adv Nutr*. 2016;7(6):1080–1089. Published 2016 Nov 15. doi:10.3945/an.116.012914
- Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1357–1391. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x

- Fasano, A., Bove, F., Gabrielli, M., Petracca, M., Zocco, M. A., Ragazzoni, E., ... Bentivoglio, A. R. (2013). The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 28(9), 1241–1249. doi:10.1002/mds.25522
- Ferri FF. Parkinson's disease. In: *Ferri's Clinical Advisor 2018*. Philadelphia, Pa.: Elsevier; 2018. <https://www.clinicalkey.com>. Accessed May 29, 2018.
- Ford, A. C., Moayyedi, P., & Hanauer, S. B. (2013). Ulcerative colitis. *BMJ*, 346(feb05 2), f432–f432. doi:10.1136/bmj.f432
- Freeman, H. J. (2014). Natural history and long-term clinical course of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 31. doi:10.3748/wjg.v20.i1.31
- Fuss, M Neurath, M Boirivant, J S Klein, C de la Motte, S A Strong, C Fiocchi, W Strober. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *The Journal of Immunology* August 1, 1996, 157 (3) 1261-1270;
- Gallo, R.L., and Hooper, L.V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516.
- Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348(6230):80–86. doi:10.1126/science.aaa4972
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S116–S119. doi:10.1097/mcg.0000000000000697
- Geuking MB, Köller Y, Rupp S, McCoy KD. The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes*. 2014;5(3):411–418. doi:10.4161/gmic.29330
- Hasegawa, S., Goto, S., Tsuji, H., Okuno, T., Asahara, T., Nomoto, K., ... Hirayama, M. (2015). Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. *PLOS ONE*, 10(11), e0142164. doi:10.1371/journal.pone.0142164
- Hill-Burns, E. M., Debelius, J. W., Morton, J. T., Wissemann, W. T., Lewis, M. R., Wallen, Z. D., ... Payami, H. (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement Disorders*, 32(5), 739–749. doi:10.1002/mds.26942

- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., ... Bushman, F. D. (2013). Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents. *PLoS ONE*, 8(6), e66019. doi:10.1371/journal.pone.0066019
- Hopfner F, Künstner A, Müller SH, Künzel S, Zeuner KE, Margraf NG, et al. Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. *Brain Res*. 2017;1667:41–5.
- Ianiro, G., Tilg, H., & Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*, 65(11), 1906–1915. doi:10.1136/gutjnl-2016-312297
- Iliev ID. Dectin-1 Exerts Dual Control in the Gut. *Cell Host Microbe*. 2015;18(2):139–141. doi:10.1016/j.chom.2015.07.010
- Iliev ID. Dectin-1 Exerts Dual Control in the Gut. *Cell Host Microbe*. 2015;18(2):139–141. doi:10.1016/j.chom.2015.07.010
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(4), 368–376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4- phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2173–2177
- Javitch JA, Snyder SH (1984) Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* 106:455–456
- Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., & Agid, Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, 102(2), 201–215. doi:10.1016/0006-8993(76)90877-5
- Jayachandran M, Xiao J, Xu B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1934. Published 2017 Sep 8. doi:10.3390/ijms18091934
- Kathleen A. Head, ND, Julie S. Jurenka, MT. Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alternative Medicine Review*. 2003 Aug;8(3):247-83; PMID: 12946238
- Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30:1351–60.

Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev.* 2017;279(1):90–105. doi:10.1111/imr.12563

Klaidman LK, Adams JD Jr, Leung AC, Kim SS, Cadenas E (1993) Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic Biol Med* 15:169–179

Langston JW. The MPTP Story. *J Parkinsons Dis.* 2017;7(s1):S11–S19. doi:10.3233/JPD-179006

Lehotzky, R. E., Partch, C. L., Mukherjee, S., Cash, H. L., Goldman, W. E., Gardner, K. H., & Hooper, L. V. (2010). Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7722–7727. doi:10.1073/pnas.0909449107

Li, D.Y., Tang, W.H.W. Gut Microbiota and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 19, 39 (2017).

Liu C, Dunkin D, Lai J, et al. Anti-inflammatory Effects of Ganoderma lucidum Triterpenoid in Human Crohn's Disease Associated with Downregulation of NF- κ B Signaling. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(8):1918–1925. doi:10.1097/MIB.0000000000000439

Liu C, Dunkin D, Lai J, et al. Anti-inflammatory Effects of Ganoderma lucidum Triterpenoid in Human Crohn's Disease Associated with Downregulation of NF- κ B Signaling. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(8):1918–1925. doi:10.1097/MIB.0000000000000439

Luo, J., Zhang, C., Liu, R., Gao, L., Ou, S., Liu, L., & Peng, X. (2018). Ganoderma lucidum polysaccharide alleviating colorectal cancer by alteration of special gut bacteria and regulation of gene expression of colonic epithelial cells. *Journal of Functional Foods*, 47, 127–135. doi:10.1016/j.jff.2018.05.041

Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016;65(2):330–339. doi:10.1136/gutjnl-2015-309990

Martin, C. R., & Mayer, E. A. (2017). Gut-Brain Axis and Behavior. *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series*, 45–53. doi:10.1159/000461732

Mayer RA, Kindt MV, Heikkila RE (1986) Prevention of thenigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J Neurochem* 47:1073–1079

- Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(4):e00036-17. Published 2017 Nov 8. doi:10.1128/MMBR.00036-17
- Mizoguchi A, Yano A, Himuro H, Ezaki Y, Sadanaga T, Mizoguchi E. Clinical importance of IL-22 cascade in IBD. *J Gastroenterol.* 2018;53(4):465–474. doi:10.1007/s00535-017-1401-7
- Mizuno Y, Sone N, Saitoh T (1987) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 48:1787–1793
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Dopamine, CID=681, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine> (accessed on Jan. 24, 2020)
- Neil A. R. Gow, Jean-Paul Latge, Carol A. Munro. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *microbiolspec* May 2017 vol. 5 no. 3 doi:10.1128
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36:2503–2508
- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE (1987) MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 40:721–729
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2017). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(1), 1–10. doi:10.1007/s12328-017-0813-5
- Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Ulcerative colitis. *The Lancet*, 380(9853), 1606–1619. doi:10.1016/s0140-6736(12)60150-0
- OToole, P. W., & Jeffery, I. B. (2015). Gut microbiota and aging. *Science*, 350(6265), 1214–1215. doi:10.1126/science.aac8469
- Pagano G, Niccolini F, Politis M. Imaging in Parkinson's disease. *Clin Med (Lond).* 2016;16(4):371–375. doi:10.7861/clinmedicine.16-4-371
- Pavlou, M. A. S., & Outeiro, T. F. (2017). Epigenetics in Parkinson's Disease. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*, 363–390. doi:10.1007/978-3-319-53889-1_19

- Rai M., Tidke G., Wasser S.P. Therapeutic potential of mushrooms. *Nat. Prod. Radiance*. 2005;4:246–257.
- Ramsay RR, Singer TP (1986) Energy-dependent uptake of Nmethyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261:7585–7587
- Rathee, Sushila, Rathee, Dharmender, Rathee, Deepti, Kumar, Vikash, & Rathee, Permender. (2012). Mushrooms as therapeutic agents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 459-474. Epub October 21, 2011. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000195>
- Reid, D. M., Gow, N. A., & Brown, G. D. (2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion in Immunology*, 21(1), 30–37. doi:10.1016/j.coi.2009.01.003
- Ren, J., Yuan, L., Wang, W., Zhang, M., Wang, Q., Li, S., ... Hu, K. (2019). Tricetin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in Parkinson's disease model by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway and preventing mitochondria-dependent apoptosis pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 378, 114617. doi:10.1016/j.taap.2019.114617
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016;167(6):1469–1480.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.11.018
- Sandhu, K. V., Sherwin, E., Schellekens, H., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. *Translational Research*, 179, 223–244. doi:10.1016/j.trsl.2016.10.002
- Sands, B. E., & Kaplan, G. G. (2007). The Role of TNF α in Ulcerative Colitis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(8), 930–941. doi:10.1177/0091270007301623
- Savchenko, A. S., Inoue, A., Ohashi, R., Jiang, S., Hasegawa, G., Tanaka, T., ... Naito, M. (2011). Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils in vitro and in ulcerative colitis. *Pathology International*, 61(5), 290–297. doi:10.1111/j.1440-1827.2011.02651.x
- Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord*. 2015;30:350–8.
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 215–224. doi:10.1007/s00441-004-0938-y

- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009
- Shen, T.-C. D. (2017). Diet and Gut Microbiota in Health and Disease. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series, 117–126. doi:10.1159/000455220
- Shen, X., Yang, H., Wu, Y., Zhang, D., & Jiang, H. (2017). Meta-analysis: Association of *Helicobacter pylori* infection with Parkinson's diseases. *Helicobacter*, 22(5), e12398. doi:10.1111/hel.12398
- Sliva D, Loganathan J, Jiang J, et al. Mushroom *Ganoderma lucidum* prevents colitis-associated carcinogenesis in mice. *PLoS One*. 2012;7(10):e47873. doi:10.1371/journal.pone.0047873
- Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashardes, S., ... Elinav, E. (2018). Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell*, 174(6), 1406–1423.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.08.047
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2008;118(2):534–544. doi:10.1172/JCI33194
- Sun, M.-F., Zhu, Y.-L., Zhou, Z.-L., Jia, X.-B., Xu, Y.-D., Yang, Q., ... Shen, Y.-Q. (2018). Neuroprotective effects of fecal microbiota transplantation on MPTP-induced Parkinson's disease mice: Gut microbiota, glial reaction and TLR4/TNF- α signaling pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 48–60. doi:10.1016/j.bbi.2018.02.005
- Tang, C., Kamiya, T., Liu, Y., Kadoki, M., Kakuta, S., Oshima, K., ... Iwakura, Y. (2015). Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing *Lactobacillus*-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host & Microbe*, 18(2), 183–197. doi:10.1016/j.chom.2015.07.003
- Tarsy D. Pharmacologic treatment of Parkinson disease. <https://www.uptodate.com/contents/search>. Accessed May 29, 2018.
- Tatiya-aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., & Jarukamjorn, K. (2018). Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 0(0). doi:10.1515/jbcpp-2018-0036
- Thiele SL, Warre R, Nash JE. Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. *J Vis Exp*. 2012;(60):3234. Published 2012 Feb 14. doi:10.3791/3234

- Tomkovich S, Jobin C. Microbiota and host immune responses: a love-hate relationship. *Immunology*. 2016;147(1):1–10. doi:10.1111/imm.12538
- Torres-Fuentes, C., Schellekens, H., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The microbiota–gut–brain axis in obesity. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2(10), 747–756. doi:10.1016/s2468-1253(17)30147-4
- Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017;389(10080):1756–1770. doi:10.1016/S0140-6736(16)32126-2
- Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight RJ. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *Allergy Clin Immunol*. 2012 May; 129(5):1204-8
- Uyar GÖ, Yildiran H. A nutritional approach to microbiota in Parkinson's disease. *Biosci Microbiota Food Health*. 2019;38(4):115–127. doi:10.12938/bmfh.19-002
- Vindigni, S. M., & Surawicz, C. M. (2017). Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 171–185. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.012
- Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, et al. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal Mushroom. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 9.
- Wagener, M., Hoving, J. C., Ndlovu, H., & Marakalala, M. J. (2018). Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00225
- Wischmeyer, P. E., McDonald, D., & Knight, R. (2016). Role of the microbiome, probiotics, and “dysbiosis therapy” in critical illness. *Current Opinion in Critical Care*, 22(4), 347–353. doi:10.1097/mcc.0000000000000321
- Xie J, Liu Y, Chen B, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide improves rat DSS-induced colitis by altering cecal microbiota and gene expression of colonic epithelial cells. *Food Nutr Res*. 2019;63:10.29219/fnr.v63.1559. Published 2019 Feb 12. doi:10.29219/fnr.v63.1559
- Xue, R., Zhang, H., Pan, J., Du, Z., Zhou, W., Zhang, Z., ... Bai, L. (2018). Peripheral Dopamine Controlled by Gut Microbes Inhibits Invariant Natural Killer T Cell-Mediated Hepatitis. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02398

Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, et al. A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med*. 2005;201(6):949–960. doi:10.1084/jem.20041758

Zhang, S.-L., Wang, S.-N., & Miao, C.-Y. (2017). Influence of Microbiota on Intestinal Immune System in Ulcerative Colitis and Its Intervention. *Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01674