

***Lactobacillus reuteri* LRE02 ENRIQUECIDO COM SELÊNIO MODULA A EXPRESSÃO DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE**

ALINE SILVEIRA GONÇALVES¹; NARRYMAN PINTO ZUGE¹; MARCIA JUCIELE DA ROCHA¹; CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO¹; 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

A depressão é um transtorno neuropsiquiátrico marcado por episódios depressivos recorrentes e está entre as principais causas de incapacidade mundial (OTAKA, 2021). Embora sua fisiopatologia não seja totalmente clara, a hipótese monoaminérgica, que envolve a redução de serotonina, norepinefrina e dopamina no sistema nervoso central, é amplamente aceita (ALLI, 2022). Outra teoria importante destaca a disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro, cuja microbiota intestinal regula a produção de neurotransmissores como serotonina e GABA, além de secretar metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta, que promovem a plasticidade cerebral (GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA, 2022; SIMPSON, 2021). A depressão também tem sido associada a processos inflamatórios sistêmicos que afetam o metabolismo do triptofano, aminoácido precursor da serotonina (ZHANG, 2023) e, eventos como o estresse crônico podem levar à disbiose intestinal, que, por sua vez, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais ativam a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Durante estados inflamatórios, a ativação da IDO promove o desvio do triptofano da via de síntese da serotonina para a via da quinurenina, gerando metabólitos neurotóxicos (MACKAY, 2024). Esse desvio metabólico reduz os níveis de serotonina no sistema nervoso central, contribuindo para disfunções neuroquímicas associadas aos sintomas depressivos (CORREIA, 2022; SIPAHI, 2023).

A espécie *Lactobacillus reuteri* inclui bactérias Gram-positivas que ajudam a equilibrar a microbiota intestinal, combatem microrganismos nocivos e previnem doenças intestinais (LI, 2023). Espécies de *L. reuteri* apresentam efeitos anti-inflamatórios por diversos mecanismos, como produção de histamina que modula receptores H₂ e H₁, síntese de folato com impacto epigenético, indução de células T reguladoras, redução de citocinas pró-inflamatórias, ativação do receptor AhR promovendo aumento de interleucina (IL)-22, e produção de exopolissacarídeos que formam biofilme protetor (ENGEVIK, 2019; AL-HADIDI, 2021). O selênio, por sua vez, é um micronutriente essencial à dieta humana, amplamente estudado na neurobiologia devido à sua potente atividade antioxidante. Sua deficiência está associada a diversos prejuízos à saúde (WU, 2021; WANG, 2024). Considerando que a via da IDO representa um mecanismo crucial de interligação entre inflamação, metabolismo do triptofano e fisiopatologia da depressão, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão da IDO no hipocampo, córtex pré-frontal e no intestino após o tratamento com *L. reuteri* viável, inativado ou enriquecido com selênio, visando investigar o potencial desses tratamentos como estratégia para identificar novas opções terapêuticas para a depressão, focando na modulação do eixo microbiota-intestino-cérebro.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo do *Lactobacillus reuteri*

A cepa de *Lactobacillus reuteri* LRE02 foi cultivada em meio Man Rogosa e Sharpe (MRS) a 37°C até atingir 10⁹ UFC/ml. Em seguida, adicionou-se 200 µg/ml de selenito de sódio e a cultura foi incubada por mais 24 horas a 37°C, conforme descrito na literatura (XU, 2018; SONG, 2022). Para inativação térmica, a cultura foi submetida a banho-maria a 80 °C por 40 minutos e armazenada a 5°C para uso posterior.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25–30 g) (CEUA 035551/2023-47) divididos em quatro grupos: veículo (MRS), *L. reuteri* vivo (Lr), *L. reuteri* inativo (ILr) e *L. reuteri* inativo com selênio (ILr/Se). Os tratamentos com *L. reuteri* (10⁹ UFC/ml) e o veículo foram administrados via intragástrica (300 µl) por 14 dias consecutivos. Após o tratamento, foram realizados testes comportamentais e, posteriormente, a eutanásia para coleta de estruturas para análise de expressão gênica.

2.3 Análise quantitativa de PCR em tempo real

A expressão do gene da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) foi avaliada por RT-qPCR em hipocampo, córtex pré-frontal e intestino delgado. O RNA total foi extraído com TRIzol, seguido por síntese de cDNA com o kit High-Capacity. A amplificação foi realizada com GoTaq® qPCR Master Mix no equipamento Stratagene Mx3005P. A expressão foi normalizada ao gene de referência GAPDH: F: 5'-GGGTGAGGCCGGTGCTGAG-3'; R: 5'-TGGGGGTAGGAACACGGAAGG-3', utilizando os seguintes primers para IDO: F: 5'-AATCAAAGCAATCCCCACTG-3'; R: 5'-AAAAACGTGTCTGGGTCCAC-3'.

2.4 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de D'Agostino. Os dados experimentais foram demonstrados como média ± 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 três diferentes tratamentos de *Lactobacillus reuteri* foram capazes de reduzir a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) no hipocampo [$F_{(3, 14)}=9,887$; $p=0,0009$], no córtex pré-frontal [$F_{(3, 14)}=9,404$; $p=0,0012$] e no intestino delgado [$F_{(3, 13)}=8,810$; $p=0,0019$] dos animais (Figura 1). No entanto, é importante destacar que o tratamento com *L. reuteri* enriquecido com selênio apresentou a maior redução da expressão no hipocampo, além de indicar tendência a melhores resultados também nas outras duas estruturas. A IDO é uma enzima que atua desviando o metabolismo do triptofano para a via da quinurenina e reduzindo a síntese de serotonina (JIANG, 2020). Como aproximadamente 90% da serotonina do corpo é produzida no intestino, a disponibilidade adequada de triptofano é essencial para a saúde intestinal e cerebral (REIGSTAD, 2015). A serotonina desempenha papel crucial na regulação do humor e do funcionamento do sistema nervoso (CORREIA & VALE, 2022). Assim, a modulação negativa da

IDO pode ter um efeito em aumentar a serotonina disponível, favorecendo a saúde mental e a homeostase intestinal.

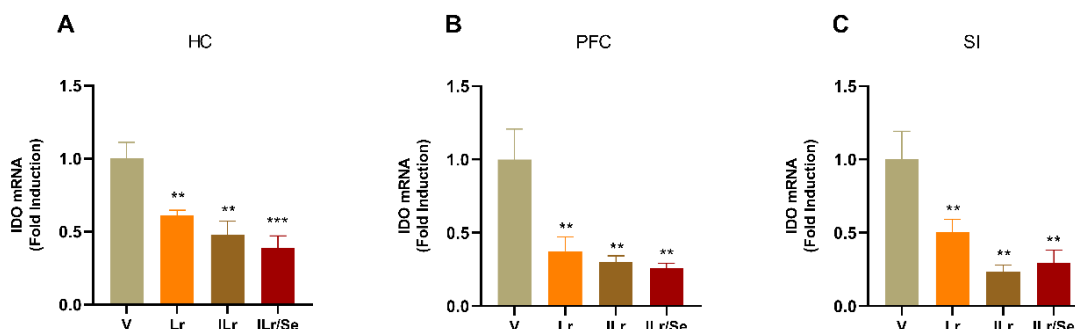


Figura 1. Expressão relativa de IDO por RT-qPCR no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e intestino delgado (C). Os grupos tratados com *L. reuteri* viável (Lr), inativado (ILr) e enriquecido com selênio (ILr/Se) apresentaram redução significativa da expressão de IDO em comparação ao grupo controle (V). Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao veículo.

4. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo indicam que *L. reuteri*, em suas três formas, especialmente a versão enriquecida com selênio, apresenta potencial para modular a expressão da enzima IDO. Essa modulação pode favorecer uma maior disponibilidade de serotonina, sugerindo um possível efeito preventivo contra transtornos associados à redução desse neurotransmissor, como a depressão. Nossa perspectiva é dar continuidade às investigações, avaliando os efeitos desse tratamento em modelos animais de depressão e ansiedade induzidos por neuroinflamação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HADIDI, A.; NAVARRO, J.; GOODMAN, S. D.; BAILEY, M. T.; BESNER, G. E. Lactobacillus reuteri in Its Biofilm State Improves Protection from Experimental Necrotizing Enterocolitis. **Nutrients**, v.13, n.3, p.918, 2021.
- ALLI, S. R.; GORBOVSKAYA, I.; LIU, J. C. W.; KOLLA, N. J.; BROWN, L.; MÜLLER, D. J. The Gut Microbiome in Depression and Potential Benefit of Prebiotics, Probiotics and Synbiotics: A Systematic Review of Clinical Trials and Observational Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.9, p.4494, 2022.
- CORREIA, A. S.; VALE, N. Tryptophan metabolism in depression: A narrative review with a focus on serotonin and kynurenine pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.15, p.8493, 2022.
- ENGEIK, M. A.; AIHARA, E.; ENGEVIK, K. A.; MATTHIS, A. L.; LEWIS, T. A.; PILGRIM, A. A.; VERSALOVIC, J. Microbial Metabolic Capacity for Intestinal Folate Production and Modulation of Host Folate Receptors. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p.2305, 2019.
- GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA, A.; SZMAJDA-KRYGIER, D.; KOZŁOWSKA, E. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Psychiatric Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.19, p.11245, 2022.
- JIANG, X.; LIN, Q.; XU, L.; CHEN, Z.; YAN, Q.; CHEN, L.; YU, X. Indoleamine-2,3-Dioxygenase Mediates Emotional Deficits by the Kynurenine/Tryptophan Pathway

in the Ethanol Addiction/Withdrawal Mouse Model. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.14, p.11, 2020.

LI, C.; SU, Z.; CHEN, Z.; CAO, J.; LIU, X.; XU, F. Lactobacillus reuteri strain 8008 attenuated the aggravation of depressive-like behavior induced by CUMS in high-fat diet-fed mice through regulating the gut microbiota. **Frontiers in Pharmacology**, v.14, p.1149185, 2023. Erratum in: **Frontiers in Pharmacology**, v.14, p.1318323, 2023.

MACKAY, M.; YANG, B. H.; DURSUN, S. M.; BAKER, G. B. The Gut-Brain Axis and the Microbiome in Anxiety Disorders, Post-Traumatic Stress Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder. **Current Neuropsychopharmacology**, v.22, n.5, p.866-883, 2024.

OTAKA, M.; KIKUCHI-HAYAKAWA, H.; OGURA, J.; ISHIKAWA, H.; YOMOGIDA, Y.; OTA, M.; HIDESE, S.; ISHIDA, I.; AIDA, M.; MATSUDA, K.; KAWAI, M.; YOSHIDA, S.; KUNUGI, H. Effect of Lactobacillus paracasei Strain Shirota on Improvement in Depressive Symptoms, and Its Association with Abundance of Actinobacteria in Gut Microbiota. **Microorganisms**, v.9, n.5, p.1026, 2021.

REIGSTAD, C. S.; SALMONSON, C. E.; RAINEY, J. F. 3rd; SZURSZEWSKI, J. H.; LINDEN, D. R.; SONNENBURG, J. L.; FARRUGIA, G.; KASHYAP, P. C. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. **FASEB Journal**, v.29, n.4, p.1395–1403, 2015.

SIMPSON, C. A.; DIAZ-ARTECHE, C.; ELIBY, D.; SCHWARTZ, O. S.; SIMMONS, J. G.; COWAN, C. S. M. The gut microbiota in anxiety and depression - A systematic review. **Clinical Psychology Review**, v.83, p.101943, 2021.

SIPAHI, H.; MAT, A. F.; OZHAN, Y.; AYDIN, A. The interrelation between oxidative stress, depression and inflammation through the kynurenine pathway. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.23, n.6, p.415–425, 2023.

SONG, X.; QIAO, L.; CHANG, J.; DOU, X.; ZHANG, X.; PI, S.; XU, C. 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. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.248, p.114276, 2022.

WANG, L.; JU, J.; XIE, H.; QIAO, F.; LUO, Q.; ZHOU, L. Comparative study on growth and metabolomic profiles of six Lactobacilli strains by sodium selenite. **Microorganisms**, v.12, n.10, p.1937, 2024.

WU, Z.; PAN, D.; JIANG, M.; SANG, L.; CHANG, B. Selenium-enriched Lactobacillus acidophilus ameliorates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice by regulating inflammatory cytokines and intestinal microbiota. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**, v.8, p.716816, 2021.

XU, C.; QIAO, L.; GUO, Y.; MA, L.; CHENG, Y. Preparation, characterization, and antioxidant activity of selenium nanoparticles and polysaccharides capped with proteins synthesized by Lactobacillus casei ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v.195, p.576–585, 2018.

ZHANG, Z. H.; XU, D. Y.; CHEN, G. Y.; TENG, T.; WU, H. Y.; ZHOU, X. Y. [Latest findings on the interaction mechanism between depressive disorder and intestinal permeability]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v.54, n.2, p.257-262, 2023.