

EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO TRATAMENTO COM UM PÓS-BIÓTICO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO EM CAMUNDONGOS

ALINE SILVEIRA GONÇALVES¹; MARCIA JUCIELE DA ROCHA¹; MARCELO HEINEMANN PRESA¹; NARRYMAN PINTO ZUGE¹; PALOMA TABORDA BIRMANN²; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING¹

¹Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – nutrialinesilgon@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.

²Faculdade Anhanguera Pelotas – paloma_birmann@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O conceito eixo microbiota-intestino-cérebro refere-se à comunicação bidirecional entre o intestino e o sistema nervoso central (SNC), mediada principalmente pelo nervo vago, sistema nervoso entérico, sistema imunológico e metabólitos (Qiao, 2022). Todos os mamíferos passam a vida em contato com uma vasta diversidade de microrganismos residentes no intestino que compõe a microbiota intestinal (MI), os quais, dentre muitas funções, podem modular as células imunológicas, auxiliar na digestão e sintetizar diversos metabólitos importantes para a saúde do hospedeiro (Mazziota, 2023). A MI é composta por mais de um trilhão de microrganismos (Pellegrini, 2018), sendo as bactérias o grupo mais predominante (Chudzik, 2021).

As bactérias probióticas mais amplamente estudadas e utilizadas, como *Lactobacillus* e *Bifidobactéria*, são nativas do trato gastrointestinal humano e desempenham papéis cruciais na manutenção da saúde. Evidências sugerem que a administração oral dessas bactérias pode potencializar as funções da MI (Piqué, 2019). Apesar da complexidade inerente à MI, estudos têm explorado o efeito antidepressivo de cepas bacterianas, como o de XIE (2020), que demonstrou o uso de *Lactobacillus reuteri* (Lr) como intervenção terapêutica para o comportamento tipo depressivo em animais, através da modulação da MI (XIE, 2020). Além dos probióticos, pesquisas recentes têm investigado o uso de pós-bióticos em protocolos experimentais pré-clínicos para o tratamento da depressão (Maehata, 2019; Kambe, 2020). Estudos utilizando bactérias do gênero *Lactobacillus* inativadas por calor relataram resultados antidepressivos promissores em modelos animais de depressão (Maehata, 2019; Kambe, 2020).

Complementarmente, o selênio também tem sido investigado no contexto da depressão, devido ao seu papel central nos mecanismos antioxidantes do SNC, contribuindo para o funcionamento adequado das selenoproteínas (Wang, 2018; Ekinci, 2023).

Desse modo, para o desenvolvimento deste trabalho escolhemos a cepa de Lr, uma vez que já demonstrou propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras, produzindo metabólitos bioativos como reuterina, ácido acético, etanol e ácido lático (Michels, 2022). Assim, desenvolvemos uma intervenção terapêutica composta por Lr, posteriormente enriquecidas por selênio, para avaliar seus efeitos sobre comportamentos do tipo depressivos em modelos animais.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo do *Lactobacillus, reuteri*

A cepa bacteriana de *L. reuteri* LRE02 utilizada como tratamento, foi cultivada em meio Man Rogosa e Sharpe (MRS), específico para este gênero. A cultura foi expandida e mantida em agitador orbital a 37°C até alcançar uma concentração de 10^8 ou 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por ml. Em seguida, foi adicionado 0,05 g de selenito de sódio PA por ml de cultura, e a mistura foi incubada novamente em agitador a 37°C por 24 horas, conforme descrito em estudos anteriores (Xu, 2018; Song, 2022). Para a inativação térmica da cultura, foi utilizado banho-maria a 80°C por 40 minutos, e armazenado em geladeira a 5°C, para administração posterior.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos machos, pesando entre 23 e 28 g. Os animais foram divididos em cinco grupos: Veículo (V) que recebeu MRS, *L. reuteri* (Lr) que recebeu probiótico, *L. reuteri* inativo (ILr) que recebeu pós-biótico, *L. reuteri* inativo com selênio (ILr/Se) que recebeu o pós-biótico com selênio e, o controle positivo (Flx) que recebeu fluoxetina na dose de 5 mg/kg de peso corporal. Os quatro primeiros tratamentos foram administrados em um volume de 300 µl, onde os três contendo Lr tiveram titulação de 10^9 UFC/ml. A dose foi fornecida uma vez ao dia, por 14 dias consecutivos por via intragástrica.

2.3 Testes Comportamentais

Para avaliar o efeito do tratamento na proteção contra o comportamento do tipo depressivo foram realizados os seguintes testes: o teste de borrifagem de sacarose (TBS), o teste de suspensão pela cauda (TSC) e o teste de nado forçado (TNF). O TBS avalia o comportamento de autocuidado dos animais, observando-se a autolimpeza após a exposição a uma borrifada de sacarose 10% no dorso por 5 minutos, conforme protocolo adotado em estudos anteriores (Birnmann, 2020; Liu, 2020). Tanto o TSC quanto o TNF utilizam os mesmos parâmetros para a avaliação do comportamento. No TSC, o animal é suspenso pela cauda, enquanto no TNF é colocado em um cilindro com água a 25 °C, sem possibilidade de fuga. Em ambos os testes, os animais foram observados por 6 minutos para registrar a latência até o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade, conforme modificado dos protocolos de Steru (1985) e Porsolt (1977) respectivamente.

2.4 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino. Os dados experimentais foram demonstrados como média \pm erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram feitas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do TBS demonstraram que não houve diferença na latência para o primeiro episódio de imobilidade entre os grupos, embora houve uma tendência de redução nos grupos ILr/Se e Flx (Fig. 1A). No entanto, todos os tratamentos aumentaram de forma significativa o tempo total de limpeza (Fig. 1B), demonstrando um efeito do tipo antidepressivo dos tratamentos com Lr, ILr, Lr/Se e Flx. No TSC, os

tratamentos com Lr e Flx aumentaram significativamente a latência para o primeiro episódio de imobilidade, enquanto os tratamentos com ILr e ILr/Se apresentaram apenas uma tendência de aumento em relação ao veículo (Fig. 1C). Já no tempo total de imobilidade no TSC, todos os tratamentos reduziram este parâmetro de forma significativa em relação ao veículo, sendo observada uma redução maior para o grupo ILr/Se (Fig. 1D). Estes resultados também demonstraram um efeito do tipo antidepressivo dos tratamentos com Lr, ILr, IL/Se e Flx. No TNF, apenas o tratamento com ILr/Se aumentou o tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade de forma significativa, enquanto os outros tratamentos apresentaram apenas uma tendência de aumento comparados ao grupo veículo (Fig. 1E). Em relação ao tempo total de imobilidade, todos os tratamentos reduziram de forma significativa este parâmetro (Fig. 1F), demonstrando o efeito do tipo antidepressivo dos tratamentos com Lr, ILr, ILr/Se e Flx no TNF. Dessa forma, pode-se observar que o tratamento com *L. reuteri*, inativado ou não, apresentou efeito do tipo antidepressivo e o enriquecimento com Se mostrou um efeito mais significativo em alguns parâmetros. Os resultados observados para o grupo Flx validaram os experimentos realizados.

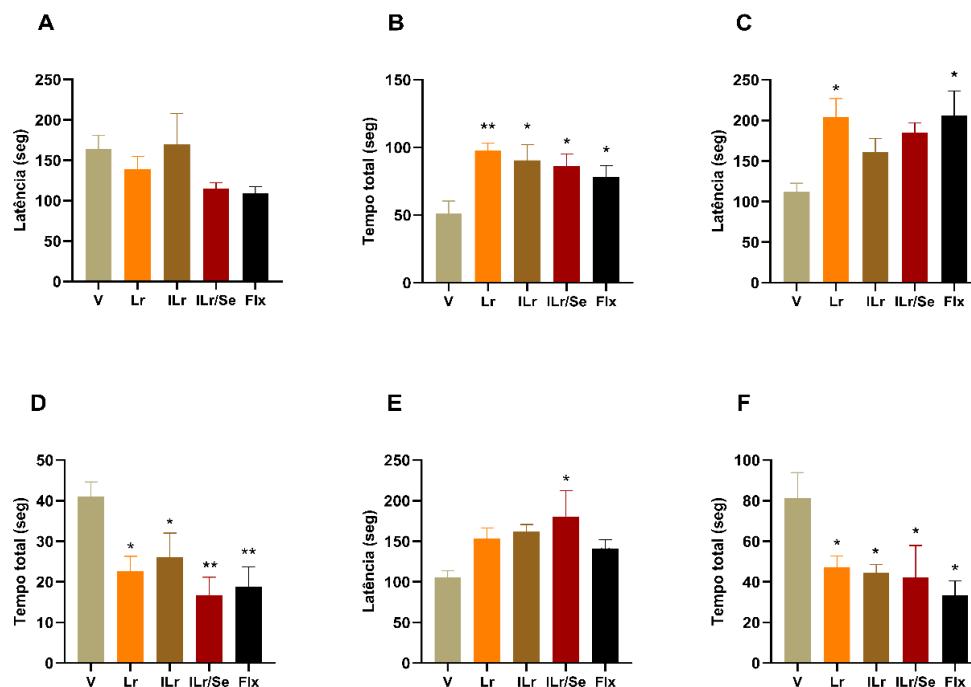


Figura 1- Efeito do tipo antidepressivo. Teste de borrifagem de sacarose (A: latência para autolimpeza; B: tempo total de autolimpeza); Teste de suspensão pela cauda (C: latência para imobilidade; D: tempo total de imobilidade) e teste de nado forçado (E: latência para imobilidade; F: tempo total de imobilidade). (*) p<0.05 e (**) p<0.01 quando comparado ao grupo veículo.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam um efeito antidepressivo promissor do tratamento com *L. reuteri*, inativado ou não, e *L. reuteri* enriquecido com Se, fornecendo uma base sólida para a continuidade das análises *ex vivo*, com o objetivo de aprofundar a compreensão dos efeitos desse probiótico ou seu pós-biótico, e o enriquecimento com Se

5. REFERÊNCIAS

- BIRMANN, P. T.; CASARIL, A. M. *Komagataella pastoris KM71H Mitigates Depressive-Like Phenotype, Preserving Intestinal Barrier Integrity and Modulating the Gut Microbiota in Mice.* **Mol Neurobiol**, 60(7):4017-4029, 2023.
- CHUDZIK, A.; ORZYŁOWSKA, A. Probiotics, Prebiotics and Postbiotics on Mitigation of Depression Symptoms: Modulation of the Brain-Gut-Microbiome Axis. **Biomolecules**, 11(7):1000, 2021.
- EKINCI, G. N.; SANLIER, N. The relationship between nutrition and depression in the life process: A mini-review. **Exp Gerontol**, 172:112072, 2023.
- KAMBE, J.; WATCHARIN, S. Heat-killed *Enterococcus faecalis* (EC-12) supplement alters the expression of neurotransmitter receptor genes in the prefrontal cortex and alleviates anxiety-like behavior in mice. **Neurosci Lett**, 720:134753, 2020.
- LIU, S.; GUO, R. Gut Microbiota Regulates Depression-Like Behavior in Rats Through the Neuroendocrine-Immune-Mitochondrial Pathway. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 16:859-869, 2020.
- MAEHATA, H.; KOBAYASHI, Y. Heat-killed *Lactobacillus helveticus* strain MCC1848 confers resilience to anxiety or depression-like symptoms caused by subchronic social defeat stress in mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 83(7):1239-1247, 2019.
- MICHELS, M.; JESUS, G. F. A. Effects of different probiotic strains *B. lactis*, *L. rhamnosus* and *L. reuteri* on brain-intestinal axis immunomodulation in an endotoxin-induced inflammation. **Mol Neurobiol**, 59(8):5168-5178, 2022.
- PELLEGRINI, C.; ANTONIOLI, L. Interplay among gut microbiota, intestinal mucosal barrier and enteric neuro-immune system: a common path to neurodegenerative diseases? **Acta Neuropathol**, 136(3):345-361, 2018.
- PIQUÉ, N.; BERLANGA, M. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. **Int J Mol Sci**. May 23;20(10):2534, 2019.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 229(2):327-336, 1977.
- QIAO, L.; CHEN, Y. Selenium Nanoparticles-Enriched *Lactobacillus casei* ATCC 393 Prevents Cognitive Dysfunction in Mice Through Modulating Microbiota-Gut-Brain Axis. **Int J Nanomedicine**, New Zealand, 17:4807-4827, 2022MAZZIOTTA, C.; TOGNON, M. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. **Cells**, 12(1):184, 2023.9:1129, 2018.
- SONG, X.; QIAO, L. Dietary supplementation with selenium nanoparticles-enriched *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviates intestinal barrier dysfunction of mice exposed to deoxynivalenol by regulating endoplasmic reticulum stress and gut microbiota. **Ecotoxicol Environ Saf**, 248:114276, 2022.
- STERU, L.; CHERMAT, R. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 85(3):367-370, 1985.
- XIE, R.; JIANG, P. Oral treatment with *Lactobacillus reuteri* attenuates depressive-like behaviors and serotonin metabolism alterations induced by chronic social defeat stress. **J Psychiatr Res**, 122:70-78, 2020.
- XU, C.; GUO, Y. Biogenic Synthesis of Novel Functionalized Selenium Nanoparticles by *Lactobacillus casei* ATCC 393 and Its Protective Effects on Intestinal Barrier Dysfunction Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. **Front Microbiol**, 18:9:1129, 2018.
- WANG, J.; UM, P. Zinc, Magnesium, Selenium and Depression: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms and Implications. **Nutrients**, 10:584, 2018.