

## **KOMAGATAELLA PASTORIS KM71H REVERTE A DEPRESSÃO PÓS-PARTO E O COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO DA PROLE NA FASE ADULTA APÓS A SEPARAÇÃO MATERNA**

AIRTON SINOTT<sup>1</sup>; PALOMA BIRMANN<sup>2</sup>; GIULIANA ZUGNO<sup>3</sup>; RAFAEL R RODRIGUES<sup>4</sup>; FABRICIO R. CONCEIÇÃO<sup>5</sup>; LUCIELLI SAVEGNAGO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – antsinott@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – paloma\_birmann@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – giulizugno@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

### **1. INTRODUÇÃO**

A depressão maior afeta duas vezes mais mulheres que homens (ALBERT, 2015), entretanto, na pesquisa neurocientífica a grande maioria dos estudos utilizam somente roedores machos para análises e validações de medicamentos e novos fármacos (BIAN *et al.*, 2021). Portanto, neste estudo, nos propomos o uso da levedura *Komagataella pastoris* KM71H para o tratamento da depressão pós-parto (DPP) em camundongos fêmeas e na sua prole de fêmeas na fase adulta em um protocolo de separação materna (SM). A DPP afeta entre 15% e 20% das mulheres após o parto (MUGHAL, *et al.*, 2022), sendo um fator de risco em populações vulneráveis, e uma das principais consequências é a falta do cuidado materno. Os primeiros cuidados na infância é de extrema importância para o neurodesenvolvimento dos filhos, sendo que a falta desse cuidado materno se torna um estressor, predispondo ao desenvolvimento de depressão mais tarde na vida (CUI *et al.*, 2020).

Para buscar novas intervenções para o tratamento da depressão, o eixo microbiota intestino cérebro está ganhando atenção da ciência nos últimos anos. O uso de probióticos é capaz de modificar a composição de microrganismos no intestino, favorecendo uma microbiota saudável e diversa (GRAZUL *et al.*, 2016). Esta diversidade permite a liberação de diversos compostos neuroativos que modulam o cérebro, como a liberação de neurotransmissores (SARKAR *et al.*, 2016), e que diminuem o estresse oxidativo (LIN *et al.*, 2022), protegendo contra a degradação de biomoléculas, permitindo prevenir e tratar diversas neuropatologias que afetam o sistema nervoso central, incluindo a depressão.

A *K. pastoris* KM71H é uma levedura metilotrófica e recentemente teve suas propriedades probióticas e antidepressivas caracterizadas (BIRMANN *et al.*, 2021; FRANÇA *et al.*, 2015). Buscando ampliar os seus mecanismos de ação, o protocolo de SM se torna interessante. Neste protocolo é possível investigar DPP nas mães, e mimetizar o estresse na infância da prole para investigar o comportamento depressivo na fase adulta.

Com tudo descrito, o objetivo desse trabalho é avaliar o uso da *K. pastoris* KM71H em reverter a DPP das mães e o comportamento tipo depressivo dos camundongos fêmeas na fase adulta após a separação materna.

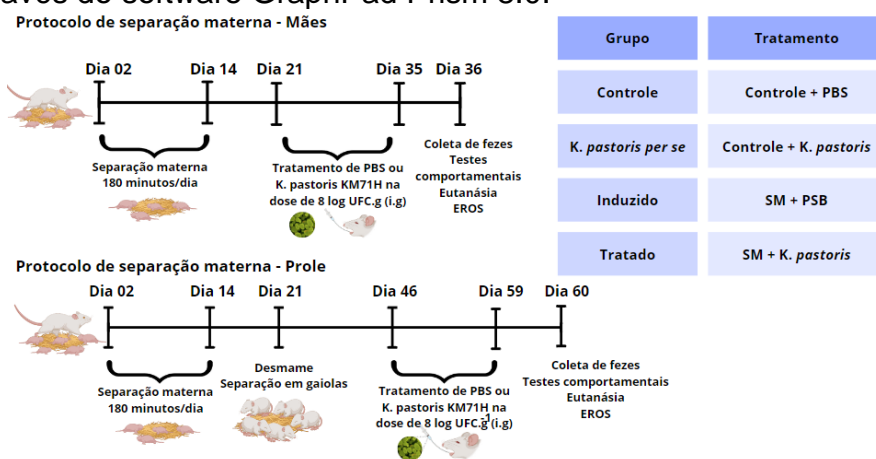
### **2. METODOLOGIA**

Para este trabalho a *K. pastoris* KM71H foi diluída em 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS) para concentração de 8 logs UFC.g<sup>-1</sup>. O projeto foi aprovado pelo

CEEA (20311-2020). Os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12h e mantidos a temperatura ambiente ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com livre acesso de água e comida.

O protocolo experimental de SM encontra-se na figura 1. No dia zero foi determinado com o nascimento dos animais, e a partir do 2º ao 14º dia as mães foram removidas das gaiolas por 3 horas e realocados após o final do tempo. No dia 21, foi realizado o desmame e a prole foi separada pelo sexo. A partir do dia 21 as mães receberam o tratamento de PSB ou *K. pastoris* KM71H na concentração de  $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$  pela via intragástrica (i.g) durante 14 dias, e no dia 36 foram realizados os testes comportamentais e a eutanásia para coleta do hipocampo. A prole, na fase adulta, recebeu a levedura ou PBS na mesma concentração do dia 46 ao 59. No dia 60 foi realizado a coleta das fezes, os testes comportamentais e a eutanásia para a coleta do hipocampo. Para avaliar o efeito do tipo antidepressivo foi realizado o teste de suspensão da cauda (TSC), neste teste é avaliado o tempo de imobilidade que é cronometrado durante 6 minutos, dos quais os dois primeiros foram considerados como período de ambientação e os quatro últimos como resultado do teste (STERU et al., 1985), e o *Splash test*, avaliando o autocuidado do camundongo em um período de 5 minutos após a aplicação de uma solução de 10% de sacarose no dorso dos animais (HAJ-MIRZAIAN et al., 2015). Por fim, foi avaliado o nível de espécies reativas ao oxigênio (EROS) no hipocampo dos camundongos de acordo com (LOETCHUTINAT et al., 2005) e medido o pH das fezes da prole (CHANG et al., 2012).

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 8.0.



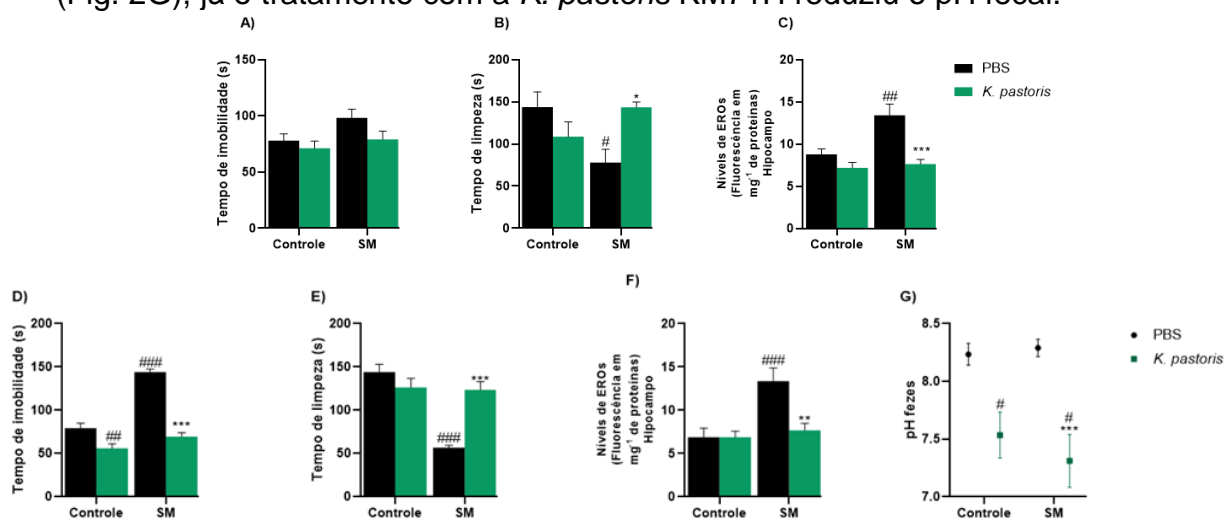
**Figura. 1** Delineamento experimental do projeto. EROS – espécies reativas ao oxigênio. SM = Separação materna

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a SM as mães e a prole apresentaram comportamento tipo depressivo quando comparado ao controle, evidenciado pelo aumento do tempo de imobilidade no TSC (Fig. 2A e 2E) e da redução do tempo de limpeza no *Splash test* (Fig. 2B e 2F) após a aplicação da solução de sacarose. O tratamento com a *K. pastoris* KM71H reverteu o comportamento tipo depressivo dos camundongos no *Splash test*, e somente reverteu o comportamento na prole das fêmeas no TSC.

Nas mães e na prole, os grupos estressados apresentaram um aumento no nível de EROS no hipocampo quando comparado ao grupo controle (Fig C e F), e

houve a reversão da formação de EROS após a administração da levedura. Nas proles, o pH das fezes não aumentou após o estresse em comparação ao controle (Fig. 2G), já o tratamento com a *K. pastoris* KM71H reduziu o pH fecal.



**Figura 2.** Efeito do tratamento com a *K. pastoris* KM71H no teste da suspensão da cauda (A e D), no Splash Test (B e E), nos níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROS) no hipocampo de camundongos (C e F) e no de pH nas fezes da prole (G). Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média (A, B, C n= 7; D, E, F, G n = 9). # p< 0,05 ## p < p 0,01 e ### p< 0,001 quando comparados com o grupo controle, e \* p<0,05 \*\* p<0,01 e \*\*\*p< 0,001 quando comparados com o grupo induzido. PBS: Tampão fosfato-salino. SM: separação materna.

A desregulação hormonal é um dos principais fatores que contribuem para a DPP em mulheres (MUGHAL, *et al.*, 2022), podendo entrar em um episódio depressivo por dias ou até mesmo meses. Isto afeta negativamente a mãe e seus filhos, uma vez que o cuidado materno é importante para o desenvolvimento das crianças em seus primeiros meses de vida (CUI; *et al.*, 2020). Estudos indicam que o estresse pode afetar e predispor a criança a depressão na fase adulta, uma vez que o estresse acontece em uma janela crítica de neurodesenvolvimento após o nascimento (BIAN, 2021). Tendo está temática tão importante, novos tratamentos precisam ser estudados para tratar a depressão, e a conexão entre a microbiota, o intestino e o cérebro permite a reversão de sintomas e biomarcadores através dos probióticos.

A levedura probiótica *K. pastoris* KM71H se tornou efetiva em reverter o comportamento tipo depressivo na prole e a DPP nas mães, se mostrando uma alternativa para o tratamento da depressão. Em possíveis mecanismos de ação antidepressivo, é possível observar a acidificação das fezes da prole. Esta diminuição de pH pode ser uma medida indireta de ácidos graxos de cadeia curta, como o propionato e o butirato, que são compostos neuroativos que modulam o SNC e promovem a regulação do humor e a homeostase (CASPERANI *et al.*, 2019), podendo reverter o comportamento tipo depressivo e a DPP.

Pacientes deprimidos apresentam aumento de EROS no cérebro (LIN; *et al.*, 2022), o que degrada proteínas, lipídeos e DNA. Essa degradação é responsável por prejudicar a homeostase e desregular rotas metabólicas importantes que garantem o bem-estar e saúde mental. Nesta pesquisa, a *K. pastoris* se mostrou capaz em reverter o estresse oxidativo com a redução das espécies reativas no hipocampo, importante estrutura cerebral responsável pela regulação do humor (WU *et al.*, 2019). Mais importante, regulou e mostrou a eficácia na reversão da DPP e no

comportamento tipo depressivo em fêmeas, um sexo negligenciado na pesquisa neurocientífica.

#### 4. CONCLUSÕES

A *K. pastoris* KM71H se demonstrou como um probiótico promissor capaz de reverter o comportamento do tipo depressivo após a separação materna na depressão pós-parto e episódios traumáticos na infância.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, P. R. Why is depression more prevalent in women? **J Psychiatry Neurosci**, 40, n. 4, p. 219-221, Jul 2015.
- BIAN, Y.; *et al.* Prolonged Maternal Separation Induces the Depression-Like Behavior Susceptibility to Chronic Unpredictable Mild Stress Exposure in Mice. **Biomed Res Int**, 2021, p. 6681397, 2021.
- 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. **Pharmacol Res**, p. 105740, Sep 2021.
- CASPANI, G.; *et al.* Gut microbial metabolites in depression: understanding the biochemical mechanisms. **Microb Cell**, 6, n. 10, p. 454-481, Sep 27 2019.
- CHANG, J. H.; *et al.* Effect of Lactobacillus acidophilus KFRI342 on the development of chemically induced precancerous growths in the rat colon. **J Med Microbiol**, 61, n. Pt 3, p. 361-368, Mar 2012.
- CUI, Y.; *et al.* Early-Life Stress Induces Depression-Like Behavior and Synaptic-Plasticity Changes in a Maternal Separation Rat Model: Gender Difference and Metabolomics Study. **Frontiers in Pharmacology**, February 2020. Original Research.
- FRANÇA, R. C. *et al.* Pichia pastoris X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against Salmonella Typhimurium. **Appl Microbiol Biotechnol**, 99, n. 19, p. 7953-7961, Oct 2015.
- GRAZUL, H.; Impact of probiotic supplements on microbiome diversity following antibiotic treatment of mice. **Gut Microbes**, 7, n. 2, p. 101-114, 2016.
- HAJ-MIRZAIAN, A.; *et al.* Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice. **Eur J Pharmacol**, 750, p. 160-166, Mar 5 2015.
- LIN, W.-Y.; *et al.* Probiotics and their Metabolites Reduce Oxidative Stress in Middle-Aged Mice. **Current Microbiology**, 79, n. 4, p. 104, 2022/02/14 2022.
- LOETCHUTINAT, C.; *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. **Radiation Physics and Chemistry**, 72, n. 2, p. 323-331, 2005/02/01/ 2005.
- MUGHAL S.; *et al.* Postpartum Depression. [Updated 2022 Jul 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519070/>
- SARKAR, A.; *et al.* Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. **Trends Neurosci**, 39, n. 11, p. 763-781, Nov 2016.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 85, n. 3, p. 367-370, 1985.
- WU, X.; GUO, T.; TAN, T.; ZHANG, W. *et al.* Superior emotional regulating effects of creative cognitive reappraisal. **NeuroImage**, 200, p. 540-551, 2019/10/15/ 2019.