

***K. pastoris* KM71H atenua o déficit cognitivo e o comportamento do tipo-depressivo através da modulação da via TLR4/NF-κB em camundongos do tipo DA induzidos por βA_{1-40}**

GIULIANA P. ZUGNO¹; PALOMA T. BIRMANN²; AIRTON SINOTT³, RAFAEL R. RODRIGUES⁴, FERNANDA S. S. SOUSA⁵, LUCIELLI SAVEGNAGO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – giulizugno@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – paloma_birmann@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – antsinott@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – rafaelr458@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – nandinha_sousa4@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – lucielisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) acomete mundialmente pelo menos 55 milhões de pessoas, sendo que destas aproximadamente 40% sofrem de transtorno depressivo maior (TDM) (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2018). A natureza multifatorial da DA, marcada principalmente pela formação de placas senis de peptídeo β -amiloide (βA) e a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TDM, as tornam comorbidades das quais a disponibilidade de tratamentos ainda é escassa (CASSANO *et al.*, 2019).

Ambas as condições podem levar ao aumento do dano oxidativo a macromoléculas pela produção excessiva de espécies reativas e ativação subsequente de vias inflamatórias (KUJAWSKA *et al.*, 2021), dentre as quais se destaca a via de sinalização TLR4/NF- κ B, cuja desregulação está associada à disbiose do trato gastrointestinal (SONG *et al.*, 2021). Assim, a microbiota intestinal influencia na modulação da neuroinflamação através da comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e o intestino pelo eixo intestino-microbiota-cérebro, de modo que o uso de probióticos pode ser uma alternativa para o tratamento de distúrbios do SNC (XIANG *et al.*, 2022).

Nesse sentido, a *Komagatella pastoris* KM71H foi proposta como moduladora do eixo intestino-microbiota-cérebro e, portanto, apontada como potencial estratégia terapêutica para distúrbios neuropsiquiátricos (BIRMANN *et al.*, 2021). Em vista disso, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da levedura em amenizar o dano cognitivo e o comportamento do tipo-depressivo em modelos de camundongo induzidos por βA_{1-40} a uma condição semelhante a DA.

2. METODOLOGIA

Camundongos *Swiss* machos foram distribuídos em 4 grupos experimentais (n = 8) conforme ilustrado na Figura 1. Os animais receberam a levedura (8 log UFC/animal) ou PBS (veículo *K. Pastoris* KM71H) durante 14 dias pela via intragástrica (i.g.), sendo que no quarto dia também foi realizada a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de βA_{1-40} (4 μ L/400 pmol/animal) para indução do declínio cognitivo semelhante à DA, ou PBS (veículo βA_{1-40}). Dez dias após a indução, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais do labirinto em Y e de suspensão pela cauda (TSC). O projeto foi aprovado pelo CEEA (026745/2021-90) e os animais foram mantidos sob condição de ciclo claro/escuro de 12 h, 22 °C \pm 1 e com livre acesso à ração e água.

O labirinto em Y foi utilizado para avaliar a memória espacial e de trabalho dos animais, segundo descrito por Sarter *et al.* (1988). A sequência e número de entradas nos braços em Y foram registradas durante 6 min. e a porcentagem de alternância espontânea foi calculada. Posteriormente, o TSC foi realizado conforme Steru *et al.* (1985). O tempo de imobilidade foi considerado como um indicativo do comportamento tipo-depressivo e cronometrado durante 6 min., dos quais os dois primeiros foram considerados como período de ambientação e os quatro últimos como resultado do teste.

Posteriormente, os hipocampus e os intestinos delgados foram retirados após a eutanásia por overdose de inalação de isoflurano e as amostras coletadas foram mantidas à - 80 °C até o processamento para as análises da expressão gênica por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) do receptor tipo *toll* 4 (TLR4), fator nuclear kappa B (NF-κB) e interleucina-1β (Il-1β). A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os dados obtidos com os testes comportamentais e análises e moleculares foram expressos como média ± desvio padrão da média e obtidos através de ANOVA bidirecional seguida do *post hoc* de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

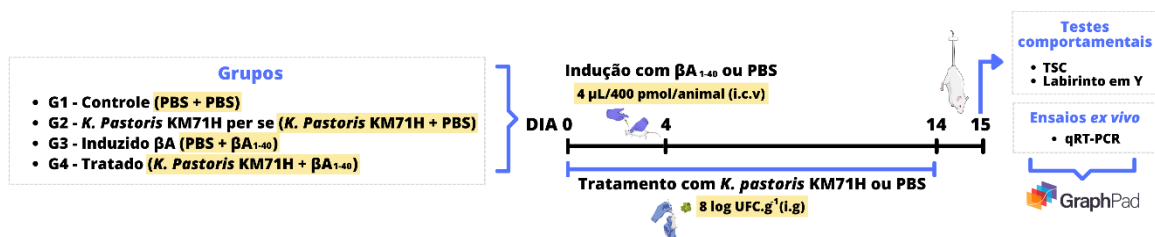


Figura 1. Desenho experimental. PBS: tampão fosfato salino, TSC: teste de suspensão pela cauda.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração de *K. pastoris* KM71H atenuou o déficit cognitivo e o comportamento do tipo-depressivo em camundongos induzidos à patologia semelhante à DA, por aumentar a porcentagem de alternância espontânea no teste do labirinto em Y (Figura 2B) e reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TSC (Figura 2A), respectivamente quando comparado ao grupo induzido.

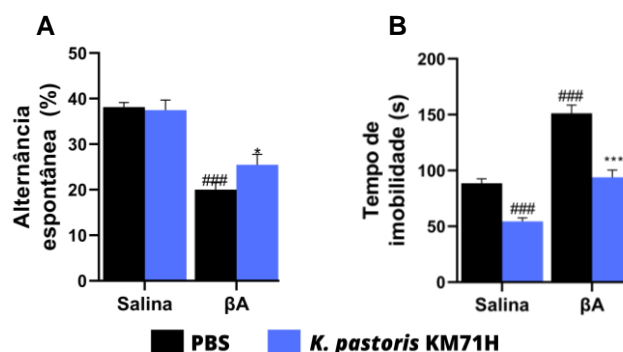


Figura 2. Efeito do tratamento com *K. pastoris* KM71H na (A) % alternância espontânea no teste do labirinto em Y no (B) tempo de imobilidade no TSC. Dados obtidos através de ANOVA bidirecional seguido do *post hoc* de Tukey e expressos

como média \pm desvio padrão da média. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo induzido. PBS: tampão fosfato-salino.

As mudanças comportamentais observadas podem ser um reflexo dos efeitos imunomoduladores proporcionados pela administração de *K. pastoris* KM71H. A neuroinflamação tem demonstrado um papel fundamental na patogênese da DA (LENG & EDISON, 2021) e do TDM (AFRIDI *et al.*, 2021). Alterações na composição da microbiota comensal podem contribuir para inflamação e neurodegeneração do SNC (KUJAWSKA *et al.*, 2021). Particularmente, os TLR4 atuam como moléculas chaves no reconhecimento de padrão imunes inatos associados à regulação de respostas inflamatórias e ao estresse modulado pela microbiota intestinal, ao induzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β (ZHANG *et al.*, 2020). Além disso, as placas β -amiloides também estimulam a sinalização da via TLR4/NF- κ B, por ser um ligante de TLRs, de modo na DA pode-se observar um fenótipo pró-inflamatório que contribui para o avanço da neurodegeneração (CALVO-RODRIGUEZ *et al.*, 2020).

Dessa forma, os efeitos do tratamento com *K. pastoris* KM71H foram avaliados quanto sua capacidade de modulação via de sinalização TLR4/NF- κ B, da qual se tem relatos de que sua ativação contribuir para a patogênese de doenças neurodegenerativas (CALVO-RODRIGUEZ *et al.*, 2020). Os resultados obtidos demonstraram que a administração de β A₁₋₄₀ aumentou a expressão de TLR4 (Figura 3A), NF- κ B (Figura 3B) e IL-1 β (Figura 3D) no intestino delgado quando comparado ao grupo controle, e o tratamento com *K. pastoris* KM71H restaurou essas alterações. Além disso, observou-se uma tendência de aumento da expressão de IL-1 β no hipocampo do grupo induzido em relação ao controle, enquanto a levedura demonstrou uma tendência em diminuir a expressão dessa citocina pró-inflamatória, quando comparado ao grupo induzido (Figura 3C).

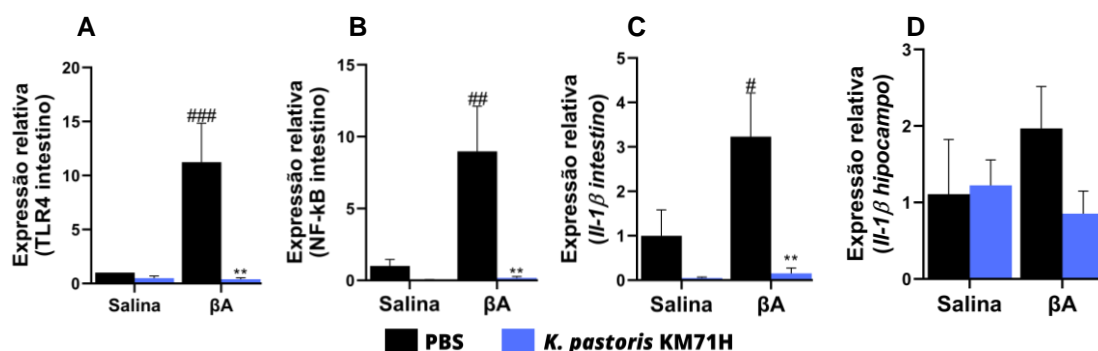


Figura 3. Efeito do tratamento com a *K. pastoris* KM71H na expressão do mRNA de (A) TLR4 e (B) NF κ B no intestino delgado e expressão de mRNA de IL-1 β em (C) hipocampo e (D) intestino delgado. Dados obtidos através de ANOVA bidirecional seguido do *post hoc* de Tukey e expressos como média \pm desvio padrão da média. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo induzido. PBS: Tampão fosfato-salino.

Portanto, os resultados sugerem que o tratamento com *K. pastoris* KM71H melhora o déficit cognitivo e o comportamento do tipo-depressivo ao modular a

sinalização da via TLR4/NF- κ B, provavelmente devido a melhora da integridade da barreira intestinal e impedimento da translocação de toxinas entéricas e microrganismos para a circulação sanguínea.

4. CONCLUSÕES

O envolvimento da disbiose intestinal na fisiopatologia da DA e do TDM sugere o uso da *K. pastoris* KM71H como alternativa terapêutica promissora para ambas comorbidades, uma vez que demonstrou ser capaz de melhorar o déficit cognitivo e o comportamento do tipo-depressivo em modelo de camundongo induzido a uma condição semelhante à DA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRIDI, R. et al. Neuroinflammatory Basis of Depression: Learning From Experimental Models. **Front Cell Neurosci**, 15, p. 691067, 2021.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. **Depression**. Disponível em: <<https://www.alz.org/help-support/caregiving/stages-behaviors/depression>>. Acesso em: 10 aug. 2022.
- BRADFORD, M. M. J. A. b. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- 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**, 171, p. 105740, 2021.
- CALVO-RODRIGUEZ, M. et al. Role of Toll Like Receptor 4 in Alzheimer's Disease. **Front Immunol**, 11, p. 1588, 2020.
- CASSANO, T. et al. Pharmacological Treatment of Depression in Alzheimer's Disease: A Challenging Task. **Front Pharmacol**, 10, p. 1067, 2019.
- KUJAWSKA, M.; DOMANSKYI, A.; KREINER, G. Editorial: Common Pathways Linking Neurodegenerative Diseases-The Role of Inflammation. **Front Cell Neurosci**, 15, p. 754051, 2021.
- LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nat Rev Neurol**, 17, n. 3, p. 157-172, 2021.
- SARTER, M. et al. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology** (Berl), 94, n. 4, p. 491-495, 1988.
- STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology** (Berl), 85, n. 3, p. 367-370, 1985.
- SONG, C. et al. Tea polyphenols ameliorates memory decline in aging model rats by inhibiting brain TLR4/NF-kappaB inflammatory signaling pathway caused by intestinal flora dysbiosis. **Exp Gerontol**, 153, p. 111476, 2021.
- XIANG, S. et al. Efficacy and Safety of Probiotics for the Treatment of Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Aging Neurosci**, 14, p. 730036, 2022.
- ZHANG, K. et al. Effect of Toll-like receptor 4 on depressive-like behaviors induced by chronic social defeat stress. **Brain Behav**, 10, n. 3, p. e01525, 2020.