

EFEITO DO *KOMAGATAELLA PASTORIS* KM71H NA ANSIEDADE INDUZIDA POR ESTRESSE AGUDO EM CAMUNDONGOS

LAUREN N. PUJOL¹; RENATA L. DE OLIVEIRA²; RAFAELA A. XAVIER³; RAFAEL R. RODRIGUES⁴; FABRICIO R. CONCEIÇÃO⁵; LUCIELLI SAVENAGA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – laurennetto21@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – renataleivas15@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – alvaroxavierrafaela@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

O avanço interdisciplinar nas ciências—integrando psiquiatria, nutrição, gastroenterologia e neurologia—fortaleceu a comunicação bioquímica entre o sistema nervoso central (SNC) e o trato gastrointestinal (TGI). Essa relação bidirecional, chamada de eixo microbiota-intestino-cérebro, revela que, além da influência do cérebro nas funções intestinais, o intestino também pode induzir mudanças no SNC (GRENHAM et al., 2011).

A microbiota intestinal, um ecossistema microbiano complexo e dinâmico, tem influência no sistema imune e no metabolismo, exercendo papel crucial na comunicação entre o eixo microbiota-intestino-cérebro, que é fundamental na manutenção da homeostase do TGI e SNC (MORAIS et al., 2021). Evidências científicas demonstram que a microbiota influencia a integridade da barreira intestinal, a produção de citocinas e a modulação da resposta inflamatória (MINAYO et al., 2021). Além disso, um estudo recente elucidou a relação entre as alterações na microbiota e o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade (MORAIS et al., 2021). A prevalência global de ansiedade, especialmente no Brasil, onde a OMS identificou uma taxa de 9,3% da população, reforça a necessidade de novas abordagens terapêuticas (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2017).

A *Komagataella pastoris* KM71H, uma levedura metilotrófica, apresenta suas propriedades probióticas e tipo-antidepressivas já caracterizadas (BIRMAN et al., 2021; FRANÇA et al., 2015), relacionadas à sua capacidade de modular a resposta inflamatória, reduzir os níveis plasmáticos de corticosterona e preservar a integridade da barreira hematoencefálica. Essas características indicam que a *K. pastoris* KM71H pode atuar sobre os mecanismos patogênicos da ansiedade, oferecendo uma nova perspectiva para o tratamento desse transtorno. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito profilático da *K. pastoris* KM71H no comportamento tipo-ansioso induzido por um modelo de estresse agudo em camundongos.

2. METODOLOGIA

Para a realização do protocolo experimental foram utilizados camundongos machos da raça Swiss entre 4 a 6 semanas (pesando entre 25 e 35g). Durante o protocolo experimental, os animais tiveram livre acesso a água e a comida e estavam no ciclo de 12h de claro/escuro e mantidos em uma temperatura de 22 ± 2°C. Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 49/2024). A *K.*

pastoris KM71H foi diluída em 500 μ L de tampão fosfato-salino (PBS) para concentração de 8 logs unidades formadoras de colônia (UFC). g^{-1} , e a cada 7 dias as leveduras foram quantificadas (UFC. g^{-1}) para avaliação da viabilidade e estabilidade.

Para avaliação da capacidade da *K. pastoris* KM71H em prevenir os efeitos tipo-ansiosos induzidos pelo Estresse Agudo de Restrição (EAR), os animais foram tratados com 500 μ L de probiótico (10^8 UFC/animal) ou PBS (veículo) por via intragástrica durante 14 dias consecutivos. Assim, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle (Sem estresse + PBS), Induzido (EAR + PBS), *Per se* (Sem estresse + *K. pastoris* KM71H) e Tratado (EAR + *K. pastoris* KM71H).

No 15º dia, os animais foram submetidos ao protocolo de EAR, conforme descrito por Sousa et al. (2018), onde permaneceram imobilizados durante 4 horas em um aparato fenestrado. No 16º dia de protocolo experimental, foi realizado o teste comportamental para avaliação do comportamento tipo-ansioso e posteriormente os animais foram submetidos a eutanásia através da sobredosagem de isoflurano, e o sangue dos camundongos foi coletado para avaliação dos níveis de corticosterona plasmática de acordo com ZENKER (1959) (Figura 1). Para avaliar o efeito tipo-ansiolítico da levedura, foi realizado o teste Claro/Escuro, no qual individualmente os camundongos são colocados em um aparato contendo dois compartimentos: um claro, com $\frac{2}{3}$ da dimensão do aparato e um escuro, com $\frac{1}{3}$ da área do aparato. No referido teste, cada animal pode explorar livremente os dois compartimentos durante 5 minutos após a primeira entrada no compartimento escuro (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). O tempo de permanência no compartimento claro é o principal parâmetro considerado para a avaliação da atividade tipo-ansiolítica.

A análise estatística do estudo foi realizada através do software *GraphPad Prism 8.0*, por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de teste *pos hoc* de *Tukey*. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e considerados significativos quando $p < 0,05$.

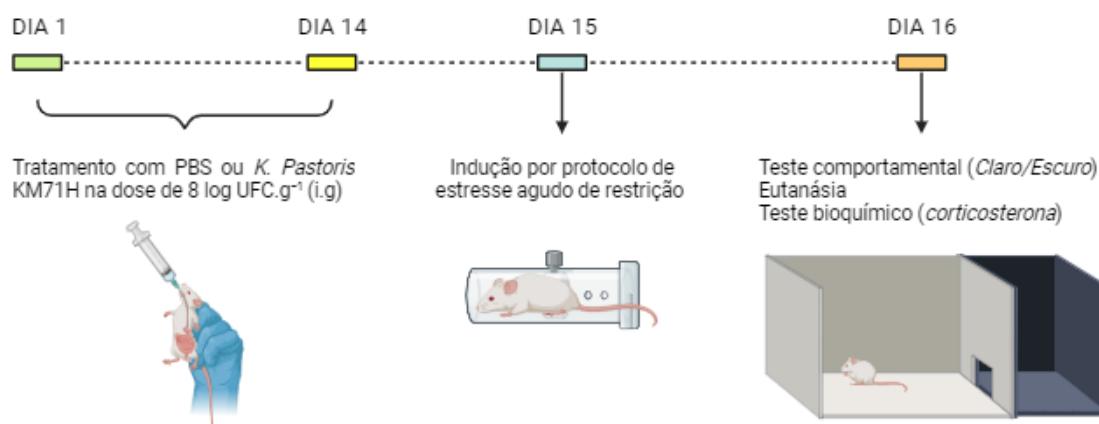


Figura 1. Delineamento experimental do projeto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, o EAR causou um comportamento tipo-ansioso nos camundongos, evidenciado pela redução do tempo explorando o compartimento claro (Figura 2A) e aumento do tempo explorando o compartimento escuro (Figura 2B) no teste claro/escuro, em comparação com os animais do grupo controle. Por outro lado, o tratamento com a *K. pastoris* KM71H foi capaz de reverter os parâmetros comportamentais alterados pelo EAR, demonstrando sua atividade tipo-ansiolítica (Figura 2A e 2B). Somando-se a isso, o efeito tipo-ansiolítico demonstrado pelo tratamento com a *K. pastoris* pode estar relacionado com a modulação da via neuroendócrina, uma vez a administração desta levedura previu o aumento dos níveis de corticosterona plasmática nos animais estressados (Figura 2C).

Em resposta ao estresse, o SNC gera uma cascata de eventos para manter homeostase corporal, entretanto quando há uma exposição exacerbada a eventos estressantes ocorre uma maior liberação de cortisol (corticosterona em roedores). Estas alterações ocasionam uma mudança na composição e funções da barreira intestinal, resultando em transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a ansiedade (MORAIS et al., 2021). Considerando-se que o EAR causou um aumento dos níveis de corticosterona, a reversão desta alteração ajuda a explicar o efeito tipo-ansiolítico da *K. pastoris* KM71H. Mecanicamente, através dos resultados obtidos, acreditamos que a *K. pastoris* KM71H apresenta efeito tipo-ansiolítico por meio da reversão dos níveis de corticosterona plasmáticos, possivelmente pela modulação do sistema neuroendócrino.

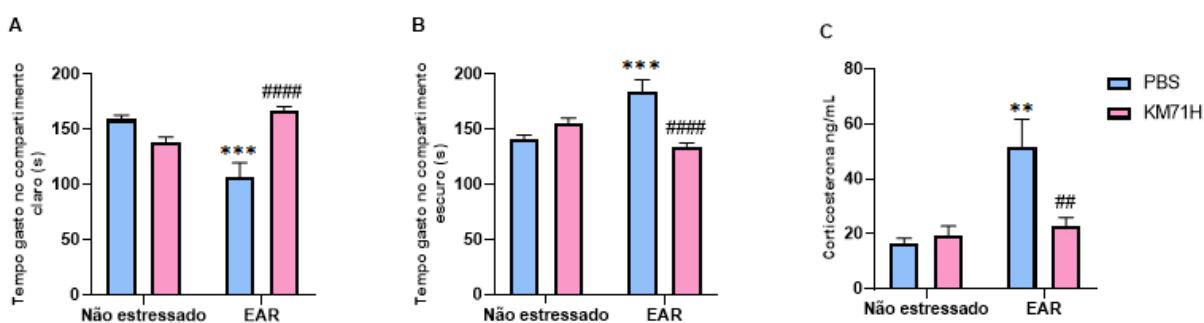


Figura 2. Efeito da *K. pastoris* KM71H no teste de Claro-Escuro: Tempo gasto no compartimento claro (A), tempo gasto no compartimento escuro (B), bem como nos níveis plasmáticos de corticosterona (C). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média ($n=6-7$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. ## $p < 0,01$ e ##### $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo induzido. EAR: Estresse agudo de restrição, PBS: Tampão fosfato-salino. KM71H: *K. pastoris* KM71H.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, esse estudo mostrou que a administração do probiótico *K. pastoris* KM71H teve um efeito tipo-ansiolítico em um modelo de estresse agudo em camundongos. Além disso, a redução dos níveis de corticosterona parece ser um fator importante nesse efeito. Assim, *K. pastoris* KM71H pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da ansiedade; no entanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer os mecanismos adicionais envolvidos nessa ação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRENHAM, Sue et al. Brain–gut–microbe communication in health and disease. **Frontiers in physiology**, v. 2, p. 16175, 2011.

BIRMAN, Paloma 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**, v. 171, p. 105740, 2021.

MINAYO, Miryam de Souza; MIRANDA, Iasmim; TELHADO, Raquel Senna. Revisão sistemática sobre os efeitos dos probióticos na depressão e ansiedade: terapêutica alternativa?. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 09, p. 4087-4099, 2021.

DEPRESSION, W. H. O. Other common mental disorders: global health estimates. **Geneva: World Health Organization**, v. 24, n. 1, 2017.

BIRMAN, Paloma T. et al. A pyrazole-containing selenium compound modulates neuroendocrine, oxidative stress, and behavioral responses to acute restraint stress in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 396, p. 112874, 2021.

CRAWLEY, Jacqueline; GOODWIN, Frederick K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

ZENKER, Nicolas; BERNSTEIN, Donald E. The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 231, n. 2, p. 695-701, 1958.

MORAIS, Livia H.; SCHREIBER IV, Henry L.; MAZMANIAN, Sarkis K. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 241-255, 2021.

SOUZA, Fernanda Severo Sabedra et al. α -(phenylselanyl) acetophenone abolishes acute restraint stress induced-comorbid pain, depression and anxiety-related behaviors in mice. **Neurochemistry international**, v. 120, p. 112-120, 2018.

FRANÇA, Rodrigo Correa 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.