

***Pichia pastoris* previne o comportamento tipo-depressivo induzido por lipopolissacarídeo em camundongos: Possível modulação da via oxidativa**

PALOMA TABORDA BIRMANN¹; ANGELA MARIA CASARIL²; PAMELA SCARAFFUNI CABALLERO²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO²; LUCIELLI SAVEGNAGO³

¹ Universidade Federal de Pelotas - paloma_birmann@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - angela.casaril@gmail.com; pamelascaraffuni@gmail.com; fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

³ Lucielli Savegnago - luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A *Pichia pastoris* é um fungo ascomiceto metilotrófico amplamente utilizado como sistema de expressão de proteínas heterólogas para pesquisa básica e para a produção de biofármacos. Esta levedura possui muitas propriedades que a torna um sistema de expressão ideal e adequado para a produção em pequena e larga escala por exemplo, a alta taxa de crescimento e alta densidade celular, os promotores indutíveis fortemente controlados por metanol (AOX1 e AOX2) e o eficiente mecanismo de secreção heteróloga (Schutter et al., 2009). Com base nestas propriedades apresentadas da *P. Pastoris* as informações sobre sua utilização para outros fins são escassas, isto impulsionou o Laboratório de Imunologia Aplicada, parceiro ao nosso grupo de pesquisa, a investigar outras possíveis aplicação para esta levedura. Desta maneira, França et al., (2015) caracterizaram as propriedades probióticas da *P. pastoris* enfatizando a ação antibacteriana contra *Salmonella Typhimurium*, demonstrando que essa levedura possui potencial para ser utilizada como um probiótico.

Somando-se a isso, nos últimos anos vêm aumentando o interesse do uso de microrganismos que possuem efeitos com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir e/ou tratar muitas doenças, esses microrganismos recebem o nome de probióticos (FAO/WHO, 2002). Além disso, na última década muitos estudos demonstraram uma influência substancial da microbiota intestinal sobre o sistema nervoso e o comportamento do hospedeiro, o chamado “eixo microbiota-intestino-cérebro”, trazendo o uso de probiótico como uma estratégia preventiva e/ou de tratamento de diversos transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão (Cryan e Dinan 2012).

A depressão é um transtorno complexo, heterogêneo e predominantemente recorrente que leva a níveis significativos de incapacidade em todo o mundo (WHO, 2017). Além disso, o tratamento para estes transtornos são um grande problema e a necessidade de progredir nas pesquisas, com base em mecanismos biológicos, na busca de tratamento mais eficazes é crucial. Desta maneira, a investigação da microbiota intestinal e sua influência sobre os transtornos neuropsiquiátricos oferece uma oportunidade para avançar nesse processo e pode levar ao tratamento e/ou a estratégias preventivas (Zheng, 2016).

Assim, frente aos resultados da *P. pastoris* com propriedades promissoras de um probiótico e somada à relação da alteração microbiana intestinal com a fisiopatologia da depressão, o objetivo deste projeto consiste em elucidar a atividade tipo-antidepressiva da *P. pastoris* em um modelo animais que mimetizam o comportamento depressivo em roedores bem como o possível envolvimento da via oxidativa.

2. METODOLOGIA

Preparo da levedura

Aproximadamente $8 \log \text{CFU.g}^{-1}$ de *P. pastoris* foram diluídos em 500 μL de tampão fosfato-salino (PBS) e a cada 7 dias as leveduras foram quantificadas (CFU.g^{-1}) para avaliação da viabilidade e estabilidade.

Animais e delineamento experimental

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados camundongos Swiss machos (25 - 35g). Os animais foram mantidos em cinco animais por cada caixa, em um ciclo claro/escuro de 12 h com luzes acesas às 7:00 da manhã, à temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e com acesso livre a água e comida (CEEa 12505-2019).

Para avaliar se a *P. pastoris* preveniu as alterações comportamentais induzidas pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS) os animais foram tratados com *P. pastoris* (10^8 unidades formadoras de colônia/animal, pela via intragástrica [i.g.]) ou PBS no volume de 10 mL/Kg (i.g.) durante 7 dias. No 8º dia os animais receberam LPS (0,83 mg/Kg ou salina, pela via intraperitoneal [i.p.]) e após 24h os animais foram avaliados no teste do campo aberto (TCA) (Walsh e Cummins, 1976), no teste do nado forçado (TNF) (Porsolt et al., 1977) e no teste de preferência por sacarose (TPS) (Liu et al., 2018). Outros animais foram expostos as mesmas condições acima, os quais foram destinados à eutanásia para remoção dos órgãos córtex pré-frontal e hipocampo para a realização das análises antioxidantes: formação das espécies reativas (ROS) (Loetchutinat et al., 2005), níveis de óxido nítrico (NOx) (Cryan et al., 2002) e ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa et al., 1979).

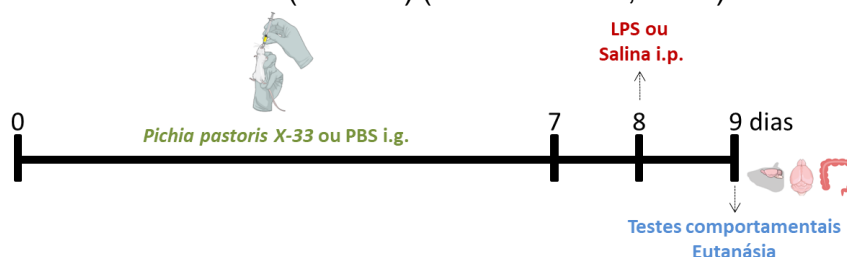


Figura 1. Delineamento experimental para avaliação do possível efeito tipo-antidepressivo da *P. pastoris* em camundongos desafiados por LPS.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e considerados significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância de duas vias seguidas pelos testes de *post hoc* Tukey através do software GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com a *P. pastoris* diminuiu o tempo de imobilidade no teste do TNF (Fig. 2A) nos camundongos induzidos por LPS, uma vez que este teste é um parâmetro comportamental bem aceito para avaliar a atividade do tipo-antidepressiva em roedores, no qual um decréscimo significativo no tempo de imobilidade é um indicador do efeito tipo-antidepressivo.

Outro resultado promissor demonstrado pelo tratamento com a *P. pastoris* foi sua capacidade de aumentar a preferência por sacarose (Fig. 2B) em camundongos induzidos por LPS. Este teste é um válido marcador comportamental de anedonia induzido por modelos de depressão, no qual o

aumento da ingestão de solução de sacarose em comparação a ingestão de água é indicador do efeito tipo-antidepressivo.

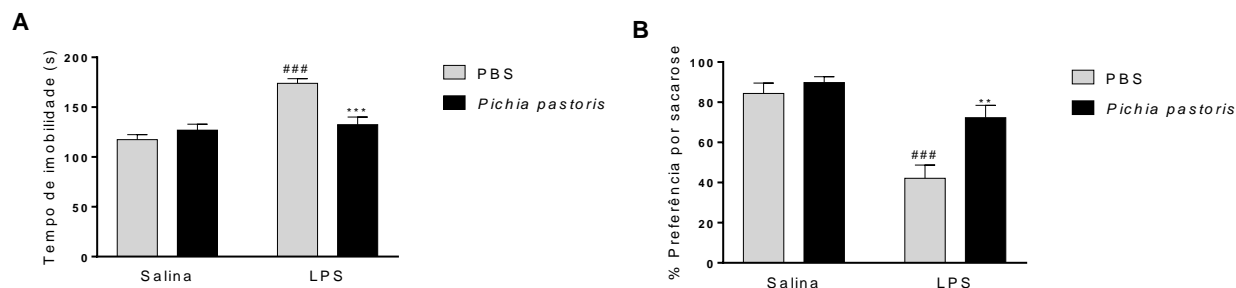


Figura 2. Efeito tipo-antidepressivo da *P. pastoris* no tempo de imobilidade no teste do nadado forçado (A) e na preferência por sacarose (B). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média (n=8-10). ^{###} $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. ^{**} $p < 0,01$ e ^{***} $p < 0,001$ quando comparado com o grupo LPS. LPS: Lipopolissacarídeo; PBS: Tampão fosfato-salino.

O efeito antidepressivo demonstrado pelo tratamento com a *P. pastoris* pode estar relacionado com a modulação da via oxidativa, uma vez a administração desta levedura preveniu a formação de espécies reativas (Fig. 3A e 3B), diminuiu os níveis de óxido nítrico (Fig. 3C e 3D) e preveniu a peroxidação lipídica (Fig. 3E e 3F) no córtex pré-frontal e no hipocampo dos camundongos induzidos por LPS.

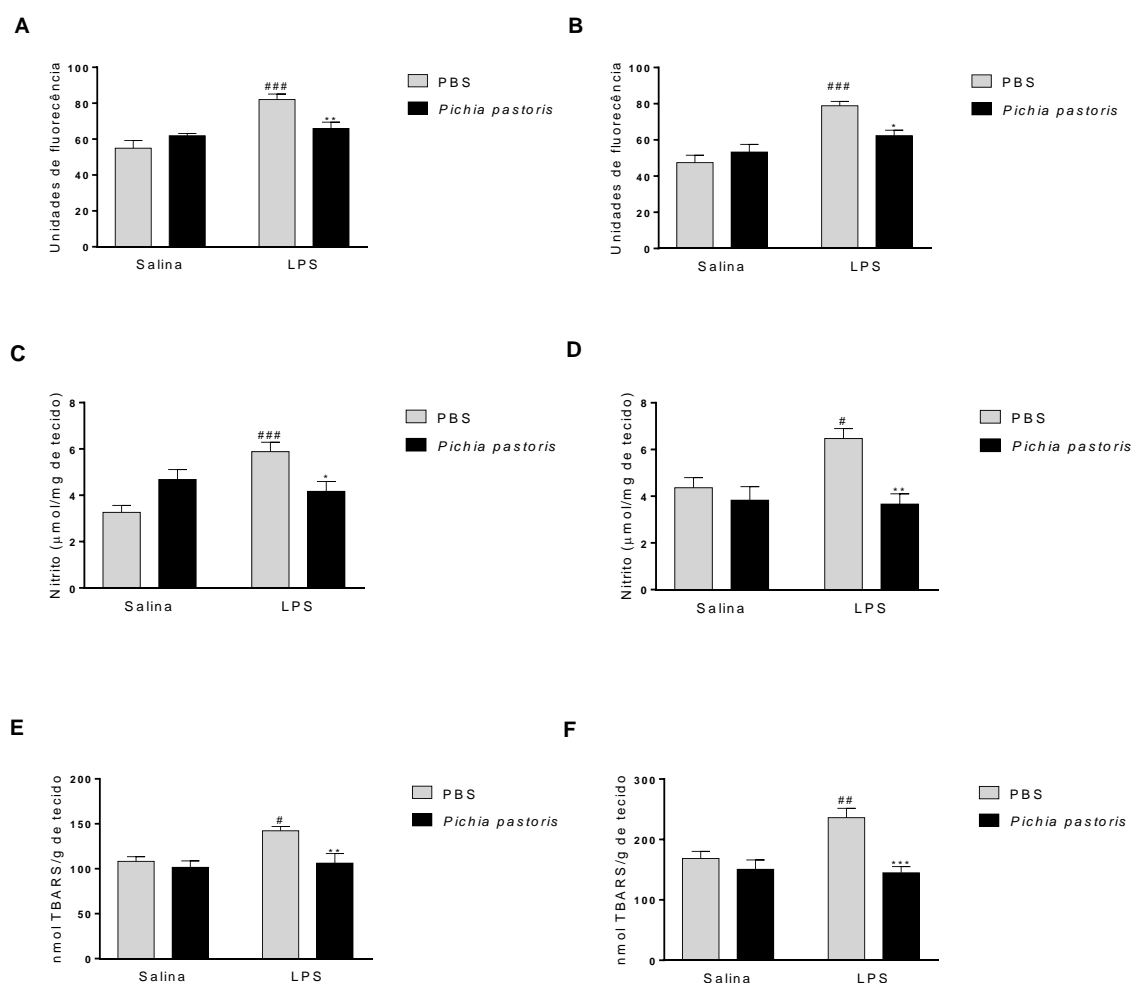


Figura 3. Efeito da *P. pastoris* nos parâmetros de estresse oxidativo em camundongos desafiados por LPS nos níveis de espécie reativa no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B), nos níveis de óxido nítrico no córtex pré-frontal (C) e hipocampo (D) e na peroxidação lipídica no córtex pré-frontal (E) e hipocampo (F). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (n=8). $^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$ e $^{\#\#\#}p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$ quando comparado com o grupo LPS. LPS: Lipopolissacarídeo; PBS: Tampão fosfato-salino.

A partir dos resultados obtidos no TCA foi possível concluir que nenhuns dos grupos tratados apresentaram alterações locomotoras e exploratórias nos animais (dados não mostrados), uma vez que o TCA foi realizado com o intuito de validar os demais testes comportamentais.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a levedura *P. pastoris* possui potencial para ser caracterizada como probiótico com efeito antidepressivo através da modulação da via oxidativa. Novos experimentos serão realizados para aprofundar os conhecimentos dos efeitos desta levedura, bem como a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRYAN J.F.; DINAN T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 701-712, 2012.
- FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. p. 11, 2002.
- FRANÇA R.C; CONCEIÇÃO F.R.; HAUBERT L. et al. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against Salmonella Typhimurium. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 19, p. 7953-7961, 2015.
- LIU M.Y; YIN C.Y; ZHU L.J et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Prot.**, v. 13, n.7, p. 1686-1698, 2018.
- LOETCHUTINAT C; SUCHART K.; SAMARN D. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 72, n. 2, p. 323-331, 2005.
- OHKAWA H; OHISHI N; YAGI K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals Biochem.** v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- PORSOLT R.D; LE PICHON M; JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 21, n. 266, p. 266-270, 1977.
- SCHUTTER K.; LIN C.; TIELS P. et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 27, n. 6, p.561-566, 2009.
- WALSH R.N AND CUMMINS R.A. The open-field test: a critical review. **Psychol. Bull**, v. 83, p. 482-504, 1976.
- WHO. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. **World Health Organization**, 2017.
- ZHENG B. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Mol Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 786-796, 2016.