

KOMAGATAELLA PASTORIS KM71H: UMA ESTRATÉGIA EFICAZ NA PREVENÇÃO DO DÉFICIT COGNITIVO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DO SONO

RAFAELA ALVARO XAVIER¹; RENATA L. DE OLIVEIRA²; LAUREN N. PUJOL³;
RAFAEL R RODRIGUES⁴ ; FABRICIO R. CONCEIÇÃO⁵ ; LUCIELLI SAVEGNAGO⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – rafaelax2433@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – renataleivas15@hotmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – laurennetto21@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br*

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

1. INTRODUÇÃO

O sono é fundamental para o bom funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC), desempenhando um papel crucial na regulação do humor, na consolidação de memórias e na remoção de metabólitos tóxicos. No entanto, a privação de sono (PS), caracterizada pela incapacidade de dormir o suficiente, tem se tornado cada vez mais comum na sociedade moderna devido a fatores como dieta inadequada e estimulação cerebral excessiva por dispositivos eletrônicos (WANG, 2022). Como consequência, a PS pode gerar estresse oxidativo, ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com liberação de cortisol e reduzir a disponibilidade de neurotransmissores importantes, como serotonina e dopamina, resultando em prejuízos cognitivos (TONONI; CIRELLI, 2014).

Diante da busca por novas alternativas terapêuticas para o SNC, o eixo microbiota-intestino-cérebro tem ganhado destaque, pois permite a modulação do SNC por meio da microbiota intestinal, composta por micro-organismos que habitam o trato gastrointestinal. Esses micro-organismos são capazes de liberar compostos neuroativos que modulam o estresse oxidativo, a atividade hormonal e a produção de neurotransmissores (WU, 2021).

A modulação da microbiota intestinal pode ser promovida pela administração de probióticos, visando mantê-la saudável e diversa. Nesse contexto, a levedura metilotrófica *Komagataella pastoris* KM71H demonstrou propriedades probióticas e tipo-antidepressivas, conforme caracterizado por BIRMAN et al. (2021) e FRANÇA et al. (2015). O objetivo deste estudo é explorar os mecanismos de ação da levedura na prevenção de distúrbios do SNC, como o declínio cognitivo, em camundongos submetidos a um protocolo de PS.

2. METODOLOGIA

Neste estudo, a levedura *K. pastoris* KM71H foi diluída em 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS) até atingir uma concentração de 8 log UFC.g⁻¹. O projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob o parecer 187/2022. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada (22 ± 1°C), e tiveram acesso irrestrito a água e alimento.

O protocolo experimental de PS encontra-se na Figura 1. Os camundongos Swiss machos, com 4 a 5 semanas de idade e pesando entre 25 e 35g, foram tratados com *K. pastoris* KM71H na dose de 8 log UFC.g⁻¹ ou com PBS por um

período de 14 dias. Entre os dias 7 e 10, foi realizada a PS utilizando o modelo de plataforma sobre água conforme MISRANI *et al.* (2019), no qual os camundongos tiveram acesso livre a água e comida, e as gaiolas foram limpas diariamente. No 15º dia foi realizado o teste do Labirinto em Y de acordo com SARTER *et al.*, (1988), no qual é utilizado para avaliar a memória espacial de roedores. Cada animal é colocado individualmente na posição central do aparato em formato de Y, e fica livre para explorar os 3 braços por 8 minutos, sendo que destes, os 2 primeiros minutos são para habituação e os outros 6 para o teste. Após a realização do teste comportamental os animais foram submetidos à eutanásia para remoção do hipocampo, intestino e sangue coletado em heparina. Por fim, esses tecidos foram submetidos às análises como a pesquisa de espécies reativas de oxigênio (EROS) e níveis de corticosterona no plasma sanguíneo.

Os resultados foram expressos como média ± 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.

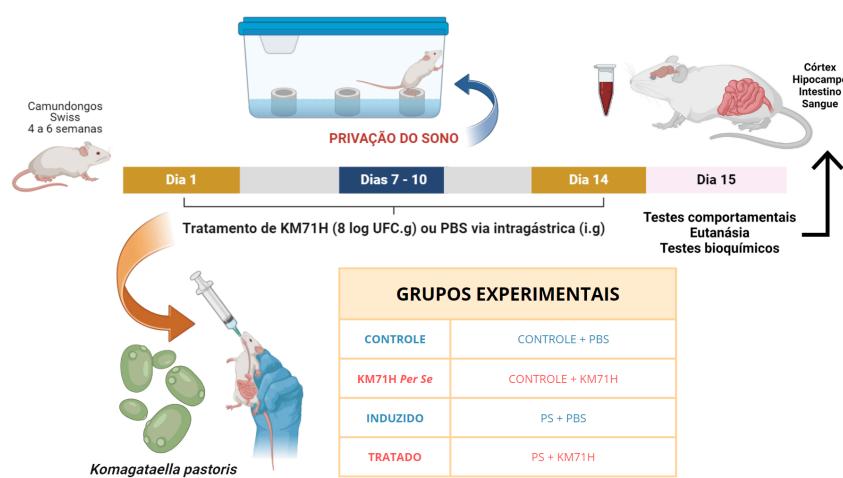


Figura 1. Delineamento do projeto e grupos experimentais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a PS, os animais apresentaram diminuição significativa na memória espacial e na memória de trabalho quando comparados ao grupo controle evidenciado pela diminuição da porcentagem de alternâncias no teste do Labirinto em Y (Fig. 2A), enquanto o tratamento com a *K. pastoris* KM71H aumentou a porcentagem das alternâncias espontâneas demonstrando sua capacidade em melhorar o comprometimento da memória. Após a PS, os animais exibiram uma redução significativa na memória espacial e na memória de trabalho em comparação com o grupo controle, conforme demonstrado pela diminuição da porcentagem de alternâncias no teste do Labirinto em Y (Fig. 2A). Em contrapartida, o tratamento com *K. pastoris* KM71H resultou em um aumento na porcentagem de alternâncias espontâneas, evidenciando sua eficácia na melhoria do comprometimento da memória.

O grupo submetido à PS apresentou um aumento significativo nos níveis de EROS tanto no hipocampo quanto no intestino, em comparação ao grupo controle (Fig. 2B e 2C). No entanto, após a administração da *K. pastoris* KM71H, essa formação de espécies reativas foi revertida. Além disso, os níveis plasmáticos de corticosterona nos animais submetidos a PS estavam elevados em relação ao

grupo controle (Fig. 2D), e o tratamento com *K. pastoris* KM71H também reverteu esse aumento.

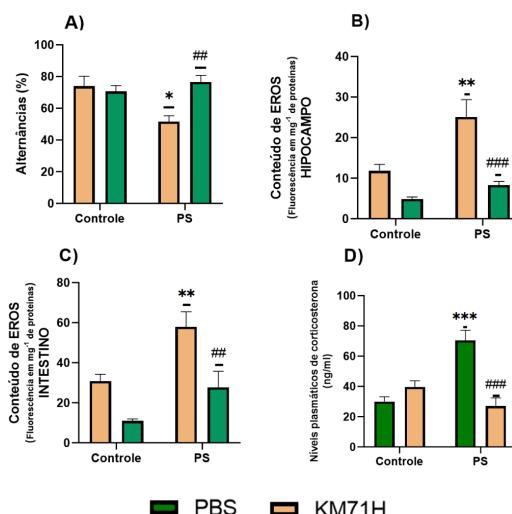


Figura 2. Efeito do tratamento com a *K. pastoris* KM71H no teste do Labirinto em Y (A), nos níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROS) no hipocampo e no intestino de camundongos (B e C) e nos níveis plasmáticos de corticosterona (D). Os dados estão expressos em média ± erro padrão da média (A, B, C, n= 12; D, n = 7). * p < 0,05 ** p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparados com o grupo controle, e # p< 0,05 ## p < p 0,01 e ### p< 0,001 quando comparados com o grupo induzido. PBS: Tampão fosfato-salino. PS: privação do sono.

O ciclo circadiano controla os períodos de vigília e sono através de hormônios como o cortisol, que mantém o estado de alerta, e a melatonina, que facilita a indução do sono. Em situações de PS, o excesso de cortisol inibe a melatonina, causando estresse oxidativo e declínio cognitivo (MATEENCHUK; MANDHANE; KOZYRSKYJ, 2020). A ativação do eixo HPA pela PS também afeta negativamente a microbiota intestinal, diminuindo bactérias benéficas e comprometendo a barreira intestinal (SUDO, 2016).

Uma vez comprometida a integridade da barreira intestinal, bactérias e seus subprodutos são translocados para o sistema circulatório, o que pode levar a inflamação e contribuir para o declínio cognitivo. No entanto, a relação entre a microbiota e o eixo HPA é bidirecional, e estudos sugerem que probióticos podem modular essa interação, atenuando respostas exageradas ao estresse e reduzindo níveis de corticosterona (WANG, 2022).

A sobrecarga de glicocorticoides pode superativar a enzima Monoamina Oxidase, que é responsável pela degradação de neurotransmissores como serotonina e dopamina (DESHWAL, 2018; SHIH, 2011), contribuindo para o estresse oxidativo e comprometendo as reservas de melatonina, agravando a PS (PAN; CHEN; XU; BAO, 2021). A *K. pastoris* KM71H reduziu a ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase, elevando os níveis de serotonina (BIRMAN, 2021).

O estresse oxidativo compromete a integridade dos lipídeos e das proteínas dos neurônios, resultando em neurodegeneração e déficit cognitivo (THINGORE, 2021). Desta forma, a *K. pastoris* KM71H se mostrou capaz de reduzir a geração de EROS tanto no hipocampo como no intestino dos animais tratados, demonstrando sua capacidade probiótica em prevenir o comprometimento da memória induzido pela PS.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, *K. pastoris* KM71H se destacou como um probiótico promissor na prevenção do declínio cognitivo em animais submetidos à PS.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRMANN, P. T.; CASARIL, A. M.; PESARICO, A. P.; CABALLERO, P. S. *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, Sep 2021.
- DESHWAL, S.; FORKINK, M.; HU, C.-H.; BUONINCONTRI, G. *et al.* Monoamine oxidase-dependent endoplasmic reticulum-mitochondria dysfunction and mast cell degranulation lead to adverse cardiac remodeling in diabetes. **Cell Death & Differentiation**, 25, n. 9, p. 1671-1685, 2018/09/01 2018.
- FRANÇA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L. *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.
- MATENCHUK, B. A.; MANDHANE, P. J.; KOZYRSKYJ, A. L. Sleep, Circadian Rhythm, and Gut Microbiota. **Sleep Medicine Reviews**, v. 53, p. 101340, maio 2020.
- AFZAL MISRANI *et al.* Differential effects of citalopram on sleep-deprivation-induced depressive-like behavior and memory impairments in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 88, p. 102–111, 1 jan. 2019.
- PAN, X.; CHEN, L.; XU, W.; BAO, S. *et al.* Activation of monoaminergic system contributes to the antidepressant- and anxiolytic-like effects of J147. **Behav Brain Res**, 411, p. 113374, Aug 6 2021.
- THINGORE, C.; KSHIRSAGAR, V.; JUVEKAR, A. Amelioration of oxidative stress and neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced memory impairment using Rosmarinic acid in mice. **Metab Brain Dis**, 36, n. 2, p. 299-313, Feb 2021.
- TONONI, G.; CIRELLI, C. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. **Neuron**, v. 81, n. 1, p. 12–34, jan. 2014.
- SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491–495, abr. 1988.
- SHIH, J. C.; WU, J. B.; CHEN, K. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, 118, n. 7, p. 979-986, 2011.
- SUDO, N. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Gut Microbiota. **The Gut-Brain Axis**, p. 293–304, 2016.
- WANG, Z. *et al.* The microbiota-gut-brain axis in sleep disorders. **Sleep Medicine Reviews**, v. 65, p. 101691, out. 2022.
- WU, L. *et al.* Altered Gut Microbial Metabolites in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Signals in Host-Microbe Interplay. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 228, 14 jan. 2021.