

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA *K. PASTORIS* KM71H NA REVERSÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO ANTIBACTERIANO CLINDAMICINA EM CAMUNDONGOS

GIULIANA P. ZUGNO¹; PALOMA T. BIRMANN²; RAFAEL R. RODRIGUES³,
FABRICIO R. CONCEIÇÃO⁴, FERNANDA S. S. SOUSA⁵, LUCIELLI
SAVEGNAGO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – giulizugno@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – paloma_birmann@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – nandinha_sousa4@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A *Komagataella pastoris* KM71H é uma levedura metilotrófica que teve recentemente descritas suas propriedades probióticas e antidepressivas em modelos animais (BIRMANN et al., 2021). Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002) e por isso, o interesse em seu uso para a prevenção e tratamento de diversas doenças através da modulação da microbiota intestinal vem aumentando na última década (FRANÇA et al., 2015; CARLESSI et al., 2021).

O microbioma é responsável por uma série de processos biológicos, influenciando também na neurobiologia do hospedeiro através da comunicação bidirecional com o sistema nervoso central (SNC), mais conhecido como eixo microbiota-intestino-cérebro (CARLESSI et al., 2021). Assim, a microbiota exerce importante influência sobre vias metabólicas, estendendo-se além do ambiente gastrointestinal. Contudo, práticas modernas como o uso de antibacterianos impactam diretamente na biodiversidade dos microrganismos que colonizam o intestino. Na conjuntura atual da pandemia, a escassez de tratamentos eficazes tem levado ao aumento da prescrição de antibacterianos e uso indiscriminado desses medicamentos (USMAN et al., 2020), tanto para prevenir a coinfeção bacteriana em casos diagnosticados de COVID-19 quanto como medida profilática para prevenção da infecção pelo vírus.

O uso excessivo, prolongado ou incorreto de muitos antibacterianos podem acarretar em graves consequências à saúde como a profunda perda da diversidade microbiana (KIM et al., 2017) e aumento da permeabilidade da barreira intestinal, cuja integridade é importante para impedir que metabólitos indesejáveis, como toxinas bacterianas, ultrapassem o lúmen intestinal e alcancem a corrente sanguínea produzindo uma resposta inflamatória. Assim, a disbiose intestinal leva à ativação da resposta imune ao induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo atingir o SNC, ocasionando uma neuroinflamação (CARLESSI et al., 2021) e consequente desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão.

Nesse sentido, o Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia vem amplamente estudando a atividade da *Komagataella pastoris* KM71H em camundongos, como um probiótico com ação no SNC e possível agente terapêutico para o tratamento do transtorno depressivo maior (TDM). Embora exista uma alta prevalência mundial

da depressão, os tratamentos disponíveis para esse transtorno ainda são limitados (WHO, 2017).

Dessa forma, o presente trabalho objetiva avaliar o efeito da *K. pastoris* KM71H na reversão do fenótipo tipo-depressivo, induzido pelo antibacteriano clindamicina, em camundongos através da análise dos resultados obtidos no teste comportamental *splash test* e no ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados camundongos Swiss machos adquiridos no biotério central da Universidade Federal de Pelotas (CEEA: 11133-20). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: (1) salina + PBS, (2) salina + *K. pastoris* KM71H, (3) clindamicina + PBS e (4) clindamicina + *K. pastoris* KM71H. No dia 1 foi administrada a clindamicina (200 µL, pela via intraperitoneal [i.p.] ou salina e após 24h foi realizado o tratamento com *K. pastoris* KM71H (a 8 log UFC.g⁻¹ / animal, através da via intragástrica [i.g.]) ou PBS durante 14 dias consecutivos (Fig. 1).

No dia 16 o comportamento tipo-anedônico dos camundongos foi avaliado através do *splash test*. Para isso, os animais foram colocados individualmente em um aparato de 9 cm x 7 cm x 11 cm e sobre seu dorso foi aplicada uma solução de sacarose a 10%. O tempo total de autolimpeza foi cronometrado durante 5 minutos (FREITAS et al., 2013). Desta forma, o comportamento motivacional foi mensurado através do tempo de autocuidado.

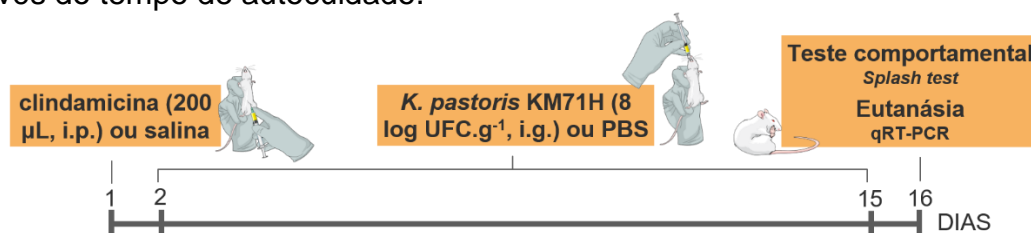


Figura 1. Delineamento experimental para a avaliação do efeito do tipo-antidepressivo da *K. pastoris* KM71H em camundongos tratados com clindamicina. i.p.: intraperitoneal, i.g.: intragástrica, qRT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Posteriormente, os camundongos foram submetidos à eutanásia por overdose de inalação de isoflurano, seguida de deslocamento cervical. Foi coletado o tecido do intestino delgado para extração de mRNA total usando TRIzol seguido do tratamento com DNase com *kit DNA-free*® e quantificação de mRNA por qRT-PCR. O cDNA foi sintetizado usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* conforme indicado pelo fabricante. A amplificação foi feita com UltraSYBR Mix usando a Stratagene Mx3005P. A normalização das expressões gênicas foi realizada como β -actina nas condições: 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s e 72 °C por 30 s. O método *Delta-Delta Comparative Threshold* foi usado para normalizar a alteração dobrada na expressão do gene. Os *primers* utilizados estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos primers usados no qRT-PCR.

Primer	Sequência do primer
Ocludina	F_w 5' GGA CCC TGA CCA CTA TGA AAC AGA CTA C 3'

	R_v	5' ATA GGT GGA TAT TCC CTG ACC CAG TC 3'
Zônula ocludente-1 (Zo-1)	F_w	5' GCA CCA TGC CTA AAG CTG TC-3'
	R_v	5' ACT CAA CAC ACC ACC ATT GC 3'
Zônula ocludente-2 (Zo-2)	F_w	5' GGA GAC CAG ATT CTG AAG GTG AAC ACA C 3'
	R_v	5' ACC TTT GGG GAT TTC TAG CAG GTA GAG GAC 3'

F_w : forward; R_v : reverse.

Os dados obtidos foram avaliados por meio do software GraphPad Prism 8.0 através da análise de variância bidirecional seguida pelo teste de *post hoc* Tukey. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão da média, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no teste comportamental demonstram que o tratamento com *K. pastoris* KM71H por 14 dias consecutivos foi capaz de reverter a diminuição do tempo de autolimpeza induzida pela administração de clindamicina (Fig. 2A), o que caracteriza seu efeito tipo-antidepressivo.

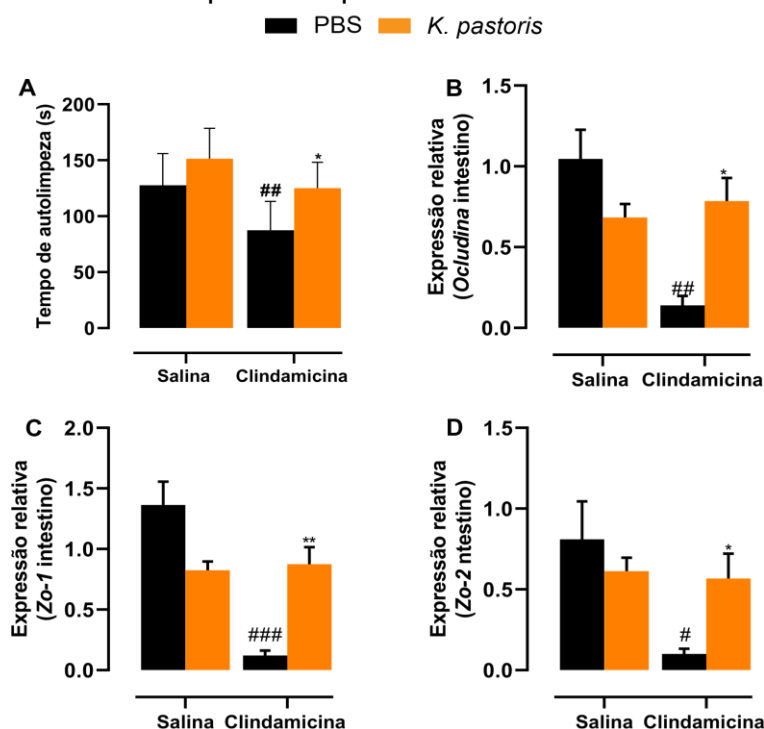


Figura 2. Efeito do tratamento com *K. pastoris* KM71H no (A) tempo de autolimpeza dos animais; na (B) expressão de mRNA de ocludina no intestino delgado, (C) expressão de mRNA de zônula ocludente-1 no intestino delgado e (D) expressão de mRNA de zônula ocludente-2 no intestino delgado. Os dados estão expressos como a média \pm desvio padrão da média. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo PBS. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo clindamicina. As análises foram realizadas por ANOVA bidirecional seguida pelo *post hoc* de Tukey. PBS: tampão fosfato-salino.

Como mencionado, a função primária do epitélio intestinal é formar uma barreira que evite a passagem de patógenos e antígenos luminiais para a mucosa (FENG et al., 2019). Dessa forma, as células que compõem esse epitélio são fortemente unidas por associações de proteínas integrais que incluem as zônulas

ocludentes (Zo-1 e Zo-2), ocludinas e claudinas, as quais contribuem para a formação das junções oclusivas. A microbiota intestinal saudável também favorece o fortalecimento dessa barreira, promovendo a absorção de nutrientes, desenvolvimento do sistema imunológico e restringindo a colonização por patógenos (KIM et al., 2017).

Assim, um desequilíbrio causado nesse microbioma, como pelo uso de antibacterianos, pode proporcionar o aumento da permeabilidade intestinal pelo rompimento das junções oclusivas e regulação positiva das vias inflamatórias e oxidativas que contribuem para o aumento do dano tecidual (FENG et al., 2019). Através dos ensaios de qRT-PCR, nosso estudo mostrou que a clindamicina aumentou a permeabilidade da barreira intestinal dos animais, caracterizada pela diminuição da expressão de mRNA das ocludinas, Zo-1 e Zo-2, como mostrados nas figuras 2B, 2C e 2D, respectivamente. Em contrapartida, o tratamento como a *K. pastoris* KM71H restaurou a expressão destas proteínas.

Em síntese, os transtornos neuropsiquiátricos, como o TDM, podem estar intimamente associados à composição alterada da microbiota e aumento da permeabilidade gastrointestinal. Nesse sentido, o uso de probióticos pode ser uma abordagem interessante para a recuperação do microbioma (FRANÇA et al., 2015), ao atuarem por meio da modulação do sistema imunológico, produção de substâncias antimicrobianas, exclusão competitiva de microrganismos patogênicos e fortalecimento da barreira intestinal (CARLESSI et al., 2021).

4. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados apresentados, nosso estudo evidencia os efeitos tipo-antidepressivos da *K. pastoris* KM71H, apoiando seu uso para o desenvolvimento de um novo probiótico como estratégia para o tratamento do TDM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRMANN, P. T. et al. *Komagataella pastoris* KM71H modulates neuroimmune and oxidative stress parameters in animal models of depression: A proposal for a new probiotic with antidepressant-like effect. **Pharmacological Research**, in press, 2021.
- CARLESSI, A. S. et al. Gut microbiota-brain axis in depression: The role of neuroinflammation. **The European journal of neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 222–235, 2021.
- FENG, Y. et al. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. **PLOS ONE**, p. 14, n. 6, 2019.
- FRANÇA, R.C. et al. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 99, p. 7953-7961, 2015.
- FREITAS, A. E. et al. Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 176–184, 2013.
- FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization / World Health Organization, Londres, 2002. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso em 20 jul. 2021.
- KIM, S.; COVINGTON, A.; PAMER, E. G. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. **Immunological Reviews**, v. 279, n. 1, p. 90–105, 2017.
- USMAN, M.; FAROOQ, M.; HANNA, K. Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. **Science of The Total Environment**, v. 745, n. 141053, 2020.
- WHO. **Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates**. World Health Organization, Geneva, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/W?sequence=1>. Acesso em 20 jul. 2021.