

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE

**O ESTRESSE E A COLITE DOS PONTOS DE VISTA
MICROBIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO: UMA
ABORDAGEM *GUT-BRAIN AXIS***

ORIENTADO: Sávio Henrique de Cicco Sandes

ORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO – 2019

SÁVIO HENRIQUE DE CICCIO SANDES

**O ESTRESSE E A COLITE DOS PONTOS DE VISTA
MICROBIOLÓGICO E FARMACOLÓGICO: UMA
ABORDAGEM *GUT-BRAIN AXIS***

Tese apresentada ao programa
de pós-graduação em Genética, Departamento de
Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Feral de Minas Gerais, como
pré-requisito para a obtenção do título de
Doutor em Genética

Área de Concentração: Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO VIDIGAL CALIARI

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte, MG
2019**

- 043 Sandes, Sávio Henrique de Cicco.
 O estresse e a colite dos pontos de vista microbiológico e farmacológico: uma abordagem *Gut-Brain axis* [manuscrito] / Sávio Henrique de Cicco Sandes. – 2019.
- 195 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes. Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Geral.
1. Genética. 2. Microbioma Gastrointestinal. 3. Colite Ulcerativa. 4. Estresse. 5. Weissella. I. Nunes, Álvaro Cantini. II. Caliari, Marcelo Vidigal. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

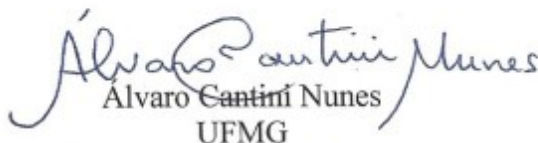
CDU: 575



**"O estresse e a colite dos pontos de vista microbiológico e
farmacológico: uma abordagem gut-brain axis "**

Sávio Henrique de Cicco Sandes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Alvaro Cantini Nunes
UFMG


Jacques Robert Nicoli
UFMG


Caio Tavares Fagundes
UFMG


Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira
UFMG


Leonardo Borges Acúrcio
UNIFOR-MG


Luíge Biciati Alvim
Instituto Hermes Pardini


Marcelo Vidigal Caliari
UFMG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela minha criação e formação humana. Pelo amor, apoio e carinho ao longo de toda a vida, e por me ensinarem a importância da educação como agente transformador da vida individual e em sociedade.

Ao meu grande amor, Nai/Mozão, pela companhia, pelo apoio, pelo amor e pela paixão. Te amo muito-muitão!

Aos grandes amigos que fiz na pós-graduação e que levarei para a vida inteira. Ao Leonardo, pelos momentos de zueira, de cervejas artesanais e de discussões a cerca de tudo. À Silvinha, pessoa mais doce deste mundo! Ao Felipe, também conhecido como Felps, Geripe e Gigi pelos bons momentos e por ter me apresentado o Mamãe Bebidas. Ao Luige, pelo trabalho em equipe e pelas zoeiras nesta vida. Às oferendas, Clarisse e Amanda. Ao Rafa pelas boas conversas. E à tchurma agregada da veterinária, à Renatinha, Gabi, Lets, ao Gustavo, Rani, Giva e Cosme.

Ao Prof. Jacques Nicoli, por ser um exemplo humanístico de professor e pesquisador.

Ao Prof. Álvaro Cantini e à Profa. Elisabeth Neumann, pela confiança.

Ao Prof. Marcelo Caliari e ao Fabrício, pela ajuda nas análises histopatológicas.

À Profa. Simone Generoso e à Patrícia Barros pela ajuda nos ensaios de permeabilidade.

Às agências de fomento, ao CNPq pela bolsa e pela taxa de bancada e à FAPEMIG, pelos recursos de pesquisa.

Arthur Schopenhauer dizia que "Quanto mais claro é o conhecimento do homem – quanto mais inteligente ele é – mais sofrimento ele tem; o homem que é dotado de gênio sofre mais do que todos." O conhecimento gerado neste trabalho seguiu esta mesma premissa universal. Apesar de todos os esforços e seguindo os princípios de Russell e de Burch para a promoção do bem-estar animal, o sofrimento caiu sobre os camundongos. Portanto, agradecê-los respeitosamente, em memória, é o mínimo que possa ser feito.

Obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA	IX
RESUMO	X
CAPÍTULO I: Introdução	18
I.1. INTRODUÇÃO	19
I.1.1 O INTESTINO, A MICROBIOTA, O SISTEMA IMUNE, O CÉREBRO E O COMPORTAMENTO	19
I.1.1.1 A microbiota e o desenvolvimento da mucosa intestinal	19
I.1.1.2 O papel imunomodulador da microbiota intestinal	25
I.1.1.3 O papel da microbiota intestinal no eixo intestino-cérebro	30
I.1.2 SOBRE A <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4.....	37
I.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO II: A <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 melhorou aspectos clínicos no contexto da retocolite ulcerativa	45
II.1. SOBRE A RETOCOLITE ULCERATIVA.....	46
II.2. OBJETIVOS.....	49
II.2.1 OBJETIVO GERAL	49
II.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
II.3. METODOLOGIA	50
II.3.1 CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	50
II.3.2 CAMUNDONGOS – MANEJO E ASPECTOS ÉTICOS	50
II.3.3 ENSAIO DE COLITE AGUDA.....	51
II.3.3.1 Quantificação dos parâmetros de saúde	52
II.3.3.2 Avaliação da permeabilidade intestinal.....	52
II.3.3.3 Análises histopatológicas	53
II.3.3.4 Análises moleculares de citocinas e reguladores da imunidade.....	53
II.3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
II.4. RESULTADOS.....	56
II.4.1 A <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 MELHOROU A SAÚDE DOS CAMUNDONGOS NO MODELO DE COLITE QUIMICAMENTE INDUZIDA.....	56
II.4.2 A MELHORA DA SAÚDE DOS CAMUNDONGOS COM RETOCOLITE ULCERATIVA FOI ASSOCIADA À IMUNOMODULAÇÃO DA MUCOSA COLÔNICA DESENCADEADA PELA INJEÇÃO DA <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4.....	60
II.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
II.6. ANEXO: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO, EXPEDIDO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.....	65

CAPÍTULO III: A <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 reduziu os comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em camundongos cronicamente estressados	66
III.1. O PAPEL DO SISTEMA IMUNE NA DEPRESSÃO E NA ANSIEDADE	67
III.2. OBJETIVOS	72
III.2.1 OBJETIVO GERAL	72
III.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
III.3. METODOLOGIA	73
III.3.1 ENSAIO DE ESTRESSE CRÔNICO	73
III.3.1.1 Avaliação do comportamento social	74
III.3.1.2 Avaliação do comportamento tipo-ansioso	74
III.3.1.3 Avaliação do comportamento tipo-depressivo	75
III.3.1.4 Análises moleculares de citocinas	75
III.3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	76
III.4. RESULTADOS	78
III.4.1 A <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 REDUZIU OS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIOSO E TIPO-DEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS CRONICAMENTE ESTRESSADOS	78
III.4.2 A REDUÇÃO DOS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIOSO E TIPO-DEPRESSIVO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS FOI ASSOCIADA À IMUNOMODULAÇÃO HIPOCAMPAL DESENCADEADA PELA INJEÇÃO DA <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	80
III.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

CAPÍTULO IV: O Citalopram e a <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 reduziram a permeabilidade intestinal em camundongos estressados com colite, regulando moléculas constituintes da barreira epitelial, do sistema imune e do sistema enteroendócrino	84
IV.1. O PAPEL DA DEPRESSÃO NO DESENVOLVIMENTO E NA REMISSÃO DA COLITE	85
IV.2. OBJETIVOS	87
IV.2.1 OBJETIVO GERAL	87
IV.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	87
IV.3. METODOLOGIA	88
IV.3.1 ENSAIO DE ESTRESSE CRÔNICO COMBINADO COM O DE COLITE	88
IV.3.1.1 Quantificação dos parâmetros de saúde	88
IV.3.1.2 Avaliação da permeabilidade intestinal	89
IV.3.1.3 Análises histopatológicas	90
IV.3.1.4 Análises moleculares	91
IV.3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	91
IV.4. RESULTADOS	96
IV.4.1 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 REDUZIRAM A PERMEABILIDADE INTESTINAL DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS E COM COLITE	96
IV.4.2 A REGULAÇÃO DAS MOLÉCULAS CONSTITUINTES DA BARREIRA EPITELIAL REDUZIU A PERMEABILIDADE INTESTINAL NOS GRUPOS TRATADOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	97

IV.4.3 O TRATAMENTO COM <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 REDUZIU O INFILTRADO INFLAMATÓRIO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS E COM COLITE	103
IV.4.4 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE NO CÓLON DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS COM COLITE	105
IV.4.5 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS ENTEROENDÓCRINAS NO CÓLON DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS COM COLITE	113
IV.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
CAPÍTULO V: O Citalopram e a <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 reduziram o comportamento tipo-depressivo em camundongos estressados com colite, regulando moléculas imunes, além de fatores e receptores neuronais	128
V.1. O PAPEL DA COLITE NO DESENVOLVIMENTO DO ESTRESSE.....	129
V.2. OBJETIVOS	130
V.2.1 OBJETIVO GERAL	130
V.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	130
V.3. METODOLOGIA	131
V.3.1 ENSAIO DE ESTRESSE CRÔNICO COMBINADO COM O DE COLITE	131
V.3.1.1 Avaliação do comportamento tipo-depressivo.....	131
V.3.1.2 Análises moleculares.....	131
V.3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	132
V.4. RESULTADOS.....	136
V.4.1 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 REDUZIRAM O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE	136
V.4.2 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE NO HIPOCAMPO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE	139
V.4.3 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS METABOLIZADORAS E TRANSPORTADORAS DAS MONOAMINAS NO HIPOCAMPO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE	144
V.4.4 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS ASSOCIADAS À PLASTICIDADE NEURONAL E À PERMEABILIDADE HEMATOENCEFÁLICA NO HIPOCAMPO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE	153
V.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
CAPÍTULO VI: Discussões.....	170
VI.1. DISCUSSÕES.....	171

VI.1.1 OS PAPÉIS IMUNOBIÓTICO E PSICOBÍÓTICO DA <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 NOS CONTEXTOS DA RETOCOLITE ULCERATIVA E DO ESTRESSE CRÔNICO	171
VI.1.2 OS TRATAMENTOS COM A <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 OU COM O CITALOPRAM REGULARAM A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS IMUNES, NEUROENDÓCRINAS E DA BARREIRA EPITELIAL, REDUZINDO A PERMEABILIDADE INTESTINAL NOS CONTEXTOS DO ESTRESSE, DA COLITE E DO ESTRESSE COM COLITE	174
VI.1.3 OS TRATAMENTOS COM A <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 OU COM O CITALOPRAM IMUNOMODULARAM E ALTERARAM A EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES E DE METABOLIZADORES DAS MONOAMINAS NO HIPOCAMPO, IMPACTANDO POSITIVAMENTE NA COGNIÇÃO NOS CONTEXTOS DO ESTRESSE, DA COLITE E DO ESTRESSE COM COLITE	180
VI.2. CONCLUSÕES.....	186
VI.3. PERSPECTIVAS.....	187
VI.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A composição da microbiota normal ao longo do intestino é dependente de vários fatores ambientais	20
Figura 2: A microbiota intestinal participa dos processos de desenvolvimento da barreira epitelial e do amadurecimento do sistema imune	23
Figura 3: Interações microbianas competitivas no intestino	24
Figura 4: Indução da produção de IgA na mucosa intestinal	26
Figura 5: Alterações na composição da microbiota intestinal são capazes de desencadear diferentes respostas adaptativas	28
Figura 6: Os mecanismos de ativação da resposta auxiliar regulatória são influenciados pela composição da microbiota e pelo tipo de alimentação	29
Figura 7: Vias de sinalização da microbiota no eixo intestino-cérebro.....	32
Figura 8: Alguns papéis imunomodulatórios da microbiota intestinal com consequências nas funções do sistema nervoso central.....	34
Figura 9: O papel da microbiota intestinal na dinâmica de neurotransmissores	36
Figura 10: O desenvolvimento da IBD envolve vários aspectos ambientais, genéticos, fisiológicos, psicossociais e microbiológicos, sendo considerada uma doença dos países desenvolvidos.....	46
Figura 11: Aspectos imunes da retocolite ulcerativa.....	48
Figura 12: Índice de desenvolvimento da colite entre os diferentes grupos experimentais	56
Figura 13: Permeabilidade intestinal entre os diferentes grupos experimentais	57
Figura 14: Tamanho dos cólons dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental	58
Figura 15: Aspectos histopatológicos dos cólons dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais	59
Figura 16: Áreas de lesão da mucosa colônica dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais	60
Figura 17: Imunomodulação da mucosa colônica dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental.....	61
Figura 18: Mecanismos imunes associados ao MDD.....	70
Figura 19: Mecanismos imunes associados à ansiedade	71
Figura 20: A <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 aumentou a sociabilidade dos camundongos após 21 dias de contenção forçada	78
Figura 21: A <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 reduziu a ansiedade dos camundongos após 21 dias de contenção forçada.....	79
Figura 22: A <i>W. paramesenteroides</i> WpK4 reduziu o comportamento tipo-depressivo dos camundongos após 14 e 21 dias de contenção forçada.....	79
Figura 23: Imunomodulação do hipocampo dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental.....	80
Figura 24: Grupos controles e experimentais estabelecidos no ensaio de estresse crônico combinado com o de colite	89

Figura 25: Desenho experimental do ensaio de estresse crônico combinado com o de colite	90
Figura 26: Permeabilidade intestinal dos camundongos fêmeas pertencentes a cada grupo experimental.....	96
Figura 27: Permeabilidade intestinal dos camundongos machos pertencentes a cada grupo experimental.....	97
Figura 28: Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos fêmeas tratados com Citalopram.....	98
Figura 29: Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos fêmeas tratados com a <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	99
Figura 30: Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos machos tratados com Citalopram.....	101
Figura 31: Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos machos tratados com a <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	102
Figura 32: Infiltrado inflamatório nos cólons dos camundongos fêmeas pertencentes a cada grupo experimental.....	104
Figura 33: Infiltrado inflamatório nos cólons dos camundongos machos pertencentes a cada grupo experimental.....	104
Figura 34: Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos fêmeas tratados com Citalopram.....	106
Figura 35: Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos fêmeas tratados com a <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	108
Figura 36: Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos machos tratados com Citalopram.....	110
Figura 37: Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos machos tratados com a <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	112
Figura 38: Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos fêmeas tratados com Citalopram.....	114
Figura 39: Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos fêmeas tratados com a <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	115
Figura 40: Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos machos tratados com Citalopram.....	117
Figura 41: Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos machos tratados com a <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	118
Figura 42: Imobilidade dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram.....	136
Figura 43: Imobilidade dos camundongos fêmeas tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	137
Figura 44: Imobilidade dos camundongos machos tratados com Citalopram.....	137
Figura 45: Imobilidade dos camundongos machos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	138
Figura 46: Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram	140
Figura 47: Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	141
Figura 48: Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram.	142

Figura 49: Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos machos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	143
Figura 50: Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram	145
Figura 51: Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram	146
Figura 52: Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	147
Figura 53: Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	148
Figura 54: Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram	149
Figura 55: Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram.....	150
Figura 56: Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos machos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	151
Figura 57: Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos machos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	152
Figura 58: Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram	154
Figura 59: Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram	155
Figura 60: Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	156
Figura 61: Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	157
Figura 62: Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram.....	158
Figura 63: Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram	159
Figura 64: Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos machos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4	160
Figura 65: Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos machos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4.....	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos e diferentes desafios e tratamentos.....	52
Tabela 2: Primers e condições de amplificação utilizados neste trabalho	55
Tabela 3: Grupos e diferentes tratamentos com <i>Weissella paramesenteroides</i> WpK4 e/ou estresse crônico.....	74
Tabela 4: Primers e condições de amplificação utilizados neste trabalho	77
Tabela 5: Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da imunidade	92
Tabela 6: Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas do sistema enteroendócrino.....	94
Tabela 7: Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da barreira epitelial.	95
Tabela 8: Resumo dos resultados: Citalopram - Permeabilidade intestinal e moléculas da barreira epitelial.....	119
Tabela 9: Resumo dos resultados: WpK4 - Permeabilidade intestinal e moléculas da barreira epitelial.....	120
Tabela 10: Resumo dos resultados: Citalopram - Infiltrado inflamatório e moléculas imunes..	121
Tabela 11: Resumo dos resultados: WpK4 - Infiltrado inflamatório e moléculas imunes	122
Tabela 12: Resumo dos resultados: Citalopram - Moléculas enteroendócrinas	123
Tabela 13: Resumo dos resultados: WpK4 - Moléculas enteroendócrinas	123
Tabela 14: Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da imunidade	133
Tabela 15: Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de fatores, transportadores e receptores neuronais	134
Tabela 16: Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da barreira epitelial	135
Tabela 17: Resumo dos resultados: Cita – Ensaios de suspensão pela cauda e nado forçado e moléculas imunes.....	162
Tabela 18: Resumo dos resultados: WpK4 – Ensaios de suspensão pela cauda e nado forçado e moléculas imunes.....	163
Tabela 19: Resumo dos resultados: Cita – Moléculas metabolizadoras e transportadoras de monoaminas	164
Tabela 20: Resumo dos resultados: WpK4 – Moléculas metabolizadoras e transportadoras de monoaminas.	165
Tabela 21: Resumo dos resultados: Cita – Moléculas estruturais	166
Tabela 22: Resumo dos resultados: WpK4 – Moléculas estruturais	166

ABREVIATURAS

1. MOLÉCULAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
99mTc	radioisótopo tecnécio
Actb	beta actina
Ahr	receptores aril-hidrocarbonetos – do inglês <i>aryl hydrocarbon receptors</i>
AID	citidina desaminase - do inglês <i>activation-induced cytidine deaminase</i>
Aim2	<i>absent in melanoma 2</i>
ALDH	aldeído desidrogenase – do inglês <i>aldehyde dehydrogenase</i>
ATF-2	ativador do fator de transcrição 2 – do inglês <i>activation of the transcription factor 2</i>
BAFF	fator de ativação de células B – do inglês <i>B-cell-activating factor</i>
Bcl6	<i>B cell leukemia/lymphoma 6</i>
Bdnf	fator neurotrófico derivado do cérebro - do inglês <i>brain derived neurotrophic factor</i>
BH4	Tetraidrobiopterina
CD103	<i>cluster of differentiation 103</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD40	<i>cluster of differentiation 40</i>
Cldn1	claudina 1
Cldn5	claudina 5
CRAMP	peptídeos antimicrobianos - do inglês <i>cathelicidin-related antimicrobial peptide</i>
CFR	<i>corticotropin-releasing factor</i>
Crybb1	cristalina b1 - do inglês <i>Crystallin, beta B1</i>
CX3CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
Cxcl1	quimiocina ligante ao motivo 1 C-X-C - do inglês <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
Cxcl9	quimiocina ligante ao motivo 9 C-X-C - do inglês <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>
Dat1	transportador de dopamina - do inglês <i>dopamine transporter 1</i>
Ddc	descarboxilase da dopamina - do inglês <i>dopa decarboxylase</i>
DSS	dextrano sulfato de sódio
DTPA	ácido dietilenotriaminopentacético – do inglês <i>Diethylenetriamine Pentaacetic Acid</i>
ELK-1	<i>ETS Transcription Factor</i>
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
GABA	ácido γ -aminobutírico – do inglês <i>γ aminobutyric acid</i>
Gapdh	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gata3	<i>GATA binding protein 3</i>
GPR43	receptores acoplados à proteína G 43 – do inglês <i>G-protein-coupled receptor 43</i>
GPR109a	receptores acoplados à proteína G 109a – do inglês <i>G-protein-coupled receptor 109a</i>
Grin1	receptor de glutamato 1 - do inglês <i>glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)</i>
Grin2a	receptor de glutamato 2a - do inglês <i>glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)</i>
Grin2b	receptor de glutamato 2b - do inglês <i>glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)</i>
I3S	indoxil-3-sulfato – do inglês <i>indoxyl-3-sulfate</i>
I3S	indoxil-3-sulfato

Iald	indol-3-aldeído - do inglês <i>indole-3-aldehyde</i>
Ido1	indoleamina 2,3 dioxigenase - do inglês <i>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>
Ifnar1	receptor de interferon alfa e beta 1 - do inglês <i>interferon (alpha and beta) receptor 1</i>
Ifng	interferon gama
IgA	imunoglobulina do tipo A
Ikβa	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, α</i>
IL-1b	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-9	interleucina 9
IL-10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
IL-17a	interleucina 17A
IL-18	interleucina 18
IL-21	interleucina 21
IL-22	interleucina 22
IPA	ácido indol-3-propiónico - do inglês <i>indole-3-propionic acid</i>
IRAK1	interleukin1receptor-associated kinase 1
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
Miat	transcrito associado ao infarto do miocárdio - do inglês <i>myocardial infarction associated transcript</i>
Mpb	<i>myelin basic protein</i>
Muc2	mucina do tipo 2
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) interferon-regulatory factor (IRF)</i>
Mylk	miosina, quinase de cadeia leve - do inglês <i>myosin, light polypeptide kinase</i>
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
NaCl	cloreto de sódio
Nfkb1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1</i>
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
Nlrp3	<i>NLR family, pyrin domain containing 3</i>
Nlrp6	<i>NLR family, pyrin domain containing 6</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
Nos2	óxido nítrico sintetase 2 - do inglês <i>nitric oxide synthase 2</i>
Ocln	ocludina
p11	proteína S100-A10
Plp1	proteína proteolipídica 1 - do inglês <i>proteolipid protein (myelin) 1</i>
PSA	polissacarídeo A
RA	ácido retinoico – do inglês <i>retinoic acid</i>
REG3γ	<i>regenerating islet-derived protein 3γ</i>
Rorc	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RORγt	<i>RAR related orphan receptor C</i>
SCFA	ácidos graxos de cadeia curta – do inglês <i>short-chain fatty acids</i>

Sert1	transportador de serotonina tipo 1 - do inglês <i>serotonin transporter 1</i>
Slc18a2	<i>solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2</i>
Stat3	sinal transdutor e ativador da transcrição 3 - do inglês <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Stat4	sinal transdutor e ativador da transcrição 4 - do inglês <i>signal transducer and activator of transcription 4</i>
Stat5b	sinal transdutor e ativador da transcrição 5b - do inglês <i>signal transducer and activator of transcription 5b</i>
Stat6	sinal transdutor e ativador da transcrição 6 - do inglês <i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
Tbx21	<i>T-box 21</i>
Tdo2	triptofano 2,3-dioxigenase - do inglês <i>tryptophan 2,3-dioxygenase</i>
Tgfb1	<i>transforming growth factor, beta 1</i>
Th	tirosina hidrolase
Tjp1	<i>tight junction protein 1</i>
Tjp2	<i>tight junction protein 2</i>
TLR	receptores do tipo <i>toll</i> - do inglês <i>toll-like receptors</i>
Tnfa	fator de necrose tumoral tipo α - do inglês <i>tumor necrosis factor α</i>
Tph1	triptofano hidrolase do tipo 1
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

2. OUTRAS ABREVIÇÕES

AD	desordens de ansiedade – do inglês <i>anxiety disorders</i>
ASD	espectro autista - do inglês <i>autism spectrum disorder</i>
CEBIO	centro de bioterismo
células LTi	células indutoras do tecido linfóide - do inglês <i>lymphoid tissue inducer cells</i>
células Thf	células T auxiliares do tipo folicular - do inglês <i>t follicular helper cells</i>
CETEA	comitê de ética em experimentação animal
COBEA	colégio brasileiro de experimentação animal
DAI	índice de desenvolvimento da colite – do inglês <i>disease activity index</i>
DAMP	padrões moleculares associados ao dano induzido pelo estresse – do inglês <i>damage-associated molecular patterns</i>
EAE	encefalomielite autoimune experimental - do inglês <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
H&E	hematoxilina e eosina
HPA	eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HSP	proteína do choque térmico - do inglês <i>heat shock protein</i>
IBD	doença inflamatória intestinal – do inglês <i>inflammatory bowel disease</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IEL	linfócitos intraepiteliais – do inglês <i>intraepithelial lymphocytes</i>
ILC	células linfóides inatas - do inglês <i>innate lymphoid cells</i>
LPS	lipopolissacarídeo
MAMP	padrões moleculares associados aos microrganismos – do inglês <i>microbial associated molecular patterns</i>
MDD	depressão maior – do inglês <i>major depressive disorder</i>
MS	separação materna – do inglês <i>maternal separation</i>
NK	células T citotóxicas – do inglês <i>natural killer</i>

PANDAS	desordens neuropsiquiátricas autoimunes pediátrica associada à infecção estreptococal – do inglês <i>pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection</i>
PBS	salina tamponada - do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
pTi	células T periféricas imaturas
Teff	células T efetoras - do inglês <i>T effector cells</i>
Th1	resposta adaptativa do tipo 1
Th2	resposta adaptativa do tipo 2
Th9	resposta adaptativa do tipo 9
Th17	resposta adaptativa do tipo 17
Th22	resposta adaptativa do tipo 22
Treg	resposta adaptativa do tipo regulatória
tTreg	células T regulatórias oriundas do timo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VSL3	coquetel probiótico comercial

3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ct	camundongos controle, sem desafio e tratamento
WpK4	camundongos tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4
Cita	camundongos tratados com Citalopram
CtStrs ou Stress	camundongos estressados
WpK4Strs ou WpK4Stress	camundongos estressados tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4
CitaStrs	camundongos estressados tratados com Citalopram
DSS	camundongos com colite
WpK4DSS	camundongos com colite e tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4
CitaDSS	camundongos com colite e tratados com Citalopram
WpK4StrsDSS	camundongos estressados com colite tratados com <i>W. paramesenteroides</i> WpK4
CitaStrsDSS	camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram
StrsDSS	camundongos estressados com colite

SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	porcentagem
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar
cm	centímetro
g	grama
hs	horas
L	litro
M	molar
MBq	megabecquerel
mg	miligrama
mg/kg	miligrama/quilograma
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
ng	nanograma
nM	nanomolar
°C	graus Celcius
OD	<i>Optical Density</i>
s	segundo
U	unidade
UFC/mL	unidades formadoras de colônia/mililitros
x g	gravidade
µmols	picomols

RESUMO

A colonização pela microbiota intestinal é um processo importante para o desenvolvimento do intestino, promovendo a maturação do sistema imune da mucosa, da fisiologia digestiva e do sistema nervoso entérico. Recentemente, tem sido observado que certos quadros psicopatológicos possam estar associados à disbiose da microbiota intestinal, indicando uma comunicação entre o intestino e o cérebro. Por meio de mecanismos humorais e não-humorais, a administração de probióticos geralmente é capaz de interferir positivamente na mucosa intestinal, modulando diretamente ou indiretamente a microbiota para um estado normal. Neste sentido, foi avaliado se a *Weissella paramesenteroides* WpK4 possuía efeitos benéficos nos contextos da colite ulcerativa e do estresse crônico. Nestes ensaios, foi observado que a ingestão da bactéria melhorou os aspectos de saúde dos camundongos com colite, reduzindo a perda de peso e a permeabilidade intestinal, além de ter melhorado os aspectos histopatológicos do cólon. Já nos camundongos estressados, o consumo da bactéria foi associado à redução dos comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo. Em ambos os ensaios, o papel benéfico da *W. paramesenteroides* WpK4 foi relacionado à sua capacidade imunomodulatória, reduzindo respostas inflamatórias. Em um modelo animal mais complexo, camundongos machos e fêmeas com colite, estressados ou estressados com colite foram tratados com a bactéria ou com o Citalopram, buscando evidenciar os papéis destes agentes nos processos de regulação da permeabilidade intestinal, da resposta imunológica e da dinâmica de neurotransmissores. De uma forma geral, a WpK4 e o Citalopram exerceram seus papéis benéficos no cólon dos camundongos por meio da imunomodulação de MYLK, reduzindo a sua expressão de tal forma a promover menor permeabilidade intestinal. No hipocampo destes animais, o papel imunomodulador destes agentes parece ter determinado maior expressão de *Bdnf* e de *p11*, melhorando os processos cognitivos dos camundongos com colite, estressados e estressados com colite. Neste sentido, é possível afirmar que a *W. paramesenteroides* WpK4 e o Citalopram exerceram seus papéis no eixo intestino-cérebro por meio de suas atividades imunomodulatórias com consequências em diversas vias metabólicas.

CAPÍTULO I

Introdução

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1 O INTESTINO, A MICROBIOTA, O SISTEMA IMUNE, O CÉREBRO E O COMPORTAMENTO

I.1.1.1 A microbiota e o desenvolvimento da mucosa intestinal

A microbiota intestinal é constituída por uma complexa comunidade de organismos pertencentes aos três domínios da vida (*Archea*, *Bacteria* e *Eukaria*), além dos vírus que, juntos, participam ativamente no desenvolvimento da mucosa intestinal (Sommer e Bäckhed, 2013; Donaldson *et al.*, 2016). A partir do nascimento, o intestino estéril é exposto a uma grande diversidade de microrganismos, sendo primeiramente colonizado por bactérias anaeróbias facultativas como as enterobactérias, os lactobacilos e os estreptococos, os quais reduzem as concentrações locais de oxigênio, permitindo, em seguida, a colonização por anaeróbios obrigatórios como as bifidobactérias, os bacteroides, os clostrídios e as eubactérias (Collado *et al.*, 2012).

Uma vez estabelecida, a microbiota normal ou saudável desenvolve, aumentando a sua diversidade até um padrão adulto constituído por grupos taxonômicos principais, os quais são distribuídos em nichos específicos de acordo com os diferentes ambientes fisiológicos intestinais. Bacteroides, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia são os filos predominantes onde gradientes químicos e de nutrientes, distintas concentrações de oxigênio, variações do pH, além das atividades imunes compartimentalizadas são os principais fatores determinantes da distribuição diferencial desses táxons ao longo da mucosa intestinal (Donaldson *et al.*, 2016). Bactérias pertencentes às famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae, por exemplo, possuem metabolismo anaeróbio facultativo, resistência aos sais biliares e crescem preferencialmente em pH ácido sendo, por esse motivo, predominantes nas regiões iniciais do tubo digestivo (**Figura 1**). Por outro lado, o cólon, a região mais anaeróbia do intestino, é caracterizado pela presença de espécies pertencentes às famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae e Ruminococcaceae cujo metabolismo energético é predominantemente fermentativo (**Figura 1**).

Em termos numéricos, o intestino adulto é colonizado por cerca de 10^{13} células bacterianas, com genomas combinados que alcançam mais de 5 milhões de genes, superando em duas ordens

de magnitude a quantidade total de genes humanos (Xu e Gordon, 2003; Sommer e Bäckhed, 2013). Essa comunidade complexa, constituída por mais de 40 espécies principais, possui papel importante na biologia do hospedeiro, como facilitar a digestão de polissacarídeos e de produzir vitaminas essenciais, além de participar do desenvolvimento e diferenciação do epitélio da mucosa intestinal e do sistema imune (Smith *et al.*, 2007; Sommer e Bäckhed, 2013).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:

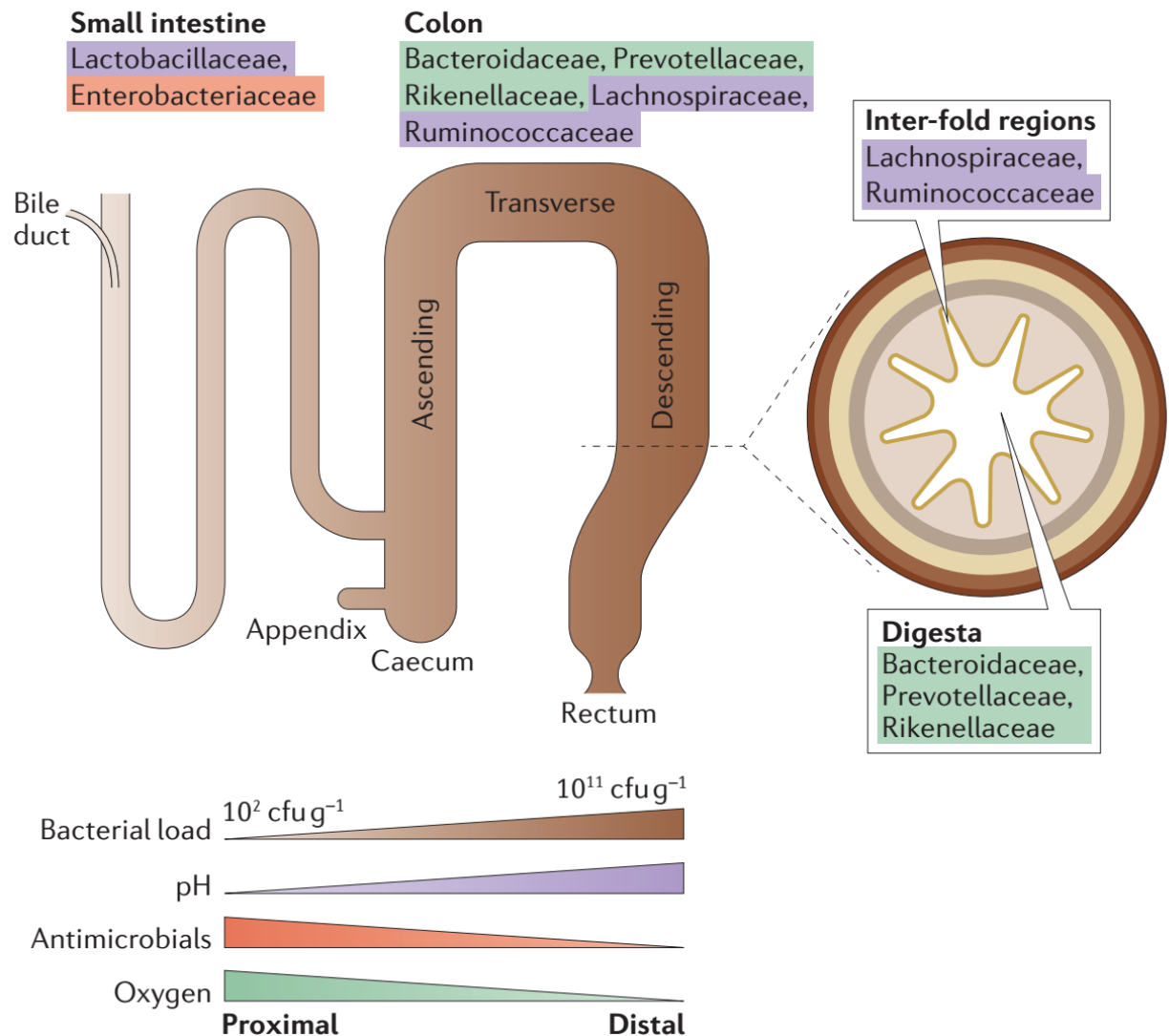


Figura 1. A composição da microbiota normal ao longo do intestino é dependente de vários fatores ambientais. A distribuição e a composição da microbiota intestinal dependem de vários fatores fisiológicos, incluindo variações de pH, de oxigênio, além de substâncias antimicrobianas. No intestino delgado (*small intestine*) cujas características são a presença de uma grande

quantidade de agentes antimicrobianos (*antimicrobials*), baixo pH e uma maior tensão de oxigênio ocorre o predomínio de bactérias pertencentes às famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae, cujas adaptações fisiológicas as permitem colonizar esta porção intestinal. Em contrapartida, nas partes finais do intestino, onde a menor quantidade de antimicrobianos, o maior pH e a menor tensão de oxigênio favorecem o predomínio de Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae e Ruminococcaceae. Traduções: carga bacteriana (*bacterial load*), duto biliar (*bile duct*), cólon ascendente (*ascending*), cólon transversal (*transverse*), cólon descendente (*descending*), apêndice intestinal (*appendix*), ceco intestinal (*caecum*), reto (*rectum*), regiões das dobras do cólon (*inter-folds regions*) e oxigênio (*oxygen*). **Retirado de Donaldson et al., 2016.**

No período pré-natal, a mucosa do intestino delgado é caracterizada pela ausência das criptas e pela baixa proliferação epitelial (**Figura 2**). A partir do nascimento, a barreira epitelial é constituída apenas pelas imunoglobulinas A (IgA) maternas obtidas da amamentação. Na medida em que a colonização bacteriana intestinal ocorre, processos fisiológicos são desencadeados visando aumentar esta barreira a fim de protegê-la de eventuais agentes patogênicos. Neste contexto, é desencadeada a proliferação celular que determina eventos chave como a diferenciação de certas populações em células caliciformes, as quais passam a produzir muco sobre a mucosa, e a produção de peptídeos antimicrobianos (CRAMP – do inglês *Cathelicidin-related antimicrobial peptide*) por aquelas ainda indiferenciadas. A partir disso, a tolerância oral começa a ser estabelecida com a migração de linfócitos B produtores de IgA secretada e pela síntese do micro RNA miR-146a, cujo principal papel é inibir a tradução de sinalizadores dos *Toll-like receptors* (TLR), como por exemplo o IRAK1 (do inglês *Interleukin-1-receptor-associated kinase 1*), reduzindo a expressão de TLR4 (do inglês *Toll-like receptors 4*) e estimulando a síntese de inibidores de NF- κ B, como o I κ B α (**Figura 2**). Neste cenário, o limiar de ativação da resposta inata local é aumentado drasticamente, reduzindo a capacidade da resposta imune aos lipopolissacarídeos bacterianos e a outros estímulos pró-inflamatórios, determinando na tolerância imunológica aos microrganismos comensais e aos alimentos ingeridos (Renz et al., 2012).

A partir da segunda semana de nascimento, as criptas intestinais começam a ser formadas, diferenciando as células intestinais basais pluripotentes em células de Paneth, as quais passam a produzir outras classes de antimicrobianos, as α -defensinas e o REG3 γ (do inglês *Regenerating islet-derived protein 3 γ*), por exemplo. Neste mesmo contexto, o número e a atividade das células caliciformes aumentam, produzindo uma camada de muco mais espessa. Além disso, o tecido linfóide secundário formado pelas placas de Peyer e pelos linfonodos mesentéricos começa a amadurecer quando os linfócitos imaturos indutores do tecido linfóide (células LTi – do inglês

Lymphoid tissue inducer cells) e as células T deixam o fígado e o timo, respectivamente, para colonizar estas estruturas. Concomitantemente, surgem as células M, facilitando o transporte de antígenos luminais para as placas de Peyer além disso, os macrófagos CX₃CR1⁺ e células dendríticas CD103⁺ intraepiteliais passam a colonizar a *lamina propria* para fagocitar e apresentar antígenos às células humorais no linfonodo mesentérico, estimulando diversas respostas auxiliares e regulatórias (Renz *et al.*, 2012 - **Figura 2**).

Além de estimular a produção de muco pelas células caliciformes, de defensinas pelas células de Paneth, de IgA secretado pelos plasmócitos e de estimular o amadurecimento de células T, a microbiota intestinal é capaz de agir mais diretamente na barreira epitelial, competindo por sítios de adesão e por nutrientes com microrganismos potencialmente patogênicos (**Figura 3**). Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, por exemplo, expressam um tipo de *pili* para a adesão ao muco que lhes permitem colonizar o intestino de forma efetiva, excluindo competitivamente a instalação de microrganismos patogênicos (Kankainen *et al.*, 2009; Kondepudi *et al.*, 2012; Reunanen *et al.*, 2012). Certas bactérias pertencentes à família Lachnospiraceae também possuem este papel, reduzindo a colonização e a produção de toxinas por *Clostridium difficile* (Reeves *et al.*, 2012), assim como alguns representantes de Porphyromonadaceae que reduziram a colite induzida por *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium (Ferreira *et al.*, 2011), além de *Barnesiella intestihominis* que reduziu a capacidade de colonização de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Ubeda *et al.*, 2013). Também tem sido observada a competição por nutrientes entre microrganismos comensais e patogênicos, sendo a exclusão competitiva de *Bacteroides thetaiotaomicron* sobre *Citrobacter rodentium* por carboidratos de origem vegetal um exemplo bem documentado (Kamada *et al.*, 2012).

Outro mecanismo de manutenção da barreira epitelial envolve a produção de substâncias antagonistas pela microbiota intestinal, as quais interferem na adesão e na síntese de toxinas por bactérias patogênicas. Um exemplo deste mecanismo é a secreção de fatores solúveis por *B. thetaiotaomicron*, os quais reprimem a produção de toxinas pela *Escherichia coli* enterohemorrágica (de Sablet *et al.*, 2009). Outros trabalhos reportam que as frações sobrenadantes livre de células oriundas de *L. delbrueckii* limitam a aderência de *C. difficile* às células epiteliais, reduzindo a citotoxicidade (Douillard *et al.*, 2013) e que *Bifidobacterium* spp. é capaz de secretar substâncias antimicrobianas que aumentam a proteção contra a infecção por *E. coli*, *C. rodentium* e *C. difficile* (Trejo *et al.*, 2006; Buffie e Pamer, 2013).

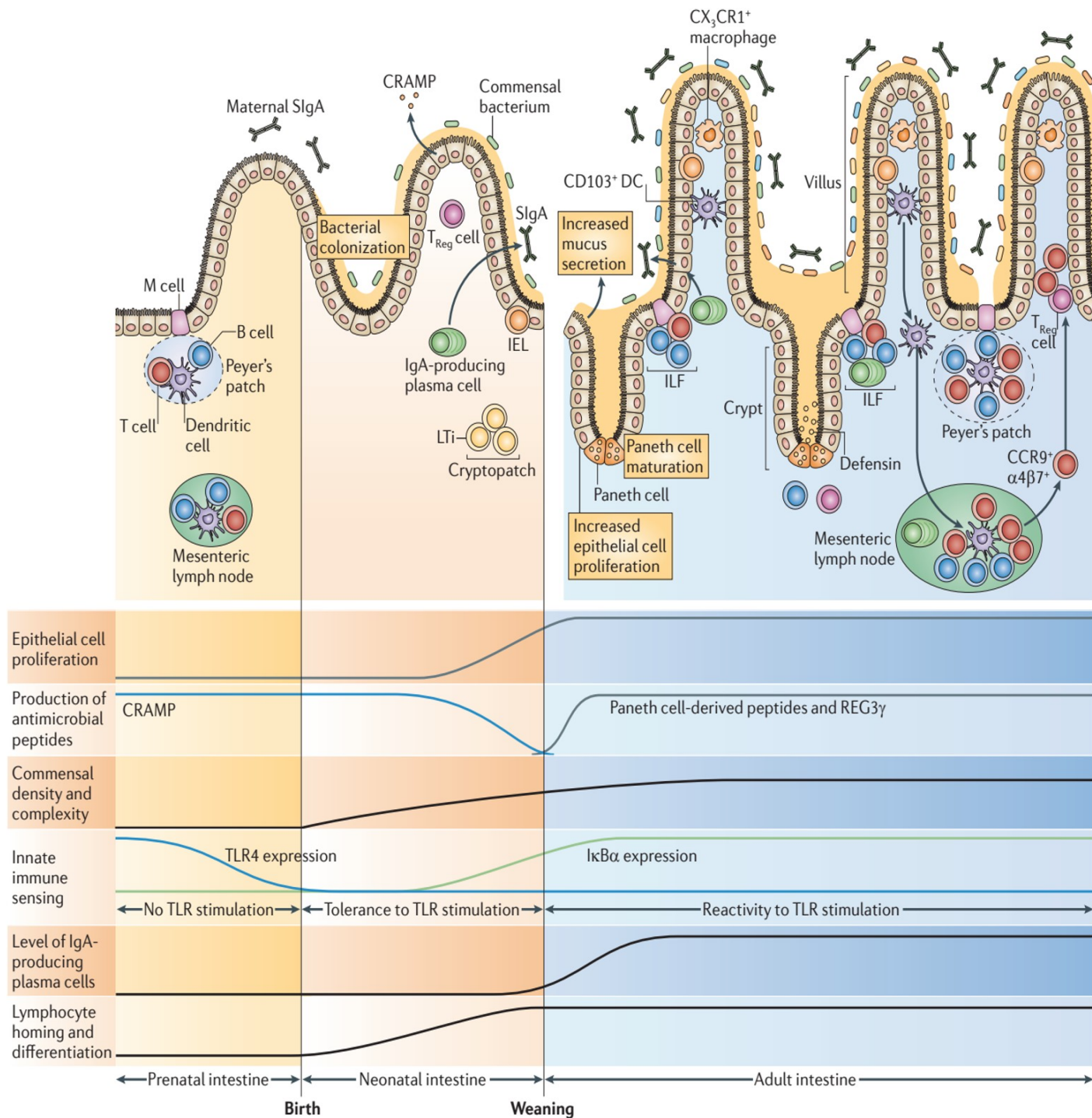


Figura 2. A microbiota intestinal participa dos processos de desenvolvimento da barreira epitelial e do amadurecimento do sistema imune. A partir da colonização intestinal pela microbiota o tecido epitelial sofre diferenciações, criando células especializadas como as células caliciformes, as células de Paneth e as células M, as quais contribuem para manutenção da barreira epitelial. Além disso, a tolerância oral e o sistema linfóide são dirigidos pela colonização da

microbiota. Traduções: Proliferação celular epitelial (*Epithelial cell proliferation*), produção de peptídeos antimicrobianos (*production of antimicrobial peptides*), densidade e complexidade da microbiota intestinal (*commensal density and complexity*), sensibilidade do sistema imune inato (*innate immune sensing*), nível de plasmócitos produtores de IgA (*level of IgA-producing plasma cells*), grau de colonização e diferenciação dos linfócitos (*lymphocyte homing and differentiation*), intestino pré-natal (*prenatal intestine*), intestino neonatal (*neonatal intestine*), intestino adulto (*adult intestine*), sem estimulação do TLR (*no TLR stimulation*), tolerância para o estímulo do TLR (*tolerance to TLR stimulation*), reatividade para o estímulo do TLR (*reactivity to TLR stimulation*), expressão do TLR4 (*TRL4 expression*), expressão do $I\kappa\beta\alpha$ (*I\kappa\beta\alpha expression*), peptídeos e REG3 γ derivados das células de Paneth (*Paneth cell-derived peptides and REG3*), células M (*M cells*), plasmócito (*B cell*), célula T (*T cell*), célula dendrítica (*dendritic cell*), placa de Peyer (*Peyer's patch*), linfonodo mesentérico (*mesenteric lymph node*), IgA materno secretado (*maternal SIgA*), bactéria comensal (*commensal bacterium*), plasmócito produtor de IgA (*IgA-producing plasma cell*), secreção de muco aumentada (*increased mucus secretion*), maturação das células de Paneth (*Paneth cell maturation*), proliferação celular epitelial aumentada (*increased epithelial cell proliferation*), cripta (*crypt*), vilo (*villus*), defensina (*defensin*), célula T regulatória (*Treg cell*), nascimento (*birth*), amamentação (*weaning*). **Retirado de Renz et al., 2012.**

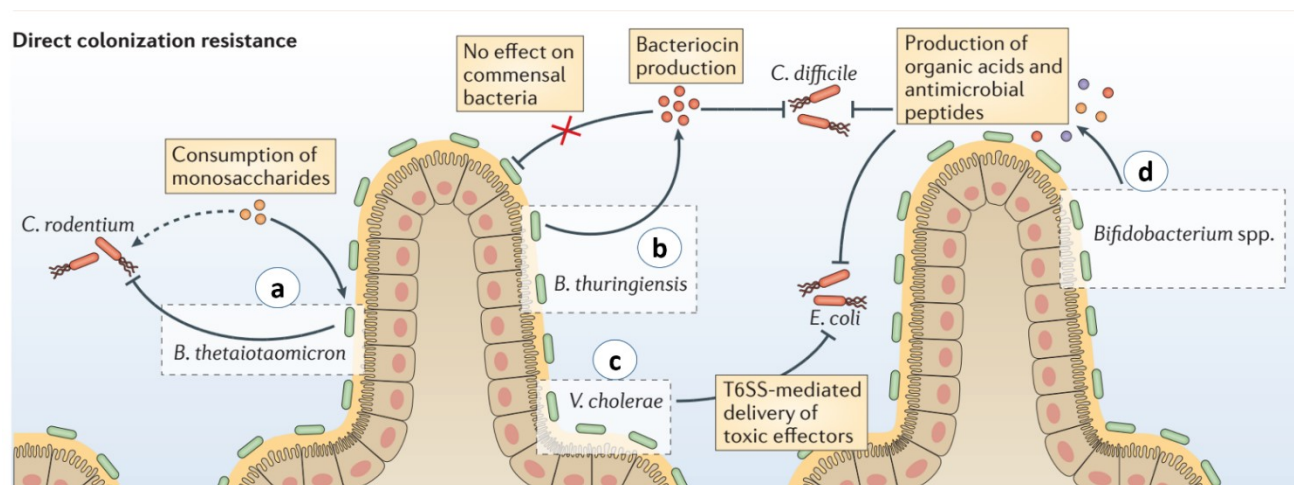


Figura 3. Interações microbianas competitivas no intestino. a) *Bacteroides thetaiotaomicron* compete diretamente com *Citrobacter rodentium* por monossacarídeos. **b)** *Bacillus thuringiensis* produz bacteriocinas que impedem a colonização intestinal por *Clostridium difficile*. **c)** *Vibrio cholerae* antagoniza *Escherichia coli* via sistema de secreção do tipo VI (T6SS). **d)** *Bifidobacterium* spp. antagoniza *C. difficile* pela produção de peptídeos antimicrobianos. Traduções: Consumo de monossacarídeos (*consumption of monosaccharides*), sem efeito sobre as bactérias comensais (*no effect on commensal bacteria*), produção de bacteriocina (*bacteriocin production*), produção de ácidos orgânicos e peptídeos antimicrobianos (*production of organic acids and antimicrobial peptides*), entrega de efetores tóxicos mediado por T6SS, (*T6SS-mediated delivery of toxic effectors*). **Retirado de Buffie e Pamer, 2013.**

1.1.1.2 O papel imunomodulador da microbiota intestinal

Em um ambiente onde transitam uma infinidade de antígenos luminais, a microbiota intestinal modula o desenvolvimento do sistema imune local de tal forma a manter equilíbrio nas respostas imunes sem desencadear processos inflamatórios exacerbados (Renz *et al.*, 2012). Neste contexto, a homeostase é alcançada por uma grande variedade de mecanismos imunomodulatórios que culminam na produção de IgA e de respostas mediadas por células T auxiliares regulatórias.

A IgA produzida e secretada pelos plasmócitos ligam-se aos microrganismos residentes, aos vários componentes alimentares e a outros antígenos luminais de forma a cobri-los e aglutiná-los, impedindo a interação direta com o epitélio intestinal (Pabst, 2012; Roche *et al.*, 2015) e, consequentemente, evitar que estímulos potencialmente prejudiciais sejam desencadeados na mucosa, mantendo a integridade da barreira epitelial. Ao longo do tempo, o hospedeiro tem contato a diferentes quantidades e tipos de antígenos, como aqueles advindos de pequenas variações da composição da microbiota e situações de disbiose. Neste contexto, o sistema imune local tem por finalidade balancear estas modificações, produzindo maior diversidade de IgA com uma maior afinidade aos novos antígenos circulantes (Honda e Littman, 2016). Para isso, as populações de linfócitos B locais sofrem hipermutações somáticas de tal forma a produzirem novos isotipos com maior afinidade. Este processo de diversificação ocorre dependente e independentemente da participação das células T (**Figura 4**). Quando os macrófagos ou as células dendríticas da *lamina propria* fagocitam os novos antígenos, estas células migram para as placas de Peyer para apresentá-los aos linfócitos T CD4⁺ residentes, estimulando-os a diferenciarem em células T auxiliares do tipo folicular (T_{hf}) que passam a expressar CD40 e IL-21. Neste contexto, as células B passam a sintetizar uma citidina desaminase (AID - do inglês *Activation-Induced cytidine deaminase*) que desencadeia a mudança dos isótipos de IgA, produzindo imunoglobulinas de alta afinidade aos antígenos indutores (Lindner *et al.*, 2015). Em contrapartida, a síntese de IgA independente das células T ocorre, predominantemente, na *lamina propria* e nos folículos linfóides isolados, quando as células dendríticas, produtoras do fator de ativação de células B (BAFF – do inglês *B-cell-Activating Factor*) e seu homólogo APRIL, apresentam os antígenos diretamente às células B, desencadeando a expressão de AID e a produção de imunoglobulinas de baixa afinidade (**Figura 4**). A conjunção das duas vias mantém a diversidade da comunidade bacteriana, promovendo o

mutualismo com o hospedeiro através da restrição do desencadeamento de processos inflamatórios (Kawamoto *et al.*, 2014).

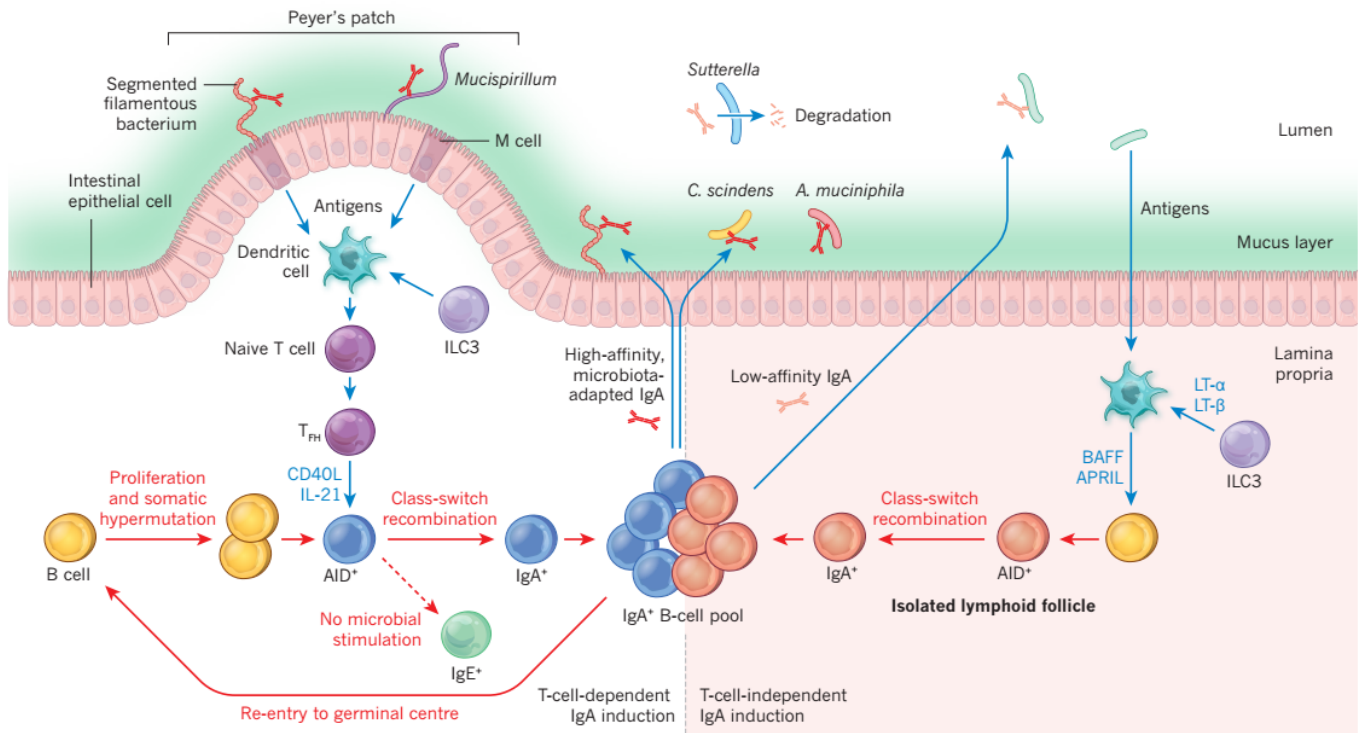


Figura 4. Indução da produção de IgA na mucosa intestinal. O processo de indução da síntese de IgA pode ser dependente ou independente da participação das células T. Quando dependente, os clones de plasmócitos produtores de IgA persistem por um longo período de tempo e podem entrar em um centro germinativo onde sofrem hipermutação somática para produzir IgA de alta afinidade adaptado às mudanças na composição da microbiota. Neste contexto, a IgA produzida possui grande afinidade aos antígenos apresentados e tende ser induzido por bactérias que colonizam a superfície do epitélio, como bactérias segmentadas filamentosas, *Mucispirillum*, *Clostridium scindens* e *Akkermansia muciniphila*, por exemplo. Em contrapartida, o processo independente estimula a síntese de IgA de baixa afinidade aos antígenos apresentados. Em ambas vias ocorre a participação de células linfóides inatas do tipo 3 (ILC3 – do inglês *Innate Lymphoid Cells 3*). Traduções: Célula epitelial intestinal (*intestinal epithelial cell*), bactéria filamentososa segmentada (*segmented filamentous bacterium*), antígenos (*antigens*), célula dendrítica (*dendritic cell*), célula T imatura (*naive T cell*), proliferação e hipermutação somática (*proliferation and somatic hypermutation*), mudança de isótipo (*class-switch recombination*), reentrada para o centro germinativo (*re-entry to germinal centre*), placa de Peyer (*Peyer's patch*), indução de IgA dependente de células T (*T-cell-dependent IgA induction*), IgA de alta afinidade adaptada à microbiota (*high-affinity, microbiota-adapted IgA*), degradação (*degradation*), IgA de baixa afinidade (*low-affinity IgA*), aglomerado de células B produtoras de IgA (*IgA⁺ B-cell pool*), camada de muco (*mucus layer*), folículo linfóide isolado (*isolated lymphoid follicle*), indução de IgA independente de células T (*T-cell-independent IgA induction*). **Retirado de Honda e Littman, 2016.**

Além da alteração de isotipos de IgA, quando a composição da microbiota normal é alterada, as células dendríticas e os macrófagos residentes na *lamina propria* fagocitam e migram para os tecidos linfoides associados, as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos, para apresentarem os novos antígenos às diversas subpopulações de linfócitos residentes, desencadeando diferentes respostas auxiliares de acordo com o tipo de antígeno apresentado (Powell *et al.*, 2017). Quando o antígeno é oriundo de bactérias intracelulares, por exemplo, os monócitos podem diferenciar-se em macrófagos do tipo 1, os quais estimulam a síntese de T-Bet (*T cell-specific T box transcription factor*) pelos linfócitos locais, determinando sua diferenciação em linfócitos auxiliares do tipo 1 (T_{h1} - do inglês *T helper 1*) que, por sua vez, passam a produzir IFN γ , criando um ambiente pró-inflamatório de forma a estimular a migração e a capacidade fagocítica dos macrófagos locais (**Figura 5**). Em contrapartida, quando o antígeno é oriundo de bactérias extracelulares, principalmente daquelas filamentosas segmentadas, os linfócitos imaturos passam a expressar ROR γ t (*RAR related orphan receptor C*), polarizando estas subpopulações celulares em direção a uma resposta auxiliar do tipo 17 (T_{h17} – do inglês *T helper 17*) capaz de estimular a ativação e o recrutamento de neutrófilos (**Figura 5**).

Apesar dos benefícios das respostas auxiliares nas variações da composição da microbiota e no combate à agentes infecciosos, a manutenção deste quadro por um longo período pode desencadear processos histopatológicos, determinando alterações na arquitetura da mucosa intestinal e, conseqüentemente, prejudicar a função normal do órgão. Muitas doenças da mucosa intestinal estão associadas a respostas auxiliares desreguladas, como no caso da retocolite ulcerativa, onde é mantido, persistentemente, um estado inflamatório em resposta à disbiose microbiológica. Neste contexto, várias funções normais da barreira epitelial são alteradas, permitindo o extravasamento de uma grande quantidade de antígenos para a *lamina propria* (Graff *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2012; Sajadinejad *et al.*, 2012; Triantafillidis *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2015; Zhou e Foster, 2015). Em contrapartida, a resposta do tipo auxiliar regulatória é capaz de modificar estes quadros de tal forma a restabelecer a normalidade fisiológica da mucosa. Neste sentido, tem sido observado que a resolução da inflamação passa pela alteração da dieta e pelo aumento populacional de grupos bacterianos específicos, de forma a desencadear a maturação das células T regulatórias (T_{reg}). Uma alimentação rica em fibras, por exemplo, favorece o aumento de populações de *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotaomicron* e *B. caccae*, cujos antígenos induzem a síntese de TGF- β pelas células dendríticas. Neste cenário, as células T periféricas imaturas (pT)

FOXP3⁺ são estimuladas a expressarem RORγt e IL-10, regulando as respostas inflamatórias exacerbadas. Além disso, os produtos metabólicos oriundos da fermentação de fibras alimentares pelos microrganismos pertencentes aos grupos XIVa, IV e XVIII de Clostridia aumentam a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA – do inglês *short-chain fatty acids*), os quais também estimulam o amadurecimento das células T_{reg} (Honda e Littman, 2016; **Figura 6**).

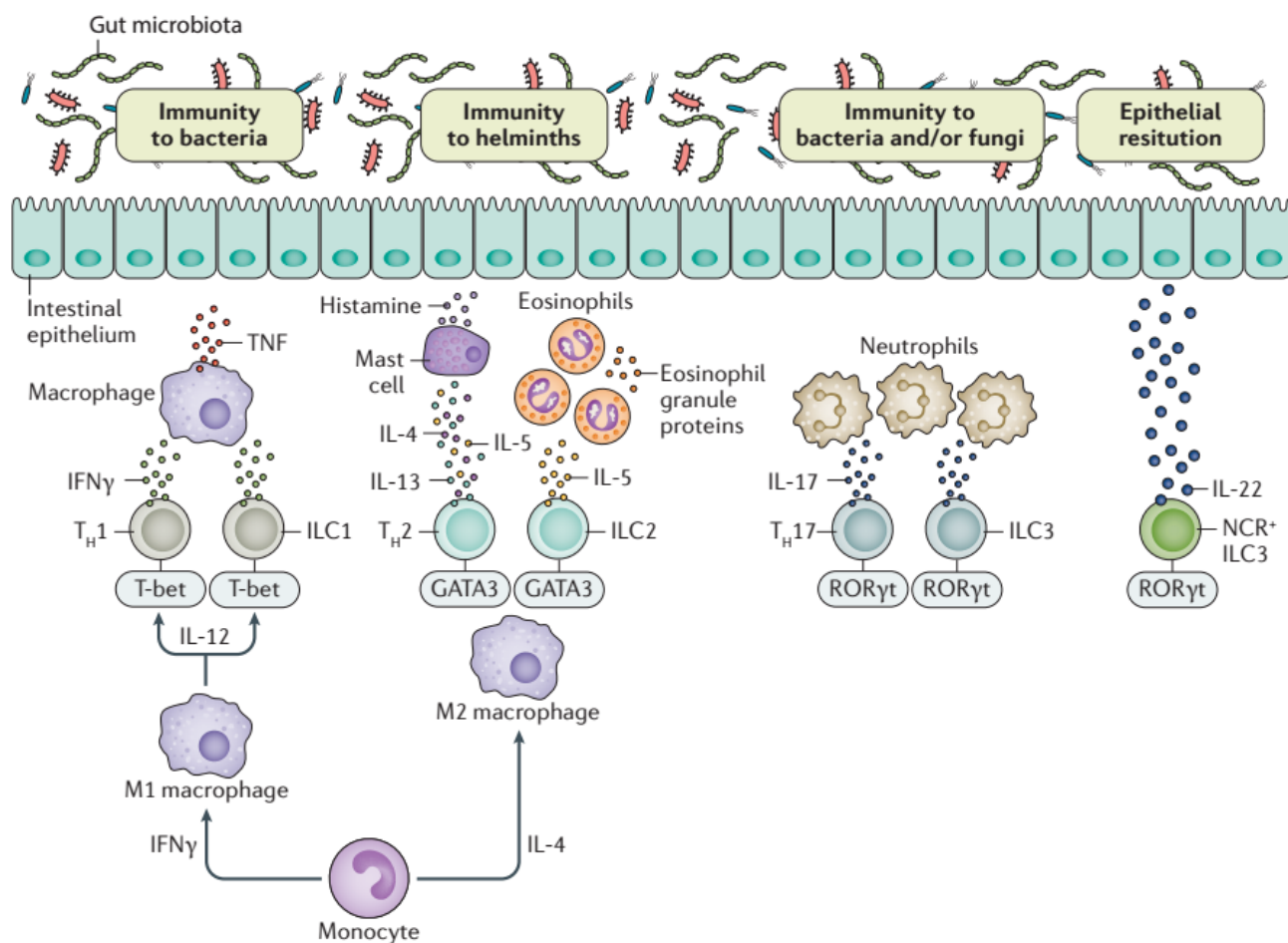


Figura 5. Alterações na composição da microbiota intestinal são capazes de desencadear diferentes respostas adaptativas. Na infecção intracelular, populações de monócitos produtores de IFN γ , estimulam a diferenciação de macrófagos tipo 1 (*M1 macrophage*) que, por sua vez, polarizam uma resposta adaptativa do tipo 1 (T_{H1}). Os monócitos estimulados por antígenos oriundos de helmintos passam a produzir IL-4 que desencadeia a diferenciação de macrófagos tipo 2 (*M2 macrophage*). Neste contexto, subpopulações de linfócitos imaturos passam a sintetizar GATA3, determinando uma resposta adaptativa do tipo 2 (T_{H2} - do inglês *T helper 2*) caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 que recrutam e ativam eosinófilos e plasmócitos. Na resposta T_{H17}, a IL-17 produzida suporta a ativação e o recrutamento de neutrófilos, enquanto que na resposta T_{H22}, a IL-22 sintetizada estimula a síntese de moléculas antimicrobianas de tal forma a reduzir a translocação bacteriana e reforçar a barreira epitelial. Traduções: Microbiota intestinal (*gut microbiota*), imunidade a bactérias (*immunity to bacteria*), imunidade a helmintos (*immunity*

to helminths), imunidade a bactérias e/ou fungos (*immunity to bacteria and/or fungi*), restituição epitelial (*epithelial resitution*), epitélio intestinal (*intestinal epithelium*), histamina (*histamine*), macrófagos (*macrophages*), monócitos (*monocytes*), eosinófilos (*eosinophils*), neutrófilos (*neutrophils*), plasmócitos (*mast cells*), células linfoides inatas (ILC - do inglês *innate lymphoid cells*). Retirado de Powell *et al.*, 2017.

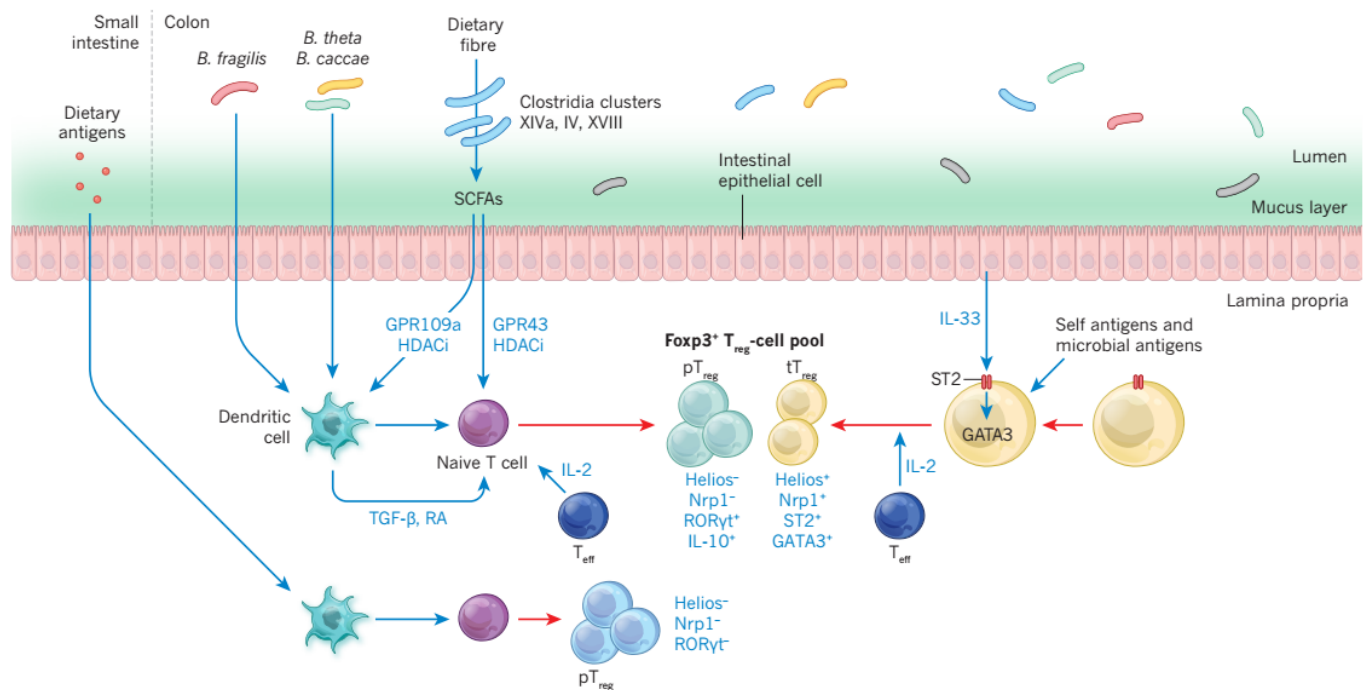


Figura 6. Os mecanismos de ativação da resposta auxiliar regulatória são influenciados pela composição da microbiota e pelo tipo de alimentação. As células T oriundas de sítios periféricos (células pT_{reg}) são estimuladas pelos antígenos da dieta, principalmente, no intestino delgado, enquanto que a indução pelos antígenos antimicrobianos ocorre, preponderantemente, no intestino grosso. As células dendríticas ao fagocitar espécies de *Bacteroides* produzem mediadores, incluindo o TGF- β e o ácido retinoico (RA – do inglês *retinoic acid*), para estimular as células pT_{reg} $ROR\gamma t^+$ $Nrp1^-$ a produzirem IL-10. Além disso, os resíduos metabólicos bacterianos também auxiliam no processo de amadurecimento das células T_{reg} . A partir de uma dieta rica em fibra, por exemplo, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA – do inglês *short-chain fatty acids*) produzidos por certos grupos de *Clostridia* ligam-se aos receptores acoplados a proteína G 109a (GPR109a – do inglês *G-protein-coupled receptor 109a*) das células dendríticas e induzem a síntese da aldeído desidrogenase (ALDH – do inglês *aldehyde dehydrogenase*), a qual metaboliza a vitamina A em RA, um dos indutores da resposta regulatória. As SCFA's também entram nas células dendríticas agindo como inibidores de histonas desacetilases (HDACi) para suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Elas também agem via GPR43 diretamente nas células T imaturas, induzindo a expressão de FOXP3 e inibindo as ações da HDACi. Um segundo grupo de células pT_{reg} $ROR\gamma t^-$ $Nrp1^-$ são estimuladas pelos antígenos alimentares para manter a tolerância oral. A partir do IL-33, produzido pelas células epiteliais, e do IL-2, produzido pelas células T efetoras (T_{eff} - do inglês *T effector cells*), as células T oriundas do timo (células tT_{reg}) $GATA3^+$ $Nrp1^+$ são estimuladas, mantendo a expressão de GATA3 que, por sua vez, auxilia na manutenção das populações dos

linfócitos T regulatórios. Traduções: Intestino delgado (*small intestine*), antígenos da dieta (*dietary antigens*), célula dendrítica (*dendritic cell*), fibras da dieta (*dietary fibre*), grupos de Clostridia (*Clostridia clusters*), célula epitelial intestinal (*intestinal epithelial cell*), camada de muco (*mucus layer*), célula T imatura (*naive T cell*), antígenos próprios e microbianos (*self antigens and microbial antigens*). **Retirado de Honda e Littman, 2016.**

1.1.1.3 O papel da microbiota intestinal no eixo intestino-cérebro

O eixo intestino-cérebro é um sistema de comunicação em que integra sinalizações neuronais, endócrinas e imunológicas entre o sistema nervoso central e o sistema digestório (Collins *et al.*, 2012). Esta comunicação bidirecional, realizada por moléculas sinalizadoras, é capaz de, por exemplo, modular algumas funções intestinais, como o peristaltismo, a secreção de muco e a imunidade da mucosa (sentido cérebro-intestino). Em contrapartida, a microbiota, por meio de seus metabólitos e da interação com a mucosa intestinal, é capaz de desencadear respostas no sentido contrário (intestino-cérebro), regulando funções cerebrais e podendo modificar a cognição e o comportamento (Foster e Neufeld, 2013 – **Figura 7**).

Neste contexto, tem sido observado que as células neuronais possuem a capacidade de imunomodular a mucosa intestinal através de vários fatores tradicionalmente conhecidos pelos seus papéis neurológicos, como os neurotransmissores, que sinalizam e desencadeiam diferentes respostas imunes em vários subtipos de leucócitos de forma a modificar a composição da microbiota intestinal (Baganz e Blakely, 2013; Fung *et al.*, 2017). Além disso, alguns trabalhos vêm evidenciando o papel da microbiota intestinal na modulação das micróglia e dos astrócitos em vários processos de desenvolvimento do tecido nervoso, incluindo o desenvolvimento neuronal, a neurotransmissão, a ativação do sistema nervoso central e a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (Fung *et al.*, 2017). De uma forma geral, estas células imunes locais, além de atuarem na defesa do sistema nervoso, respondem às citocinas sistêmicas de forma a induzir ou inibir a plasticidade e a remodelação da conectividade dos circuitos neuronais (Elmer e McAllister, 2012). Neste cenário, que envolve o sistema linfático cerebral conectado aos tecidos linfoides periféricos e a barreira hematoencefálica que regula a passagem endotelial de células imunes e moléculas associadas, a microbiota intestinal desempenha o seu papel (Rea *et al.*, 2016; Fung *et al.*, 2017) de forma a imunomodular não somente a mucosa intestinal, mas sistemicamente o seu hospedeiro. Várias desordens neuropsiquiátricas, incluindo o autismo, a doença de

Parkinson, a esclerose múltipla e a depressão foram associadas à desregulação das atividades das micróglias e à disbiose intestinal (Fung *et al.*, 2017), onde a modulação neuroimune exercida pela microbiota contribui para a etiopatogênese ou manifestações sintomáticas relevantes (Fung *et al.*, 2017 – **Figura 8**). Derecki *et al.* (2010), por exemplo, observaram que a integridade do sistema imune é crucial para o aprendizado normal e para a memória de camundongos, sendo este quadro dependente de uma microbiota normal. Collins *et al.* (2012), observaram que indivíduos portadores de doenças inflamatórias crônicas, como a doença inflamatória intestinal (IBD – do inglês *Inflammatory bowel disease*), apresentavam uma comunidade bacteriana modificada e, muitas vezes, comportamentos ansiosos e depressivos. Nestes casos, a administração de probióticos pode auxiliar na resolução da disbiose e na modulação do sistema imune em uma direção anti-inflamatória de tal forma a reduzir o comportamento ansioso, como foi observado por Bercik *et al.* (2010) ao tratarem camundongos com *Bifidobacterium longum* NCC3001 em um contexto de inflamação desencadeado por *Trichuris muris* e por D’Mello *et al.* (2015) ao tratarem camundongos com inflamação hepática crônica.

Também tem sido observado que a microbiota é capaz de regular a patogênese e a resolução de danos no sistema nervoso central. Benakis *et al.* (2016), por exemplo, observaram que camundongos tratados com amoxicilina e ácido clavulânico apresentam um volume de infarto menor e melhora nas funções motoras em um modelo de oclusão arterial cerebral. Neste caso, a neuroproteção foi associada à redução da infiltração meningeal de células T IL-17⁺ oriundas do intestino. Já Kigerl *et al.* (2016) observaram que a administração do coquetel probiótico VSL3 reduziu os tamanhos das lesões e melhorou a recuperação locomotora de camundongos em um modelo de lesão de medula, as quais foram associadas ao aumento de células T_{reg} nos linfonodos mesentéricos.

Não apenas limitada à via linfocitária, a microbiota intestinal possui a capacidade de modular respostas neurológicas pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), um dos maiores sistemas neuroendócrinos, o qual é associado ao controle do estresse, à regulação do sistema imune, da digestão, do armazenamento e do gasto de energia, além do humor, das emoções e da sexualidade (Rogers *et al.*, 2016). Neste contexto, tem sido observado que certas condições psiquiátricas, como a ansiedade e a depressão, estejam relacionadas a respostas desbalanceadas do eixo HPA e que modificações da composição da microbiota intestinal são capazes de influenciar este processo. Sudo *et al.* (2004), por exemplo, constataram que camundongos isentos de germes

submetidos ao estresse crônico tinham a capacidade exploratória reduzida, indicando o desenvolvimento de um comportamento tipo-ansioso. Neste estudo, foi constatado que a ansiedade estava relacionada a respostas exageradas de corticosterona e de adrenocorticotrofina, os principais hormônios do eixo HPA, e que os camundongos convencionais, ou seja, com uma microbiota normal definida, possuíam uma resposta do eixo mais balanceada e, conseqüentemente, com menor ansiedade (Sudo *et al.*, 2004). Ait-Belgnaoui *et al.* (2014) também tiveram resultados semelhantes ao administrarem *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R017 a camundongos estressados e Desbonnet *et al.* (2008) ao administrar *B. longum* subsp. *infantis* 35624 a ratos induzidos à depressão pela separação materna.

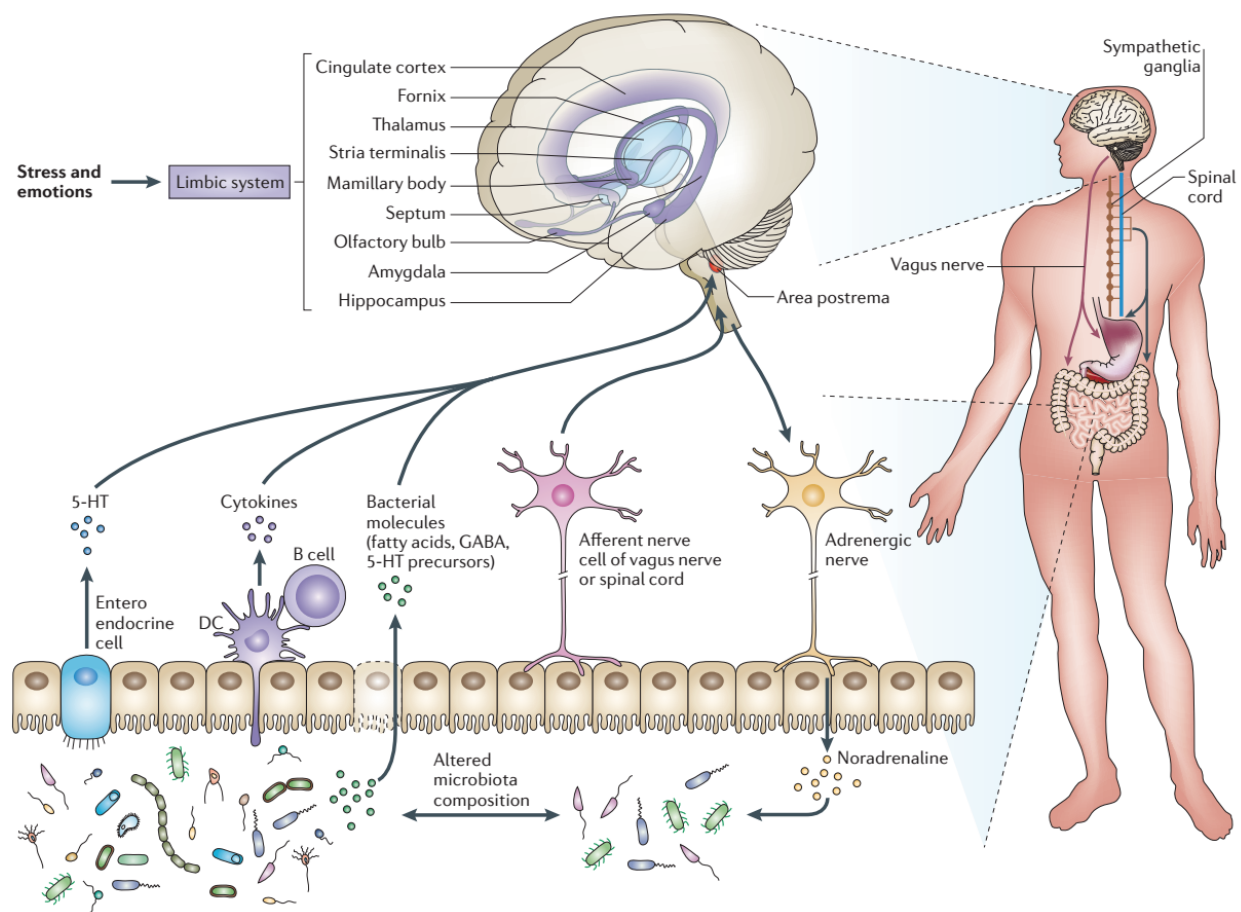


Figura 7: Vias de sinalização da microbiota no eixo intestino-cérebro. A microbiota intestinal pode induzir a liberação de 5-hidroxitriptamina (5-HT) pelas células enterocromafins intestinais, modular respostas imunes e produzir metabólitos com papéis neuroativos. Traduções: Célula enteroendócrina (*entero endocrine cell*), citocinas (*cytokines*), moléculas bacterianas (*bacterial molecules*), ácidos graxos (*fatty acids*), célula aferente do nervo vago (*afferent nerve cell of vagus nerve*), medula espinhal (*spinal cord*), nervo adrenérgico (*adrenergic nerve*), composição da microbiota alterada (*altered microbiota composition*), noradrenalina (*noradrenaline*), nervo vago (*vagus nerve*), gânglios simpáticos (*synpathetic ganglia*), estresse e emoções (*stress and*

emotions), sistema límbico (*limbic system*), córtex cingulado (*cingulate cortex*), corpos mamilares, (*mamillary body*), septo (*septum*), bulbo olfatório (*olfactory bulb*), amígdala (*amygdala*), hipocampo (*hippocampus*), célula B (*B cell*). Retirado de Collins *et al.*, 2012.

Do ponto de vista molecular, as respostas pelas quais a microbiota intestinal é capaz de modular no eixo intestino-cérebro vêm sendo elucidadas. As bactérias intestinais, por exemplo, produzem uma grande variedade de metabólitos que parecem influenciar diversos mecanismos. Certos ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo energético, por exemplo, parecem ter um efeito ansiogênico. Hanstock *et al.* (2010) ao enriquecerem a dieta de ratos com carboidratos fermentáveis observaram altos níveis de D-lactato no ceco dos animais, os quais foram associados ao comportamento tipo-ansioso e memória prejudicada. Em contrapartida, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA – do inglês *Short-chain fatty acid*) como o butirato, o ácido propiônico e o ácido acético parecem estimular positivamente o eixo intestino-cérebro, promovendo a liberação de 5-HT pelas células enterocromafins da mucosa intestinal, além de influenciar na memória e nos processos de aprendizado (Yano *et al.*, 2015; Stilling *et al.*, 2016). Além disso, tem sido observado que diversos SCFA's produzidos pela microbiota intestinal possuem a capacidade de estimular a diferenciação de células T_{reg} locais de forma a regular, sistemicamente, diferentes tipos de respostas inflamatórias, incluindo aquelas desencadeadas no sistema nervoso central, imunomodulando as células microgлияis e os astrócitos para um estado anti-inflamatório (Haghikia *et al.*, 2015).

A TNase sintetizada pelas bactérias intestinais converte o triptofano em indol o qual é, em seguida, metabolizado em ácido indol-3-propiônico (IPA do inglês *indole-3-propionic acid*), indol-3-aldeído (IAld - do inglês *indole-3-aldehyde*) e indoxil-3-sulfato (I3S – do inglês *indoxyl-3-sulfate*) pela microbiota intestinal ou pelo fígado. Recentemente, tem sido observado que estas moléculas possuem a capacidade de ativar os receptores aril-hidrocarbonetos (AHR – do inglês *aryl hydrocarbon receptors*) dos astrócitos, modulando-os quanto a diferentes respostas auxiliares. Zelante *et al.* (2013), por exemplo, observaram que o indol produzido pela microbiota intestinal aumentava a expressão de Interferons do tipo 1 pelos astrócitos, atenuando a sintomatologia da esclerose múltipla em camundongos. Já Rothhammer *et al.* (2016) observaram que o IAld produzido a partir do triptofano por *Lactobacillus reuteri* era capaz de modular o estado anti-inflamatório dos astrócitos. Moléculas estruturais bacterianas também vêm sendo associadas ao eixo intestino-cérebro, como o Polissacarídeo A (PSA) de *B. fragilis*, capaz de induzir uma

resposta regulatória local e sistêmica mediada pela produção de IL-10 com a capacidade de regular a neuroinflamação (Round e Mazmanian, 2010) e de reduzir a sintomatologia da esclerose múltipla (Ochoa-Reparaz *et al.*, 2010).

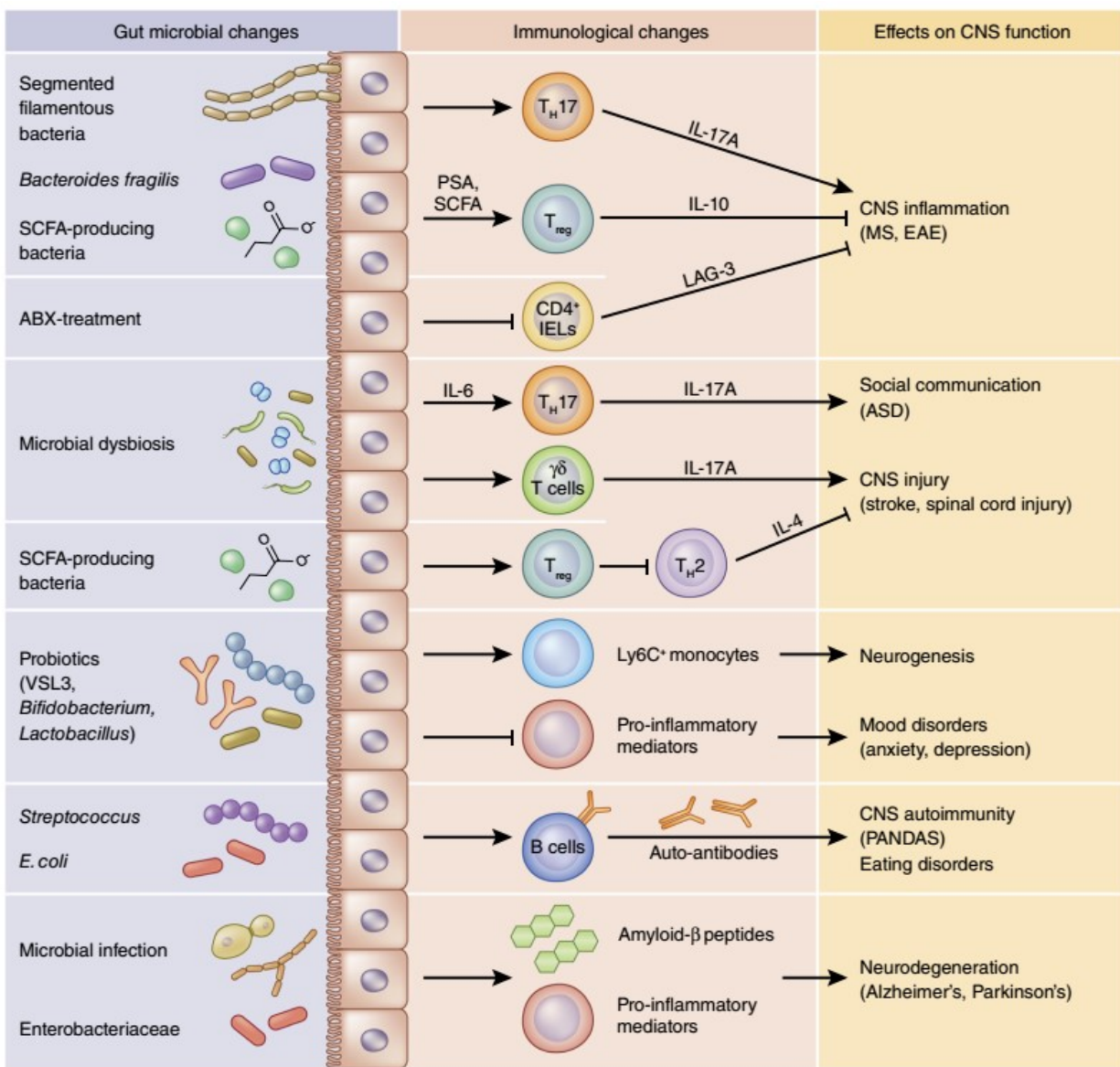


Figura 8: Alguns papéis imunomodulatórios da microbiota intestinal com consequências nas funções do sistema nervoso central. A colonização intestinal por bactérias filamentosas segmentadas estimula o desencadeamento de respostas do tipo Th17 que promovem inflamação no sistema nervoso central. O polissacarídeo A (PSA) de *Bacteroides fragilis* ou os SCFA's produzidos por certas bactérias modulam o sistema nervoso para um estado anti-inflamatório. Dependendo do antibiótico usado, a microbiota intestinal pode ser modificada e inibir a atividade inflamatória dos linfócitos intraepiteliais (IEL – do inglês *intraepithelial lymphocytes*) com consequências no sistema nervoso. Em situações de disbiose, a microbiota intestinal estimula a proliferação de células Th17 produtoras de IL-17A, as quais interferem na comunicação social, no autismo e a sintomatologia de diversos modelos de danos ao sistema nervoso central, como o

derrame e a lesão da coluna. Nestes contextos, uma microbiota que favoreça o desenvolvimento de respostas auxiliares regulatórias é capaz de amenizar as sintomatologias. A administração de probióticos pode estimular a proliferação de monócitos $Ly6C^+$ e estimular a neurogênese hipocampal, além de inibir respostas inflamatórias associadas à ansiedade e a depressão. Infecções bacterianas por *Streptococcus* e *Escherichia coli* podem desencadear respostas inflamatórias exacerbadas, determinando autoimunidade no sistema nervoso central e distúrbios de apetite. Além disso, outros tipos de infecções intestinais podem estimular a síntese de certos sinalizadores inflamatórios e peptídeos β -amiloides que podem agravar quadros clínicos de Alzheimer e Parkinson. Traduições: Mudanças na microbiota intestinal (*gut microbial changes*), bactéria filamentosa segmentada (*segmented filamentous bacteria*), bactéria produtora de SCFA (*SCFA-producing bacteria*), tratamento com antibiótico (*ABX-treatment*), disbiose microbiana (*microbial dysbiosis*), probióticos (*probiotics*), infecção microbiana (*microbial infection*), alterações imunes (*immunological changes*), monócitos $Ly6c^+$ (*Ly6c⁺ monocytes*), mediadores pró-inflamatórios (*pro-inflammatory mediators*), autoanticorpos (*auto-antibodies*), peptídeos β -amiloides (*amyloid- β peptides*), inflamação do sistema nervoso central (*CNS inflammation*), comunicação social (*social communication*), danos no sistema nervoso central (*CNS injury*), derrame (*stroke*), danos na coluna (*spinal cord injury*), neurogênese (*neurogenesis*), distúrbios do humor (*mood disorders*), ansiedade (*anxiety*), depressão (*depression*), neurodegeneração (*neurodegeneration*). Abreviações: espectro autista (ASD - do inglês *autism spectrum disorder*), separação materna (MS - do inglês *maternal separation*), distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes pediátricos associados à infecção estreptocócica (PANDAS - do inglês *pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection*), encefalomielite autoimune experimental (EAE - do inglês *experimental autoimmune encephalomyelitis*). Retirado de Fung *et al.*, 2017.

Além de regular o eixo intestino-cérebro por seus resíduos metabólicos, moléculas estruturais e outras enzimas, a microbiota intestinal é capaz de produzir diversos tipos de neurotransmissores e de modular diretamente o sistema enteroendócrino (Johnson e Foster, 2018). Yano *et al.* (2015), por exemplo, observaram que certas linhagens de bactérias formadoras de esporos estimulavam a expressão de *Tph1* nas células enterocromafins, determinando a síntese 5-HT no intestino. Já Barret *et al.* (2012) verificaram que o ácido γ -aminobutírico (GABA - do inglês *γ -aminobutyric acid*) podia ser sintetizado por linhagens de microrganismos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Além disso, diferentes grupos de estudo vêm isolando outros neurotransmissores de diversas culturas bacterianas, como é o caso da noradrenalina, da dopamina e a da acetilcolina (Johnson e Foster, 2018 – **Figura 9**). Apesar disso, tem sido colocado que suas ações sejam limitadas ao intestino, uma vez que estas moléculas possuem baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, de exercer seus papéis neuronais. Neste sentido, tem sido proposto que o papel da microbiota intestinal esteja associado à modulação da disponibilidade dos precursores, já que estas moléculas

conseguem alcançar o sistema nervoso central pela corrente sanguínea. Neste contexto, O'Mahony *et al.* (2015) hipotetizaram que a microbiota intestinal poderia influenciar o metabolismo e a disponibilidade do triptofano, o precursor do 5-HT, no organismo de tal forma a afetar a sinalização serotoninérgica no sistema nervoso central, uma vez que a concentração do aminoácido no plasma sanguíneo pode ser diretamente associada aos níveis de serotonina cerebral.

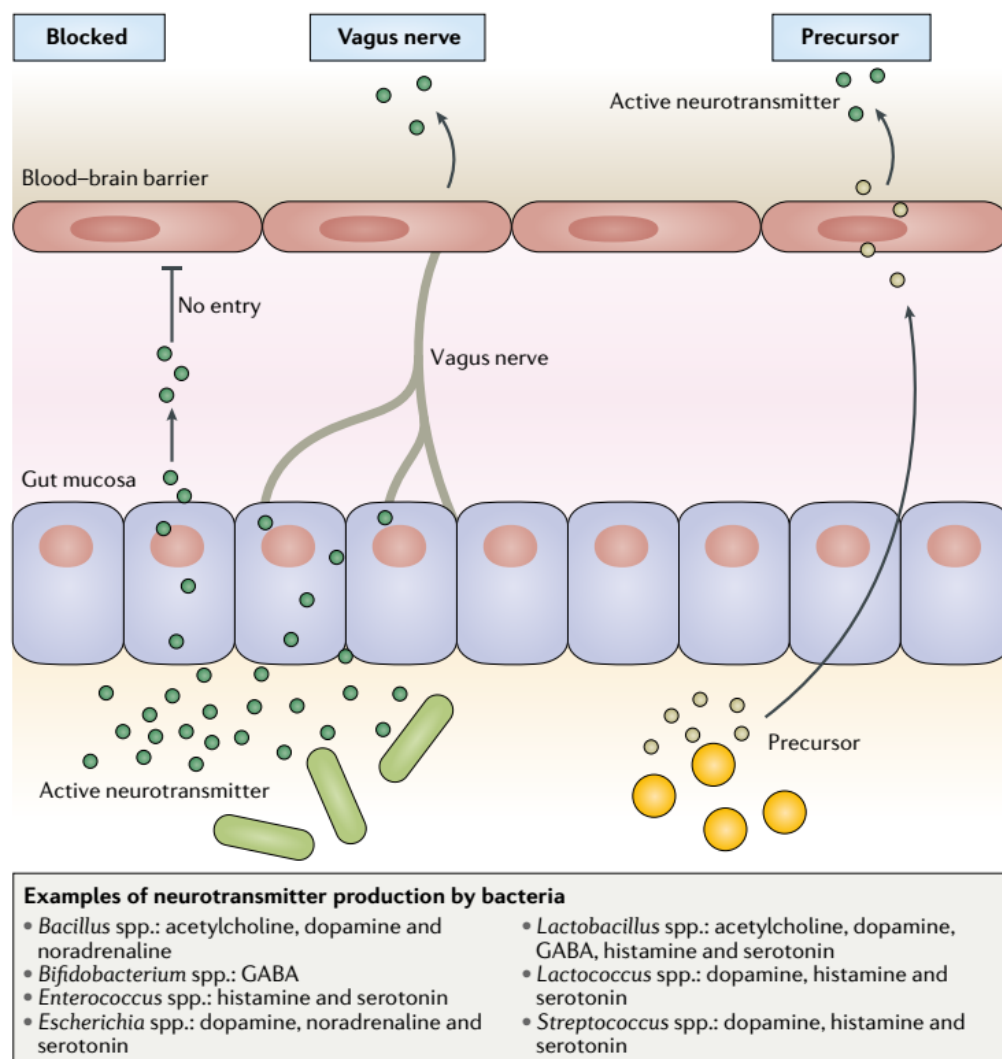


Figura 9. O papel da microbiota intestinal na dinâmica de neurotransmissores. Apesar de sintetizar ativamente vários tipos de neurotransmissores, a microbiota intestinal deve modular o eixo intestino-cérebro através dos precursores destas moléculas, as quais possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Traduções: Bloqueado (*blocked*), nervo vago (*vagus nerve*), barreira hematoencefálica (*blood-brain barrier*), neurotransmissor ativo (*active neurotransmitter*), sem entrada (*no entry*), mucosa intestinal (*gut mucosa*), exemplos de neurotransmissores produzidos por bactérias (*examples of neurotransmitter production by*

bacteria), acetilcolina (*acetylcholine*), dopamina (*dopamine*), noradrenalina (*noradrenaline*), histamina (*histamine*), serotonina (*serotonin*). **Retirado de Johnson e Foster, 2018.**

1.1.2 SOBRE A Weissella paramesenteroides WpK4

De acordo com a Organização Mundial da Saúde um probiótico é definido como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Através de mecanismos humorais e não-humorais, algumas linhagens probióticas são capazes de manter a homeostase da microbiota e de proteger as mucosas, promovendo a função de barreira epitelial de forma a estimular a síntese de moléculas de adesão entre as células epiteliais, a produção de IgA, de muco, além de citocinas anti-inflamatórias (Leeber *et al.*, 2008). De fato, muitas linhagens de bactérias lácticas probióticas foram avaliadas quanto à capacidade de promover a função da barreira epitelial e de proteger camundongos em modelos de infecções de mucosas (Mortaz *et al.*, 2013; Alvim *et al.*, 2016; Ripert *et al.*, 2016), de câncer e de colite induzida por agentes químicos (Bassaganya-Riera *et al.*, 2012; Carlsson *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2013), resultando em melhora dos quadros patológicos desenvolvidos nestes ensaios.

Devido à grande complexidade das funções e o grande número de fatores associados ao efeito dos probióticos é proposto que as funções benéficas desenvolvidas por estes microrganismos em seus hospedeiros sejam linhagem-dependente sendo, portanto, necessário observar o comportamento fisiológico específico de cada linhagem (Leeber *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2009). Nesse sentido, são propostos critérios funcionais, tecnológicos e de segurança, para a seleção de novas linhagens probióticas.

Em relação aos aspectos de segurança, o microrganismo não deve apresentar toxicidade ou patogenicidade ao hospedeiro, deve ter sua identificação taxonômica ao nível de espécie estabelecida e ser geneticamente estável (neste caso, não possuir genes de resistência a antimicrobianos associados a elementos móveis). Também deve, preferencialmente, ter a capacidade de aderir à mucosa e de produzir substâncias antagonistas, como bacteriocinas e de possuir capacidades adaptativas, conferindo-lhes características funcionais como a de sobreviver aos desafios impostos pelo hospedeiro, como as variações de pH ao longo do trato gastrointestinal,

presença de sais biliares, imunidade local e enzimas gástricas (Lebeer *et al.*, 2008). Além disso, estes microrganismos precisam exibir propriedades tecnológicas como ser viável em altas densidades populacionais, ter fácil proliferação *in vitro* e manter suas funções benéficas durante toda a cadeia produtiva (Lebeer *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2009).

Seguindo estas premissas e por meio de estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, foi observado que a *Weissella paramesenteroides* WpK4 possuía a capacidade de sobreviver ao trânsito intestinal de camundongos isentos de germes e de antagonizar bactérias patogênicas como, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* ATCC 14028. Além disso, foi observado que o consumo desta linhagem protegeu a mucosa intestinal de camundongos em um modelo de febre tifoide, promovendo a função da barreira epitelial, modulando respostas humorais de forma a estimular a produção de IgA e de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e o IFN- γ (Alvim *et al.*, 2016). Neste sentido, a utilização desta bactéria em outros modelos de doenças associadas à respostas inflamatórias desreguladas pode ser uma ferramenta que auxilie na elucidação de alguns mecanismos de patogenicidade.

I.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ait-Belgnaoui, A., Colom, A., Braniste, V., Ramalho, L., Marrot, A., Cartier, C., *et al.* (2014). Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 510–520. doi:10.1111/nmo.12295.
- Alvim, L. B., Sandes, S. H. C., Silva, B. C., Steinberg, R. S., Campos, M. H. A., Acurcio, L. B., *et al.* (2015). *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. *Benef. Microbes* 7, 61–73. doi:10.3920/BM2015.0093.
- Baganz, N. L., and Blakely, R. D. (2012). A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 48–63. doi:10.1021/cn300186b.
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* 113, 411–417. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x.
- Bassaganya-Riera, J., Viladomiu, M., Pedragosa, M., De Simone, C., and Hontecillas, R. (2012). Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS One* 7, e34676. doi:10.1371/journal.pone.0034676.
- Benakis, C., Brea, D., Caballero, S., Faraco, G., Moore, J., Murphy, M., *et al.* (2016). Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Med.* 22, 516–523. doi:10.1038/nm.4068.
- Bercik, P., Verdu, E. F., Foster, J. A., Macri, J., Potter, M., Huang, X., *et al.* (2010). Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology* 139, 2102–2112.e1. doi:10.1053/j.gastro.2010.06.063.
- Buffie, C. G., and Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 790. doi:10.1038/nri3535.
- Carlsson, A. H., Yakymenko, O., Olivier, I., Håkansson, F., Postma, E., Keita, A. V., *et al.* (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 48, 1136–44. doi:10.3109/00365521.2013.828773.
- Collado, M. C., Cernada, M., Bäuerl, C., Vento, M., and Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 3, 352–365. doi:10.4161/gmic.21215.
- Collins, J. W., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., and Searle, L. E. J. (2009). “Prebiotics and Probiotics Science and Technology,” in, eds. D. Charalampopoulos and R. A. Rastall (New York, NY: Springer New York), 1123–1192. doi:10.1007/978-0-387-79058-9_30.

- Collins, S. M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 735–742. doi:10.1038/nrmicro2876.
- Dai, C., Zheng, C. Q., Meng, F. J., Zhou, Z., Sang, L. X., and Jiang, M. (2013). VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- κ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. *Mol. Cell. Biochem.* 374, 1–11. doi:10.1007/s11010-012-1488-3.
- de Sablet, T., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., Vareille, M., Gobert, A. P., and Martin, C. (2009). Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 77, 783–790. doi:10.1128/IAI.01048-08.
- Derecki, N. C., Cardani, A. N., Yang, C. H., Quinlins, K. M., Cribfield, A., Lynch, K. R., *et al.* (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J. Exp. Med.* 207, 1067–1080. doi:10.1084/jem.20091419.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., and Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 170, 1179–1188. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.005.
- D'Mello, C., Ronaghan, N., Zaheer, R., Dicay, M., Le, T., MacNaughton, W. K., *et al.* (2015). Probiotics improve inflammation-associated sickness behavior by altering communication between the peripheral immune system and the brain. *J. Neurosci.* 35, 10821 LP-10830. doi:10.1523/JNEUROSCI.0575-15.2015.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., and Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32. doi:10.1038/nrmicro3552.
- Douillard, F. P., Ribbera, A., Järvinen, H. M., Kant, R., Pietilä, T. E., Randazzo, C., *et al.* (2013). Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marketed as probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1923–1933. doi:10.1128/AEM.03467-12.
- Elmer, B. M., and McAllister, A. K. (2012). Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends Neurosci.* 35, 660–670. doi:10.1016/j.tins.2012.08.001.
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Acessado em: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
- Ferreira, R. B. R., Gill, N., Willing, B. P., Antunes, L. C. M., Russell, S. L., Croxen, M. A., *et al.* (2011). The intestinal microbiota plays a role in *Salmonella*-induced colitis independent of pathogen colonization. *PLoS One* 6, e20338. doi:10.1371/journal.pone.0020338.
- Foster, J. A., and Neufeld, K.M. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36, 305–312. doi:10.1016/j.tins.2013.01.005.

- Fung, T. C., Olson, C. A., and Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Publ. Gr.* 20. doi:10.1038/nn.4476.
- Graff, L. A., Walker, J. R., and Bernstein, C. N. (2009). Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: A review of comorbidity and management. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1105–1118. doi:10.1002/ibd.20873.
- Haghikia, A., Jörg, S., Duscha, A., Berg, J., Manzel, A., Waschbisch, A., *et al.* (2015). Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity* 43, 817–829. doi:10.1016/j.immuni.2015.09.007.
- Hanstock, T. L., Mallet, P. E., and Clayton, E. H. (2010). Increased plasma d-lactic acid associated with impaired memory in rats. *Physiol. Behav.* 101, 653–659. doi:10.1016/j.physbeh.2010.09.018.
- Honda, K., and Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535, 75. doi:10.1038/nature18848.
- Jain, P., Hassan, A. M., Koyani, C. N., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Farzi, A., *et al.* (2015). Behavioral and molecular processing of visceral pain in the brain of mice: impact of colitis and psychological stress. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 1–16. doi:10.3389/fnbeh.2015.00177.
- Johnson, K. V, and Foster, K. R. (2018). Why does the microbiome affect behaviour? *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/s41579-018-0014-3.
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., and Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 14, 685–690. doi:10.1038/ni.2608.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., *et al.* (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17193–17198. doi:10.1073/pnas.0908876106.
- Kawamoto, S., Maruya, M., Kato, L. M., Suda, W., Atarashi, K., Doi, Y., *et al.* (2014). Foxp3⁺ T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41, 152–165. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.016.
- Kigerl, K. A., Hall, J. C. E., Wang, L., Mo, X., Yu, Z., and Popovich, P. G. (2016). Gut dysbiosis impairs recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* 213, 2603–2620. doi:10.1084/jem.20151345.
- Kondepudi, K. K., Ambalam, P., Nilsson, I., Wadström, T., and Ljungh, Å. (2012). Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 18, 489–497. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.08.005.

- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764. doi:10.1128/MMBR.00017-08.
- Lindner, C., Thomsen, I., Wahl, B., Ugur, M., Sethi, M. K., Friedrichsen, M., *et al.* (2015). Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat. Immunol.* 16, 880. doi:10.1038/ni.3213.
- Mortaz, E., Adcock, I. M., Folkerts, G., Barnes, P. J., Paul Vos, A., and Garssen, J. (2013). Probiotics in the management of lung diseases. *Mediators Inflamm.* 2013, 751068. doi:10.1155/2013/751068.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D. L., *et al.* (2010). A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.* 3, 487. doi.org/10.1038/mi.2010.29.
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* 277, 32–48. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.027.
- Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821. doi:10.1038/nri3322.
- Powell, N., Walker, M. M., and Talley, N. J. (2017). The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut–brain communications. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 14, 143. doi:10.1038/nrgastro.2016.191.
- Rea, K., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol. Stress* 4, 23–33. doi:10.1016/j.ynstr.2016.03.001.
- Reeves, A. E., Koenigsnecht, M. J., Bergin, I. L., and Young, V. B. (2012). Suppression of *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect. Immun.* 80, 3786–3794. doi:10.1128/IAI.00647-12.
- Renz, H., Brandtzaeg, P., and Hornef, M. (2011). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 9–23. doi:10.1038/nri3112.
- Reunanen, J., von Ossowski, I., Hendrickx, A. P. A., Palva, A., and de Vos, W. M. (2012). Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2337 LP-2344. doi:10.1128/AEM.07047-11.
- Ripert, G., Racedo, S. M., Elie, A.-M., Jacquot, C., Bressollier, P., and Urdaci, M. C. (2016). Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* O/C inhibit the cytotoxic effects induced

- by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3445–3454. doi:10.1128/AAC.02815-15.
- Roche, A. M., Richard, A. L., Rahkola, J. T., Janoff, E. N., and Weiser, J. N. (2015). Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination. *Mucosal Immunol.* 8, 176–185. doi:10.1038/mi.2014.55.
- Rogers, G. B., Keating, D. J., Young, R. L., Wong, M. L., Licinio, J., and Wesselingh, S. (2016). From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol. Psychiatry* 21, 738–748. doi:10.1038/mp.2016.50.
- Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Kenison, J. E., Mayo, L., *et al.* (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat. Med.* 22, 586–597. doi:10.1038/nm.4106.
- Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12204–12209. doi:10.1073/pnas.0909122107.
- Sajadinejad, M. S., Asgari, K., Molavi, H., Kalantari, M., and Adibi, P. (2012). Psychological issues in inflammatory bowel disease: An overview. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012. doi:10.1155/2012/106502.
- Smith, K., McCoy, K. D., and Macpherson, A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59–69. doi:10.1016/j.smim.2006.10.002.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–38. doi:10.1038/nrmicro2974.
- Stilling, R. M., van de Wouw, M., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2016). The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochem. Int.* 99, 110–132. doi:10.1016/j.neuint.2016.06.011.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., *et al.* (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263–275. doi:10.1113/jphysiol.2004.063388.
- Trejo, F. M., Minnaard, J., Perez, P. F., and De Antoni, G. L. (2006). Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by Bifidobacterium supernatants. *Anaerobe* 12, 186–193. doi:10.1016/j.anaerobe.2006.03.004.
- Triantafyllidis, J. K., Merikas, E., and Gikas, A. (2013). Psychological factors and stress in inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 225–38. doi:10.1586/egh.13.4.

- Ubeda, C., Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N. C., Equinda, M., *et al.* (2013). Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect. Immun.* 81, 965–973. doi:10.1128/IAI.01197-12.
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., *et al.* (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161, 264–276. doi:10.1016/j.cell.2015.02.047.
- Xu, J., and Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10452–10459. doi:10.1073/pnas.1734063100.
- Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., *et al.* (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via Interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003.
- Zhou, L., and Foster, J. A. (2015). Psychobiotics and the gut – brain axis: in the pursuit of happiness. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 715–723. doi:10.2147/NDT.S61997.

CAPÍTULO II
***A *Weissella paramesenteroides* WpK4* melhorou aspectos
clínicos no contexto da retocolite ulcerativa**

II.1. SOBRE A RETOCOLITE ULCERATIVA

A doença inflamatória intestinal (IBD – do inglês *Inflammatory bowel disease*) é uma desordem inflamatória crônica do intestino que compreende a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa, ambas de origem orgânica e/ou psicológica, cujo desenvolvimento envolvem aspectos ambientais, genéticos, fisiológicos, psicossociais e microbiológicos, os quais determinam uma complexa sintomatologia, envolvendo dor abdominal, diarreia sanguinolenta, fadiga, etc. (Graff *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2012; Sajadinejad *et al.*, 2012; Triantafillidis *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2015; Zhou e Foster, 2015 – **Figura10**). Além disso, a cronicidade e a natureza imprevisível e incerta do curso da IBD são aspectos importantes, determinando quadros de ansiedade, neuroticismo e depressão, impactando, de forma significativa, na sociabilidade e, conseqüentemente, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes (Graff *et al.*, 2009; Sajadinejad *et al.*, 2012).

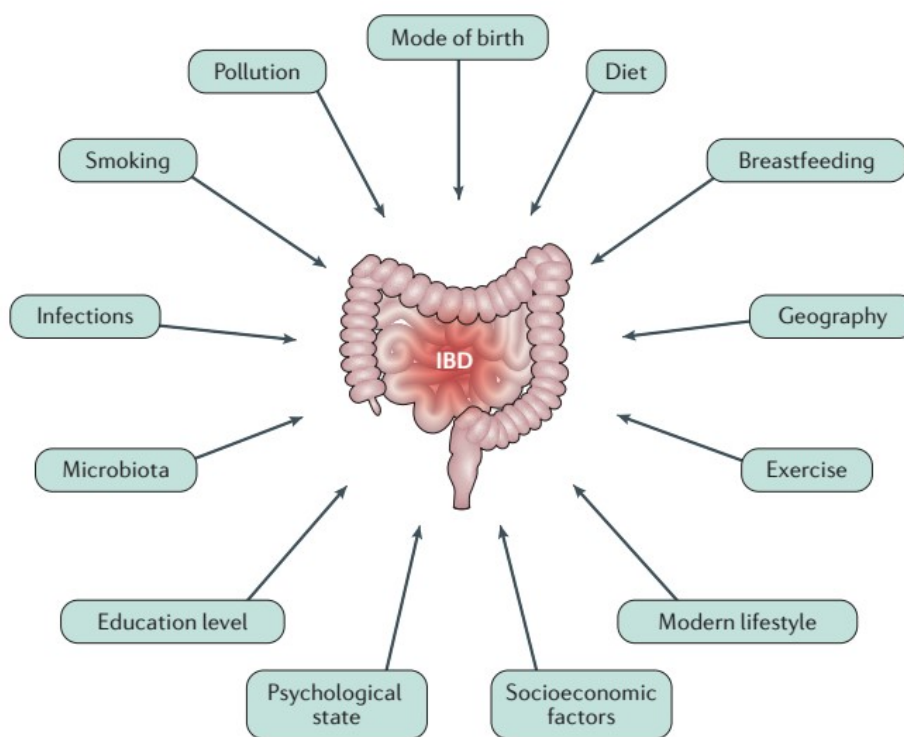


Figura 10. O desenvolvimento da IBD envolve vários aspectos ambientais, genéticos, fisiológicos, psicossociais e microbiológicos, sendo considerada uma doença dos países desenvolvidos. Vários estudos epidemiológicos associaram o desenvolvimento da IBD a fatores ambientais, como a exposição à poluição (*pollution*), o estilo de vida contemporâneo (*modern lifestyle*) e o local onde o indivíduo viveu (*geography*). O estado psicológico (*psychological state*), a composição da microbiota e a frequência de infecções intestinais (*infections*), o tipo de dieta (*diet*), o fumo (*smoking*) e fatores socioeconômicos (*socioeconomic factors*), como o nível de

educação (*education level*), também vêm sendo associados à doença, além da forma de nascimento (*mode of birth*), normal ou cesariana, e o tempo de amamentação (*breastfeeding*). **Retirado de Ananthakrishnan *et al.*, 2017.**

A retocolite ulcerativa acomete, comumente, indivíduos na faixa etária entre 30 e 40 anos, sendo caracterizada pela inflamação recidiva e remitente da mucosa colônica, começando a partir do reto e estendendo para o segmento proximal do cólon. Baseada em uma resposta inflamatória descontrolada à disbiose intestinal, a retocolite ulcerativa é caracterizada pela proliferação de células auxiliares do tipo T_{H9} produtoras de IL-9, as quais regulam a expressão de diversas moléculas das junções comunicantes (*tight junctions*) nas células epiteliais. Além disso, a síntese de IL-9 parece ter um papel inibitório nos processos de proliferação celular e no reparo das lesões na mucosa, uma vez que ela é capaz de recrutar e estimular os mastócitos locais a produzirem histamina, citocinas pró-inflamatórias e proteases que promovem a citotoxicidade no epitélio e, consequentemente, a permeabilidade intestinal (Forbes *et al.*, 2008). Neste contexto, a barreira epitelial comprometida permite o extravasamento dos antígenos luminiais para a *lamina propria* (Gerlach *et al.*, 2015), estimulando as células dendríticas e os macrófagos locais a polarizarem os linfócitos T indiferenciados em linfócitos T_{H1}, produtores de TNF- α , e T_{H2}, produtores de IL-13, os quais estimulam o recrutamento das células T citotóxicas, promovendo novos danos ao epitélio do cólon (Pranjal e Goswami, 2018 – **Figura 11**).

O tratamento da retocolite ulcerativa é bastante complexo, não é curativo e envolve terapia tradicional com a finalidade de promover a função da barreira epitelial e de reduzir as respostas pró-inflamatórias exacerbadas na mucosa intestinal através da educação alimentar, suplementação nutricional, uso de drogas anti-inflamatórias, supressores do sistema imune, antibióticos e psicossocioterapia (Torres *et al.*, 2013). Uma abordagem recente leva em consideração a utilização de microrganismos oriundos de mucosas saudáveis cujos benefícios estão associados à regulação da microbiota intestinal, reduzindo a disbiose local, além de estimular a síntese de citocinas anti-inflamatórias e de promover a função de barreira epitelial. Nesse sentido, muitas linhagens probióticas vêm sendo estudadas com o intuito de se desenvolver alternativas suplementares ao tratamento da doença (Shen *et al.*, 2014).

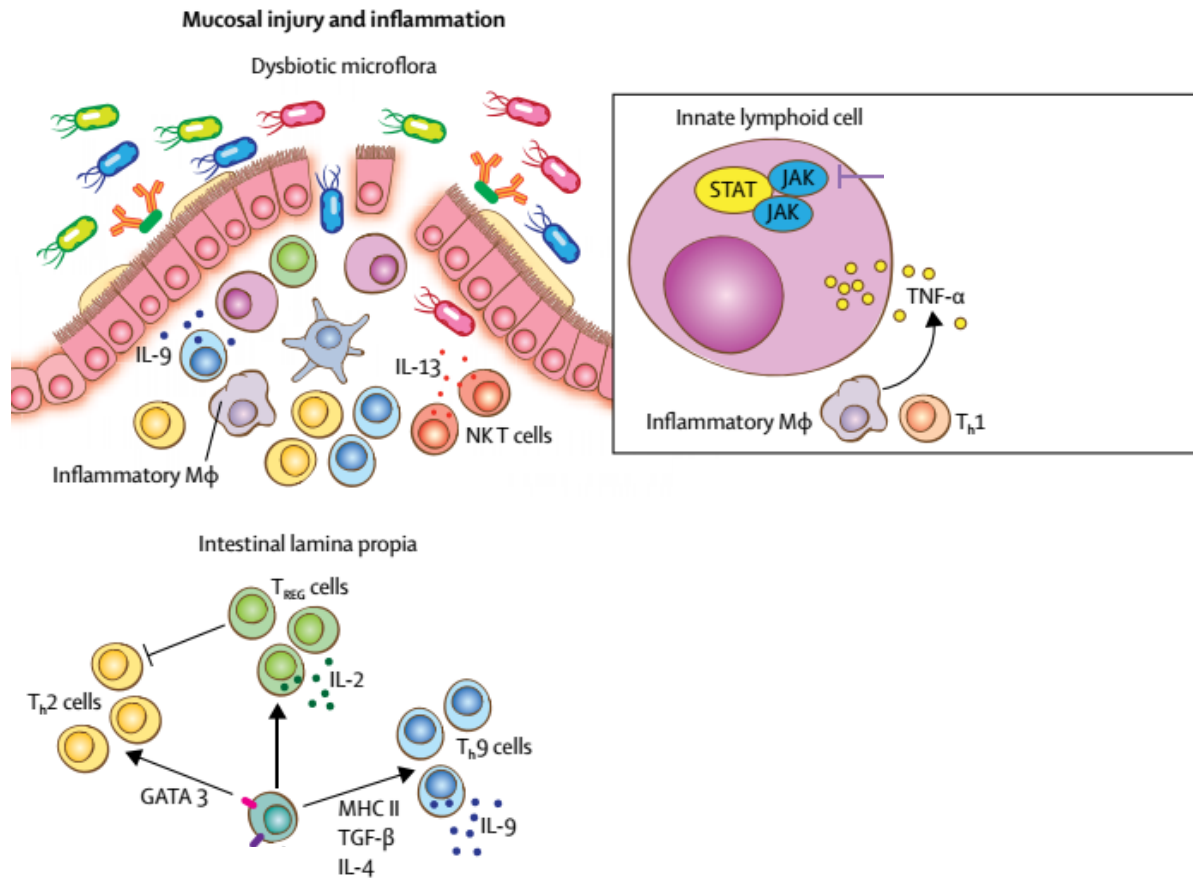


Figura 11. Aspectos imunes da retocolite ulcerativa. As Células T_{H9} são diferenciadas a partir de linfócitos T imaturos produtores de TGF-β e IL-4. O IL-9 produzido pelas células T_{H9} promove o recrutamento de mastócitos e de células T citotóxicas (NK – do inglês *natural killer*), as quais promovem a permeabilidade intestinal, permitindo a entrada de antígenos luminiais para a *lamina propria*. Neste contexto, as células T indiferenciadas são polarizadas em células T_{H1} e T_{H2} que estimulam a inflamação e a citotoxicidade no epitélio intestinal. Traduções: Danos e inflamação na mucosa (*mucosal injury and inflammation*), disbiose (*dysbiotic microflora*), macrófago inflamatório (*inflammatory MΦ*), lâmina própria (*intestinal lamina propria*), célula linfoide inata (*innate lymphoid cell*). **Modificado de Ungaro *et al.*, 2016.**

II.2. OBJETIVOS

II.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a *Weissella paramesenteroides* WpK4 possui papel probiótico em um modelo de colite ulcerativa quimicamente induzido em camundongos.

II.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros de saúde dos camundongos tratados e não tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados ou não com Dextrano Sulfato de Sódio (DSS), levando em consideração:

- (1) a variações de peso;
- (2) a consistência e presença de sangue nas fezes;
- (3) a permeabilidade intestinal;
- (4) alterações na arquitetura da mucosa do cólon;
- (5) a imunomodulação local desencadeada pelos diferentes tratamentos.

II.3. METODOLOGIA

II.3.1 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

A bactéria *W. paramesenteroides* WpK4 foi mantida em meio caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) suplementado com glicerol 15% (v/v) em freezer a -80°C (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, EUA). O microrganismo foi cultivado em caldo MRS em um volume de 5mL com um inóculo de 2% (v/v), sendo incubado à 37°C em câmara de anaerobiose (Forma Scientific, Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂, durante 24 horas. Uma vez ativada, a bactéria foi inoculada duas vezes consecutivas (2% v/v), sendo a primeira em MRS caldo por 24h e a segunda por 18hs em condições aeróbicas para obtenção de uma concentração de 10⁹ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL.

II.3.2 CAMUNDONGOS – MANEJO E ASPECTOS ÉTICOS

Camundongos fêmeas pertencentes à linhagem C57BL/6J com idade de 3 semanas foram retirados do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os ensaios foram realizados respeitando a filosofia “3Rs” (do inglês *Replacement, Reduction and Refinement* – Russell e Burch, 1959), buscando reduzir o número de camundongos utilizados em cada experimento e implementar condições que reduzam o sofrimento e que melhorem o bem-estar dos animais. Neste sentido, quatro camundongos foram mantidos em cada mini-isolador (série VentiLife, Alesco, Monte Mor, Brasil) contendo maravalha autoclavada e em um ambiente com temperatura (23°C a 25°C), ciclo circadiano (12hs), ventilação e ruído branco controlados. Os camundongos receberam água filtrada e ração (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) *ad libidum* ao longo de todo o período dos ensaios, além de tratamento para eliminação de eventuais parasitas internos e externos, o qual foi realizado utilizando uma solução de ivermectina 1% (Ivomec, Merial do Brasil, Campinas, Brasil) diluída e mantida na água dos animais (1mL de Ivomec 1% para cada 200mL de água) por dois dias consecutivos. Após este período, os camundongos voltaram a receber água filtrada até o início dos ensaios, quando atingiram 5 semanas de idade. Os mini-isoladores foram trocados duas vezes por semana para limpeza. No final do período experimental, os camundongos foram submetidos à sedação profunda com uma

dose intraperitoneal combinada de xilazina (15mg/kg) e quetamina (100mg/kg), seguida da eutanásia por deslocamento cervical.

Os estudos apresentados neste projeto foram avaliados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) a qual certificou e aprovou o projeto intitulado “Estudo do papel probiótico e psicobiótico de bactérias lácticas em modelo de colite quimicamente induzida” (Protocolo 246/2016 – localizado no item II.6. Anexo) por se adequar aos princípios éticos de experimentação animal. Além disso, todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2013).

II.3.3 ENSAIO DE COLITE AGUDA

Neste experimento foram utilizados 32 camundongos, estabelecendo-se 4 grupos. Os ensaios de tratamento e de indução da colite ulcerativa foram divididos em duas fases: período pré-desafio (1° ao 10° dia) e desafio (11° ao 21° dia), os quais foram iniciados quando os camundongos atingiram 5 semanas de idade, logo após o término do período de vermifugação. O primeiro (Ct) e o segundo (WpK4) grupos receberam, respectivamente, gavagens diárias de PBS (do inglês *Phosphate-Buffered Saline* - NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,4) e de 10⁸ UFC da bactéria *W. paramesenteroides* WpK4 em um volume de 0,1mL ao longo de todo o período experimental (**Tabela 1**). No terceiro grupo (DSS), os camundongos foram diariamente gavados com PBS e foram desafiados, consumindo *ad libidum* água contendo Dextrano Sulfato de Sódio (DSS, peso molecular médio de 36.000-50.000 – MP Biomedicals, Santa Ana, Estados Unidos) na concentração de 2,5% (p/v) a partir do 11° dia até o fim do ensaio. Assim como no terceiro grupo, os camundongos pertencentes ao quarto grupo (Wpk4DSS) foram desafiados com o DSS, mas foram tratados diariamente com, no mínimo, 10⁸ UFC da *W. paramesenteroides* WpK4 (**Tabela 1**).

Tabela 1. Grupos e diferentes desafios e tratamentos.

Grupo	Período Pré-desafio (1° ao 10° dia)	Desafio (11° ao 21° dia)
Ct	Dose diária de 0,1 mL PBS	Dose diária de 0,1 mL PBS
WpK4	Dose diária de 10 ⁸ UFC de WpK4	Dose diária de 10 ⁸ UFC de WpK4
DSS	Dose diária de 0,1 mL de PBS	Dose diária de 0,1 mL de PBS; DSS 2,5% adicionado à água
WpK4DSS	Dose diária de 10 ⁸ UFC de WpK4	Dose diária de 10 ⁸ UFC de WpK4; DSS 2,5% adicionado à água

II.3.3.1 Quantificação dos parâmetros de saúde

O curso do desenvolvimento da colite foi monitorado, avaliando alterações do peso, além da consistência e da presença de sangue nas fezes. Para isso, as variáveis foram diariamente categorizadas de acordo com Shon *et al.* (2015) a partir da indução da colite (11° dia) até a eutanásia (21° dia). A perda de peso ou não dos camundongos foram qualificados de acordo com os valores que se seguem: 0 pontos, quando não houve perda de peso, 1 ponto quando a perda foi de 5% a 10% do peso inicial, 2 pontos quando a perda foi de 11% a 15%, 3 pontos quando a perda foi de 16% a 20% e 4 pontos quando a perda foi acima de 21%. A ocorrência de fezes normais, moles sem formato definido e liquefeitas receberam valores de 0, 2 e 4, respectivamente, além de valores de 0, 2, 4 e 8 quando apresentaram coloração normal, normal com sangue oculto (detectado com Hexagon Obscreen - Human Diagnostics, Wiesbaden, Alemanha), avermelhada e sanguinolenta, respectivamente. Um Índice de Desenvolvimento da Colite (DAI – do inglês *disease activity index*), variando de 0 a 16, foi calculado baseado nos valores combinados de cada variável.

II.3.3.2 Avaliação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada no Laboratório de Radiofarmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para isto, os camundongos foram gavados com 0,1mL de uma solução radioativa (18.5 MBq) de Ácido Dietilenotriaminopentacético (DTPA – do inglês *Diethylenetriamine Pentaacetic Acid*) marcado com o radioisótopo tecnécio (99mTc). Quatro horas após a gavagem, os camundongos foram anestesiados de acordo com o item II.3.2 e, aproximadamente, 0,2 mL de sangue foi coletado,

pesado e colocado em tubos apropriados para a determinação da radioatividade, a qual foi medida em um contador gama automatizado (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer, Waltham, Estados Unidos). Para o cálculo do percentual de dose de material radioativo no sangue, utilizou-se um padrão contendo a mesma dose (18.5 MBq) de DTPA marcado administrada aos camundongos e a seguinte fórmula: % dose radioativa/ grama de sangue = (cpm por gramas de sangue/ cpm do padrão) X 100, onde cpm é contagem da radioatividade por minuto (Andrade *et al.*, 2015).

II.3.3.3 Análises histopatológicas e morfometria digital

Os exames histopatológicos foram realizados no Laboratório de Protozooses do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e compreenderam análises dos cólons. Para isso, estes órgãos foram removidos e tiveram os seus tamanhos determinados, sendo as porções distais coletadas (a partir do reto até completar 5cm), longitudinalmente estendidas e cortadas, pré-fixadas em uma solução de Bouin 2% (v/v) por 10 minutos e enroladas em uma espiral com a mucosa voltada para dentro, lembrando rocamboles ou *swiss rolls*. Em seguida, o material foi fixado, desidratado, diafanizado, infiltrado e incluído em parafina. A partir disso, foram obtidos cortes histológicos com 4 µm de espessura, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Todos os cortes histológicos foram analisados para a descrição das lesões quanto ao tipo e localização, intensidade, além de terem sido digitalizados para obtenção dos dados de área de lesão da mucosa (Oliveira *et al.*, 2012). Para isso, cada corte histológico foi visualizado através da objetiva de 10x do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para a digitalização das imagens por intermédio da microcâmera SDC-415 (Samsung, Seul, Coréia do Sul). Todas as zonas de destruição da mucosa foram manualmente delimitadas, mensurando as áreas, em µm², por intermédio do programa KS300 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

II.3.3.4 Análises moleculares de citocinas e reguladores da imunidade

No final do período experimental, fragmentos de cólon, de aproximadamente 2 cm, foram embebidos e fixados em RNAlater (Ambion, Austin, Estados Unidos) e armazenados a -20°C até

o seu processamento. Em seguida, o RNA total foi obtido usando o PureZOL RNA isolation reagent (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade e a qualidade das amostras foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose, além de análises espectrofotométricas em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos), onde foram levadas em consideração as razões de absorbância 280/260 e 260/230 nm. As amostras foram tratadas com DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, United States) para a síntese do DNA complementar (cDNA), a qual foi realizada usando 1 µg de RNA e o kit high-capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, Foster City, United States) de acordo com o manual do fabricante.

As reações de qPCR foram realizadas usando o kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e os primers gene-específicos para *Nos2*, *Il1b*, *Ifng*, *Tnfa*, *Cxcl1*, *Il18*, *Tgfb1*, *Il10* e *Il22* descritos por Deriu *et al.* (2013), Giulietti *et al.* (2001), Loonen *et al.* (2014) e Patial *et al.* (2016). Os genes constitutivos codificadores da beta-actina (*Actb*) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foram usados como referência para as normalizações (Giulietti *et al.*, 2001). As reações foram otimizadas ajustando a concentração dos primers para uma especificidade e eficiência ótimas (**Tabela 2**). Os níveis de expressão gênica do grupo controle, sem qualquer tipo de tratamento, foram usados como calibradores e os resultados obtidos dos grupos experimentais foram apresentados graficamente como razão de quantidades (*fold change*), usando as médias e os desvios padrões da expressão gênica dos alvos estudados de acordo com Hellemans *et al.* (2007).

II.3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no pacote estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos). O teste de Shapiro Wilk foi usado para avaliar se os dados possuíam uma distribuição normal. Neste caso, as amostras paramétricas foram submetidas a análises da variância das médias, realizando múltiplas comparações entre os diferentes tratamentos ou grupos de dados (*one-way* ou *two-way* Anova) seguido do teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias obtidas. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando os valores dos níveis de significância eram maiores que 95% ($p < 0,05$).

Tabela 2. Primers e condições de amplificação utilizados neste trabalho.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequência (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Referência
Primers	Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Il1bF	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	250	3.25	-3.34	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			Il1bR	GATCCACACTCTCCAGCTGCA				
	Nitric oxide synthase 2, inducible	<i>Nos2</i>	iNosF	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	250	3.25	-3.37	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			iNosR	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG				
	Interferon gamma	<i>Ifng</i>	IfnF	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	250	3.25	-3.09	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			IfnR	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG				
	Tumor necrosis factor	<i>Tnfa</i>	TnfaF	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	250	3.25	-3.29	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			TnfaR	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC				
	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	<i>Cxcl1</i>	KcF	TGCACCCAAACCGAAGTCAT	250	3.25	-3.45	Deriu <i>et al.</i> , 2013
			KcR	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC				
	Interleukin 18	<i>Il18</i>	Il18F	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	250	3.25	-3.18	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			Il18R	TCTGACATGGCAGCCATTGT				
	Interleukin 10	<i>Il10</i>	Il10F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	250	3.25	-3.44	Patial <i>et al.</i> , 2016
			Il10R	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG				
	Interleukin 22	<i>Il22</i>	Il22F	AGACAGGTTCCAGCCCTACA	250	32.5	-3.18	Loonen <i>et al.</i> , 2014
			Il22R	CAGGTCCAGTTCCCAATC				
	Transforming growth factor, beta 1	<i>Tgfb1b</i>	TgfF	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	250	3.25	-3.44	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			TgfR	GGTTCATGTCATGGATGGTGC				
	Actin, beta	<i>Actb</i>	bActF	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	250	3.25	-3.37	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			bActR	CAATAGTGATGACCTGGCCGT				
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	GapdgF	TCACCACCATGGAGAAGGC	250	3.25	-3.42	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			GapdhR	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA				

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidade de cDNAs, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência das reações de qPCR, a qual variou de 94.92% (slope igual a -3.45) a 110.68% (slope igual a -3.09).

II.4. RESULTADOS

II.4.1 A *Weissella paramesenteroides* WpK4 MELHOROU A SAÚDE DOS CAMUNDONGOS NO MODELO DE COLITE QUIMICAMENTE INDUZIDA

Ao longo do período de desenvolvimento da colite ulcerativa (10 dias) a variação de peso e a consistência e a presença de sangue nas fezes foram monitoradas para o estabelecimento de um índice de desenvolvimento da colite (DAI – *Disease Activity Index*) a qual demonstrou que camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados com DSS desenvolveram sintomas mais brandos quando comparados àqueles somente desafiados com o DSS (**Figura 12**).

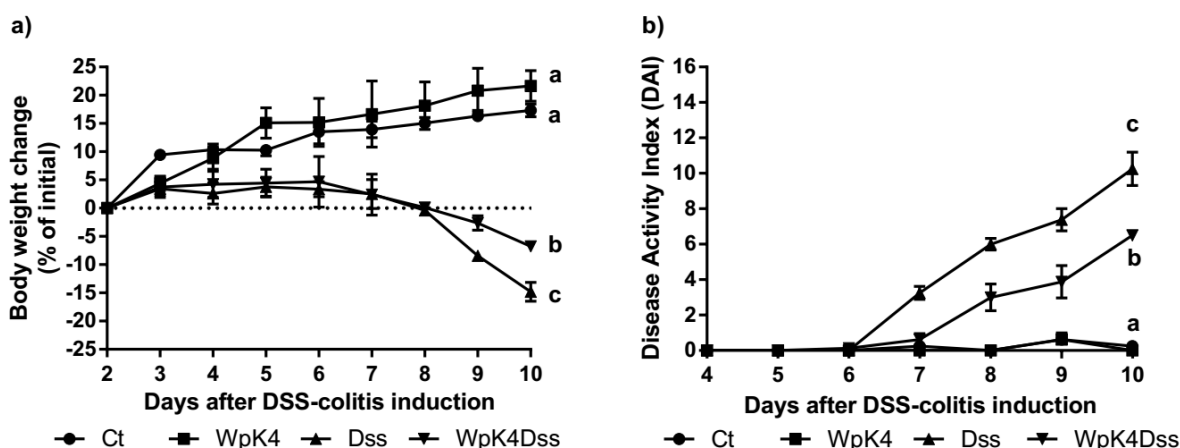


Figura 12: Índice de desenvolvimento da colite (DAI) entre os diferentes grupos experimentais. a) Valores da variação de peso (*body weight change*) e b) do índice de desenvolvimento da colite (DAI – do inglês *Disease Activity Index*) dos camundongos pertencentes aos grupos Ct e WpK4 foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). Camundongos com colite ulcerativa e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 (grupo WpK4DSS) tiveram um DAI estatisticamente menor em comparação àqueles somente com colite ($p < 0,01$). Letras diferentes indicam que a comparação entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). Ct – camundongos tratados com PBS, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos desafiados com DSS, WpK4DSS – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados com DSS.

Após os 21 dias de ensaio foi avaliada a permeabilidade intestinal dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais, uma vez que o modelo de colite quimicamente induzida por DSS é capaz de interferir e reduzir a barreira epitelial da mucosa colônica. Nesse sentido, foi verificado que a ingestão da *W. paramesenteroides* WpK4 pelos camundongos com

retocolite ulcerativa reduziu a permeabilidade intestinal, sendo estatisticamente semelhante aos grupos PBS e WpK4 (**Figura 13**).

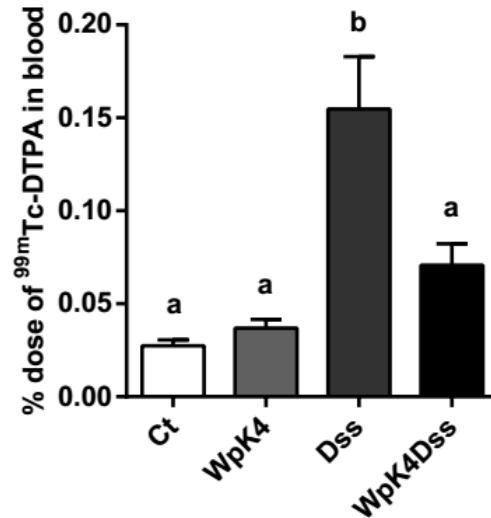


Figura 13: Permeabilidade intestinal entre os diferentes grupos experimentais. A permeabilidade intestinal dos camundongos pertencentes aos grupos Ct, WpK4 e WpK4DSS foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$), evidenciando o papel protetor da *W. paramesenteroides* WpK4 (grupo WpK4DSS) no contexto da colite (grupo DSS). Letras diferentes indicam que a comparação entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). Ct – camundongos tratados com PBS, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos desafiados com DSS, WpK4DSS – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados com DSS.

A partir das análises anatômicas, outros parâmetros de saúde foram verificados, como os tamanhos dos cólons. De um modo geral, o tratamento com a *W. paramesenteroides* WpK4 em camundongos desafiados com DSS foi capaz de estatisticamente reduzir a inflamação colônica, o que foi refletido na observação de tamanhos maiores dos cólons quando comparado com aqueles pertencentes aos camundongos somente desafiados com DSS (**Figura 14**).

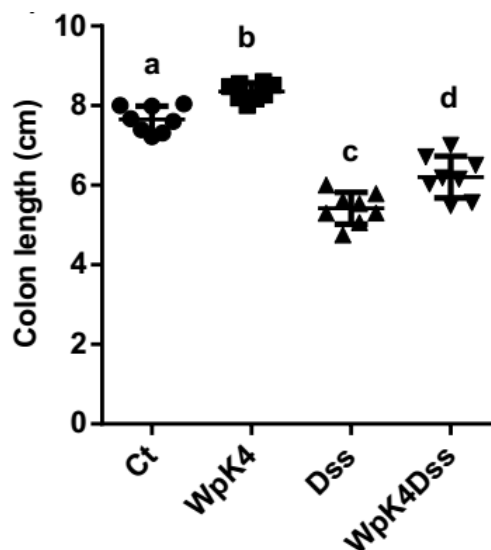


Figura 14: Tamanho dos cólons dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental. Os tamanhos dos cólons dos camundongos (*colon length*) pertencentes aos grupos Ct, WpK4, DSS e WpK4DSS foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O tratamento da colite ulcerativa com *W. paramesenteroides* WpK4 (grupo WpK4DSS) manteve o tamanho dos cólons mais próximos da normalidade. Letras diferentes indicam que a comparação entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). Ct – camundongos tratados com PBS, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos desafiados com DSS, WpK4DSS – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados com DSS.

Nas análises histopatológicas, os cólons dos camundongos do grupo controle (Ct) apresentaram aspecto histológico compatível com a normalidade (**Figura 15 – letras a, b, c**). O tratamento dos camundongos com *W. paramesenteroides* WpK4 (grupo WpK4) não provocou danos à parede intestinal (dado não mostrado). Já nos camundongos com retocolite ulcerativa (DSS) foram observadas lesões intensas da parede intestinal. Em várias porções da mucosa colônica foram encontradas zonas de perda total das criptas e substituição por tecido de granulação, constituído por infiltrado inflamatório neutrofílico e microabscessos intracriptais (**Figura 15 – letras d, e, f**). As margens destas regiões mostravam-se com perda total ou parcial do revestimento epitelial, com desorganização das criptas e redução do número de células caliciformes. O infiltrado inflamatório, predominantemente neutrofílico, estendia-se da camada mucosa à submucosa e, frequentemente, até a camada serosa. A submucosa mostrava-se bastante edemaciada, o que levou a um aumento significativo de sua espessura. O quadro descrito caracteriza uma retocolite ulcerativa multifocal extensa e transmural. Neste contexto, o tratamento dos camundongos com a *W. paramesenteroides* WpK4 (grupo WpK4DSS) parece ter reduzido a intensidade das lesões acima descritas, produzidas pelo DSS (**Figura 15 – letras g, h e i**). Ou seja, as zonas de perda total

da camada mucosa foram menores e a extensão do cólon examinado mostrou maior superfície de cobertura epitelial, o que pôde ser comprovado pelas análises morfométricas (**Figura 16**).

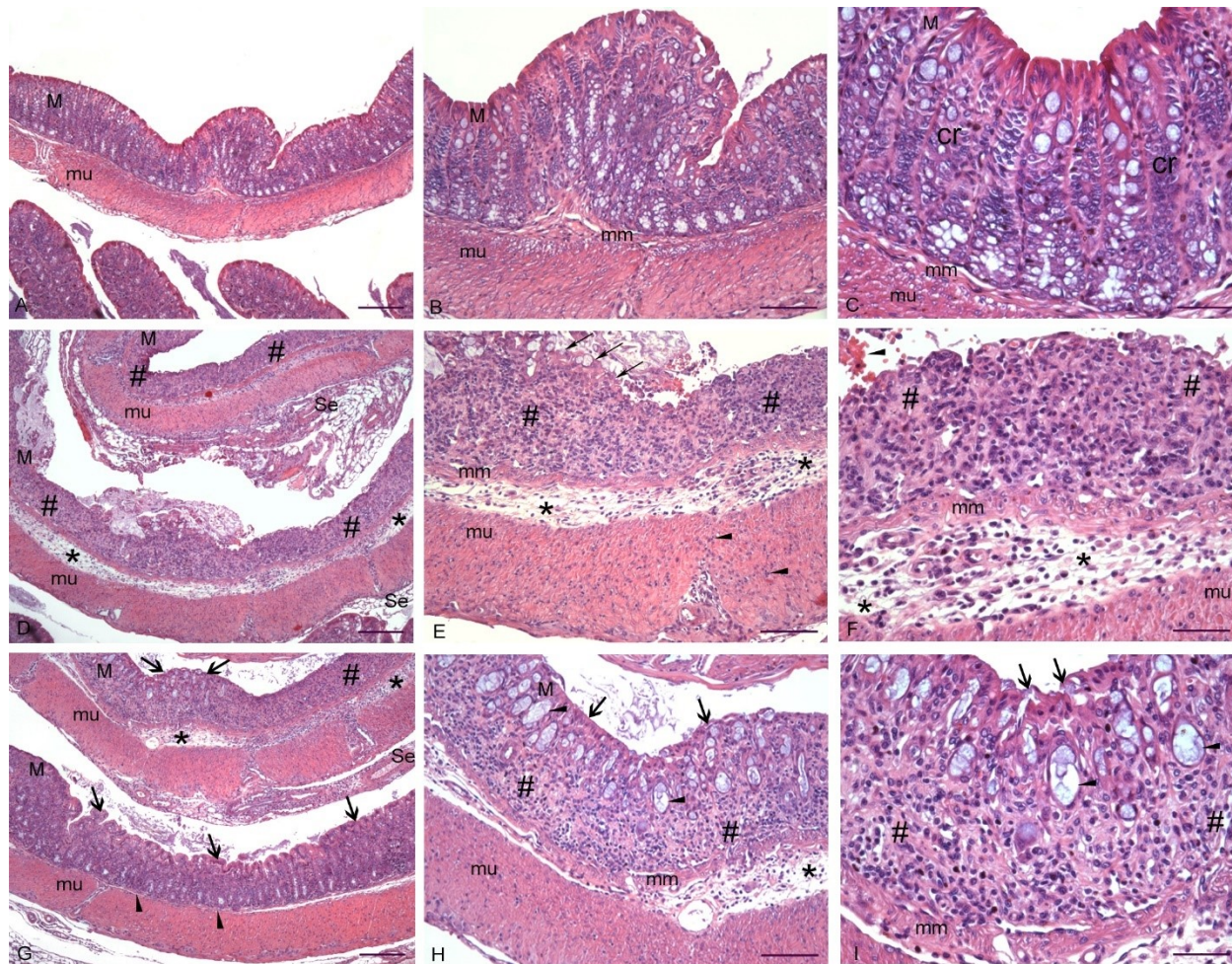


Figura 15: Aspectos histopatológicos dos cólons dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais. a) Segmento de cólon de camundongo do grupo Ct. Cólon com aspecto histológico normal. Barra 200 μ m. **b)** e **c)** Maiores aumentos da imagem **a)**. Barras 100 e 50 μ m, respectivamente. **d)** Segmentos de cólon de camundongo desafiados com DSS. Notar a perda total das criptas (#), infiltrado inflamatório e edema da submucosa (*), que levou ao seu espessamento, bem como a presença de células inflamatórias na muscular (**cabeças de seta**). Barra 200 μ m. **e)** Maior aumento da figura anterior mostrando o tecido de granulação (#) desenvolvido em substituição às criptas, hemácias no lúmen intestinal (**cabeça de seta**), resquícios de epitélio de revestimento e de células caliciformes (**setas finas**), submucosa inflamada e edemaciada (*). Barra 100 μ m. **f)** Detalhes da figura anterior. Tecido de granulação (#) desenvolvido e em substituição às criptas e submucosa inflamada e edemaciada (*). Barra 50 μ m. **g)** Segmento de cólon de camundongo do desafiado com DSS e tratado com a bactéria (grupo WpK4DSS). Zonas de perda de criptas (#) juntamente com áreas onde o epitélio de superfície e as criptas encontram-se preservados, sem substituição por tecido de granulação (**setas**). Submucosa de espessura normal (**cabeças de setas**). Submucosa inflamada (*). Barra 200 μ m. **h)** Maior aumento da figura anterior

mostrando tecido de granulação em substituição à porção basal e medial das criptas (#) e, epitélio de revestimento e parte das criptas preservados (**setas**). Aumento da quantidade e do tamanho das células caliciformes (**cabeças de seta**). Submucosa inflamada e edemaciada (*). Barra 100 μm . **I**) Detalhes da figura anterior. Zonas de perda de criptas (#), epitélio de superfície e parte das criptas preservados (**setas**) e, células caliciformes (**cabeças de setas**). Barra 50 μm . Camada mucosa (**M**); *muscularis mucosae* (**mm**); camada submucosa (**Sb**); camada muscular (**Mu**), camada serosa (**Se**), cr (**cripta intestinal**). Corado com Hematoxilina e Eosina (H&E).

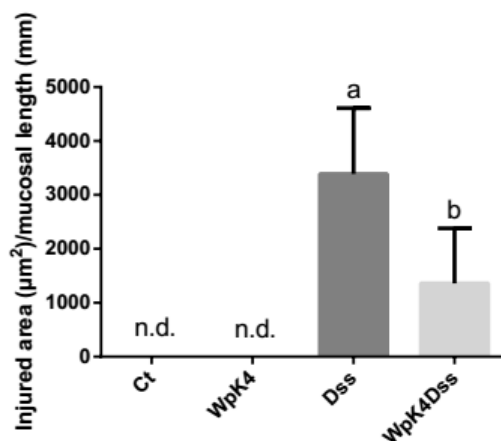


Figura 16: Áreas de lesão da mucosa colônica dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais. A área de lesão da mucosa dos camundongos (*Injured area/mucosal length*) pertencentes aos grupos Ct e WpK4 foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$), não apresentando qualquer tipo de lesão (n.d.), e diferentes entre os grupos DSS e WpK4DSS ($p < 0,05$). Camundongos com retocolite ulcerativa e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 (grupo WpK4DSS) tiveram, em média, uma área de lesão estatisticamente menor em comparação com aqueles apenas desafiados com DSS ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam que a comparação entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). Ct – camundongos tratados com PBS, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos desafiados com DSS, WpK4DSS – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados com DSS.

II.4.2 A MELHORA DA SAÚDE DOS CAMUNDONGOS COM RETOCOLITE ULCERATIVA FOI ASSOCIADA À IMUNOMODULAÇÃO DA MUCOSA COLÔNICA DESENCADEADA PELA INJESTÃO DA *Weissella paramesenteroides* WpK4

Ao comparar a expressão gênica relativa de moléculas indutoras e reguladoras do sistema imune entre os diferentes grupos de camundongos, foi observado que no contexto da colite ulcerativa (grupo WpK4DSS) a *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduziu a expressão de moléculas pró-inflamatórias, muitas das quais responsáveis pelo desencadeamento de respostas

exacerbadas indutoras de necrose tecidual como *Ifng*, *Tnfa* e *Il1b* (**Figura 17**). Além disso, foi observado que camundongos ao desenvolverem a colite ulcerativa e tratados com a *Weissella paramesenteroides* WpK4 mantiveram maiores níveis de expressão de *Il22*, uma citocina que participa da manutenção da barreira epitelial e na recuperação de injúrias na mucosa intestinal (**Figura 17**).

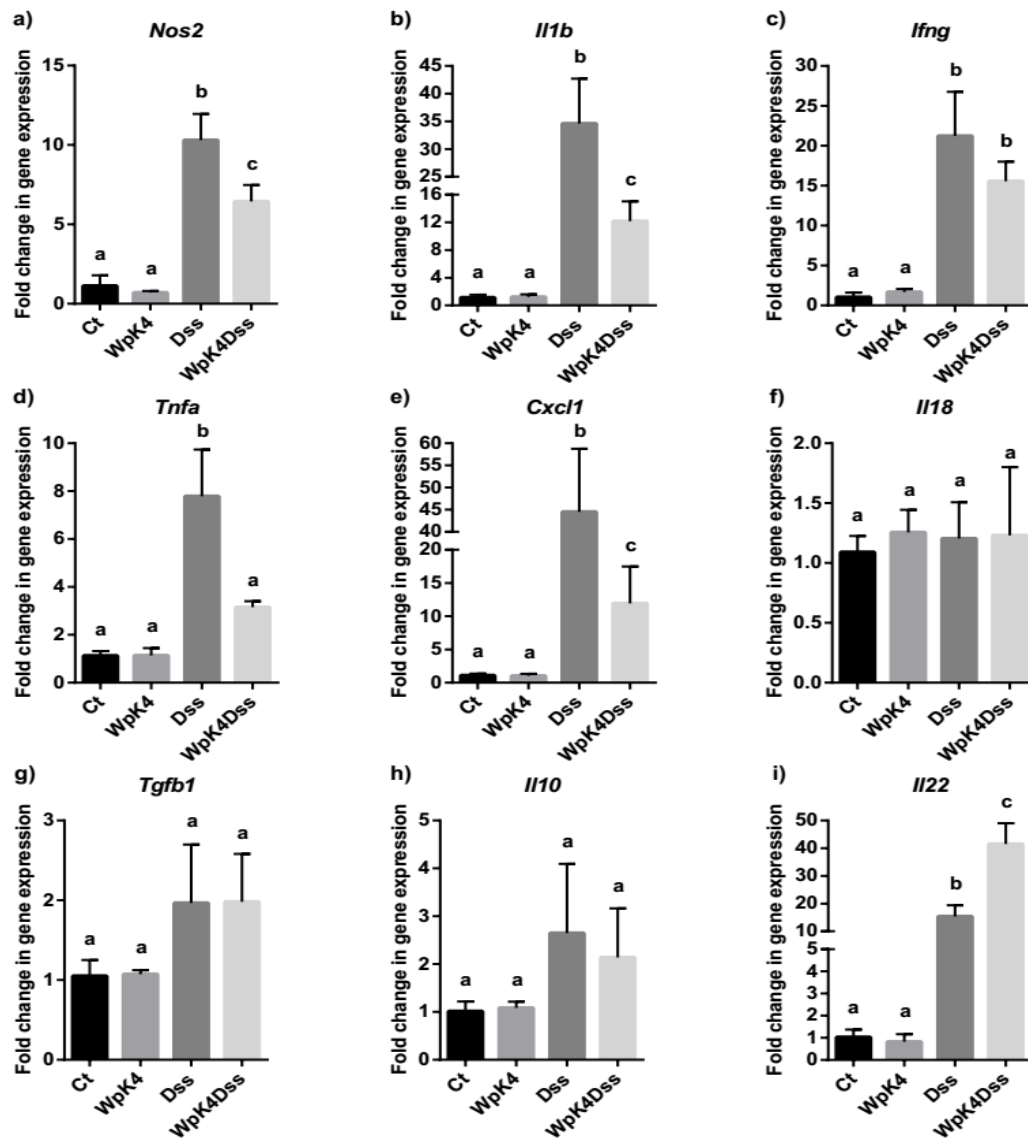


Figura 17: Imunomodulação da mucosa colônica dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental. De um modo geral, camundongos com colite ulcerativa e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 tiveram uma resposta inflamatória menor (**a**, **b**, **c**, **d** e **e**) e ao mesmo tempo expressaram uma maior quantidade de *Il22* (**i**). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos tratados com PBS, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS –

camundongos desafiados com DSS, WpK4DSS – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e desafiados com DSS.

II.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ananthakrishnan, A. N., Bernstein, C. N., Iliopoulos, D., Macpherson, A., Neurath, M. F., Ali, R. A. R., et al. (2017). Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 15, 39. doi:10.1038/nrgastro.2017.136.
- Andrade, M. E. R., Santos, R. d. G. C. d., Soares, A. D. N., Costa, K. A., Fernandes, S. O. A., de Souza, C. M., et al. (2015). Pretreatment and Treatment With L-Arginine Attenuate Weight Loss and Bacterial Translocation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. *J. Parenter. Enter. Nutr.*, 1–10. doi:10.1177/0148607115581374.
- COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119>.
- Collins, S. M., Surette, M., and Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 735–742. doi:10.1038/nrmicro2876.
- Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., et al. (2013). Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella* Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host Microbe* 14, 26–37. doi:10.1016/j.chom.2013.06.007.
- Forbes, E. E., Groschwitz, K., Abonia, J. P., Brandt, E. B., Cohen, E., Blanchard, C., et al. (2008). IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 205, 897–913. doi:10.1084/jem.20071046.
- Gerlach, K., McKenzie, A. N., Neurath, M. F., and Weigmann, B. (2015). IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue barriers* 3, e983777–e983777. doi:10.4161/21688370.2014.983777.
- Giulietti, a, Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261.
- Graff, L. A., Walker, J. R., and Bernstein, C. N. (2009). Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: A review of comorbidity and management. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1105–1118. doi:10.1002/ibd.20873.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Jain, P., Hassan, A. M., Koyani, C. N., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Farzi, A., et al. (2015). Behavioral and molecular processing of visceral pain in the brain of mice: impact of colitis and psychological stress. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 1–16. doi:10.3389/fnbeh.2015.00177.

- Loonen, L. M. P., Stolte, E. H., Jaklofsky, M. T. J., Meijerink, M., Dekker, J., van Baarlen, P., *et al.* (2013). REG3 γ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunol.* 7, 939. Available at: <https://doi.org/10.1038/mi.2013.109>.
- Oliveira, F. M. S., Horta, B. C., Prata, L. O., Santiago, A. F., Alves, A. C., Faria, A. M. C., *et al.* (2012). Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. *Infect. Dis. Rep.* 4, e27–e27. doi:10.4081/idr.2012.e27.
- Patial, S., Curtis, A. D., Lai, W. S., Stumpo, D. J., Hill, G. D., Flake, G. P., *et al.* (2016). Enhanced stability of tristetraprolin mRNA protects mice against immune-mediated inflammatory pathologies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 1865–1870. doi:10.1073/pnas.1519906113.
- Sajadinejad, M. S., Asgari, K., Molavi, H., Kalantari, M., and Adibi, P. (2012). Psychological issues in inflammatory bowel disease: An overview. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012. doi:10.1155/2012/106502.
- Shen, J., Zuo, Z. X., and Mao, A. P. (2014). Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn's disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis* 20, 21–35. doi:10.1097/01.MIB.0000437495.30052.be.
- Shon, W.-J., Lee, Y.-K., Shin, J. H., Choi, E. Y., and Shin, D.-M. (2015). Severity of DSS-induced colitis is reduced in Ido1-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF-kB transcriptional networks. *Sci. Rep.* 5, 17305. doi:10.1038/srep17305.
- Torres, J., Danese, S., and Colombel, J.-F. (2013). New therapeutic avenues in ulcerative colitis: thinking out of the box. *Gut* 62, 1642–52. doi:10.1136/gutjnl-2012-303959.
- Triantafyllidis, J. K., Merikas, E., and Gikas, A. (2013). Psychological factors and stress in inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 225–38. doi:10.1586/egh.13.4.
- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet* 389, 1756–1770. doi:10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
- Vyas, S. P., and Goswami, R. (2018). A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 9, 1139. doi:10.3389/fimmu.2018.01139.
- Zhou, L., and Foster, J. A. (2015). Psychobiotics and the gut – brain axis: in the pursuit of happiness. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 715–723. doi:10.2147/NDT.S61997.

**II.6. ANEXO: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO, EXPEDIDO PELO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 246/2016

Título do projeto: Estudo do papel probiótico e psicobiótico de bactérias lácticas em modelo de colite quimicamente induzida

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Alvaro Cantini Nunes

Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas

Departamento: Departamento de Biologia Geral

Situação atual: [Decisão Final](#)

Aprovado na reunião do dia 24/10/2016.

Belo Horizonte, 31/10/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

CAPÍTULO III

A *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduziu os comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em camundongos cronicamente estressados

III.1. O PAPEL DO SISTEMA IMUNE NA DEPRESSÃO E NA ANSIEDADE

A depressão maior (MDD – do inglês *major depressive disorder*) é uma desordem psiquiátrica cujo o desenvolvimento envolvem aspectos ambientais, genéticos e psicológicos, sendo as experiências negativas na infância, como abusos físicos e sexuais, negligência psicológica, violência doméstica, separação precoce dos pais, etc., os maiores riscos para o desenvolvimento da doença ao longo da vida (Miller e Raison, 2016). Com uma sintomatologia complexa, o MDD afeta as relações pessoais, o trabalho, os hábitos alimentares, o sono, determinando um humor depressivo, interesse diminuído, além de comportamento vegetativo (Miller e Raison, 2016). Já as desordens de ansiedade (AD – do inglês *anxiety disorders*) envolvem um conjunto de doenças, como a desordem ansiosa generalizada, a desordem do pânico, as desordens relacionadas ao medo, a ansiedade social, a ansiedade de separação, a agorafobia, dentre outras, onde o desenvolvimento pode estar associado a experiências negativas durante a primeira infância, como a inibição comportamental e a exposição a situações estressantes com os pais, além de experiências na vida jovem e adulta, impactando, significativamente, no desenvolvimento cognitivo e na qualidade de vida dos portadores (Michopoulos *et al.*, 2017).

Um dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento do MDD e do AD envolvem a disfunção do eixo HPA (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal) e a modulação de respostas imunes, sendo o cortisol uma molécula chave nestes processos. Tem sido observado, por exemplo, que pacientes com MDD e AD apresentam uma sobrecarga alostática neste sistema, produzindo persistentemente este hormônio, de tal forma a induzir resistência às respostas desencadeadas pelos glicocorticóides (Miller *et al.*, 2009; Slavich e Irwin, 2014). Neste contexto, o cortisol, ao invés de executar o seu papel anti-inflamatório, mantém o estado inflamatório no organismo (Slavich e Irwin, 2014). Tanto o MDD quanto o AD são caracterizados por níveis aumentados de citocinas na corrente sanguínea e os mecanismos pelos quais as células inflamatórias e seus fatores são capazes de modular o sistema nervoso e, conseqüentemente, a cognição estão sendo elucidados (**Figuras 18 e 19**). No caso do MDD, por exemplo, vem sendo observado que o estresse psicológico crônico é capaz de promover a síntese de catecolaminas pelo sistema nervoso simpático de forma a estimular a proliferação e a liberação das células mieloides no sistema linfático e na corrente sanguínea. Neste contexto, vários fatores pró-inflamatórios passam a ser sintetizados em resposta ao estresse, como os padrões moleculares associados ao dano

induzido pelo estresse (DAMP – do inglês *damage-associated molecular patterns*) e os padrões moleculares associados aos microrganismos (MAMP – do inglês *microbial associated molecular patterns*) que estimulam os monócitos circulantes a produzirem citocinas inflamatórias, como o IL-1, o IL-6 e o IL-18 que são capazes de modular os astrócitos e as micróglia de forma a reduzir a neuroplasticidade, a neurogênese e de alterar a dinâmica das monoaminas, afetando, significativamente, o comportamento (Miller *et al.*, 2009; Drago *et al.*, 2015 – **Figuras 18**). De forma semelhante, o desenvolvimento do AD também envolve o desencadeamento de respostas inflamatórias tanto periféricas quanto no sistema nervoso central (**Figura 19**), entretanto os mecanismos pelos quais as citocinas modulam o metabolismo dos neurotransmissores nas sinapses ainda precisa ser elucidado (Michopoulos *et al.*, 2017). Apesar disso, é interessante observar que o MDD e o AD ocorrem, geralmente, em comorbidade pelo fato de compartilharem mecanismos de desenvolvimento semelhantes. Não somente isso, também tem sido observada a manifestação destes distúrbios associadas a outras doenças inflamatórias, como a esquizofrenia, doenças cardíacas, fibromialgia, artrite reumatoide e doenças gastrointestinais (O'Donovan *et al.*, 2015).

Os tratamentos do MDD e do AD envolvem, tradicionalmente, a psicoterapia e/ou a farmacoterapia com antidepressivos tricíclicos ou inibidores das monoaminas oxidases que, respectivamente, inibem a recaptação e promovem o catabolismo de neurotransmissores, de tal forma a manter, por exemplo, maiores níveis de 5-HT na fenda sináptica. Alternativamente, a prática de exercícios e da meditação, a musicoterapia e a manutenção de um sono de qualidade estão associadas à melhora da qualidade de vida dos pacientes. Além disso, novos estudos buscam interferir no sistema imune do organismo de modo a regular e reduzir as respostas inflamatórias crônicas. Abbot *et al.* (2015), por exemplo, verificaram, através de uma revisão meta-analítica, que a abordagem com anticorpos cujos os alvos eram citocinas inflamatórias foram capazes de reduzir a sintomatologia do MDD e de promover a cognição tanto em modelos animais quanto em humanos. Já Petra *et al.* (2015) observaram que, em muitos casos, a inflamação sistêmica encontrada nos pacientes com MDD e AD poderia estar associada à inflamação da mucosa intestinal, de tal forma que a modulação do sistema imune pela microbiota teria um papel importante nestes processos. De fato, vários trabalhos reportaram a alteração da microbiota e a associaram ao estado inflamatório da mucosa intestinal e do sistema nervoso em pacientes com MDD e AD (Messaoudi *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2015; Aizawa *et al.*, 2016; Mohammadi *et al.*, Zheng *et al.*, 2016). Neste contexto, novas abordagens vêm sendo desenvolvidas e envolvem a

regulação da inflamação sistêmica pela modulação da microbiota intestinal de tal forma a promover respostas auxiliares regulatórias (Dinan *et al.*, 2013). Deste modo, o conceito psicobiótico foi concebido, referindo-se a microrganismos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, são capazes de alterar a composição da microbiota e de promover a saúde e o bem-estar de pacientes com doenças psiquiátricas, modulando respostas imunes locais e sistêmicas (Dinan *et al.*, 2013). Neste sentido, muitas linhagens bacterianas vêm sendo estudadas com o intuito de se desenvolver alternativas suplementares ao tratamento do MDD e do AD (Dinan *et al.*, 2013; Fung *et al.*, 2017).

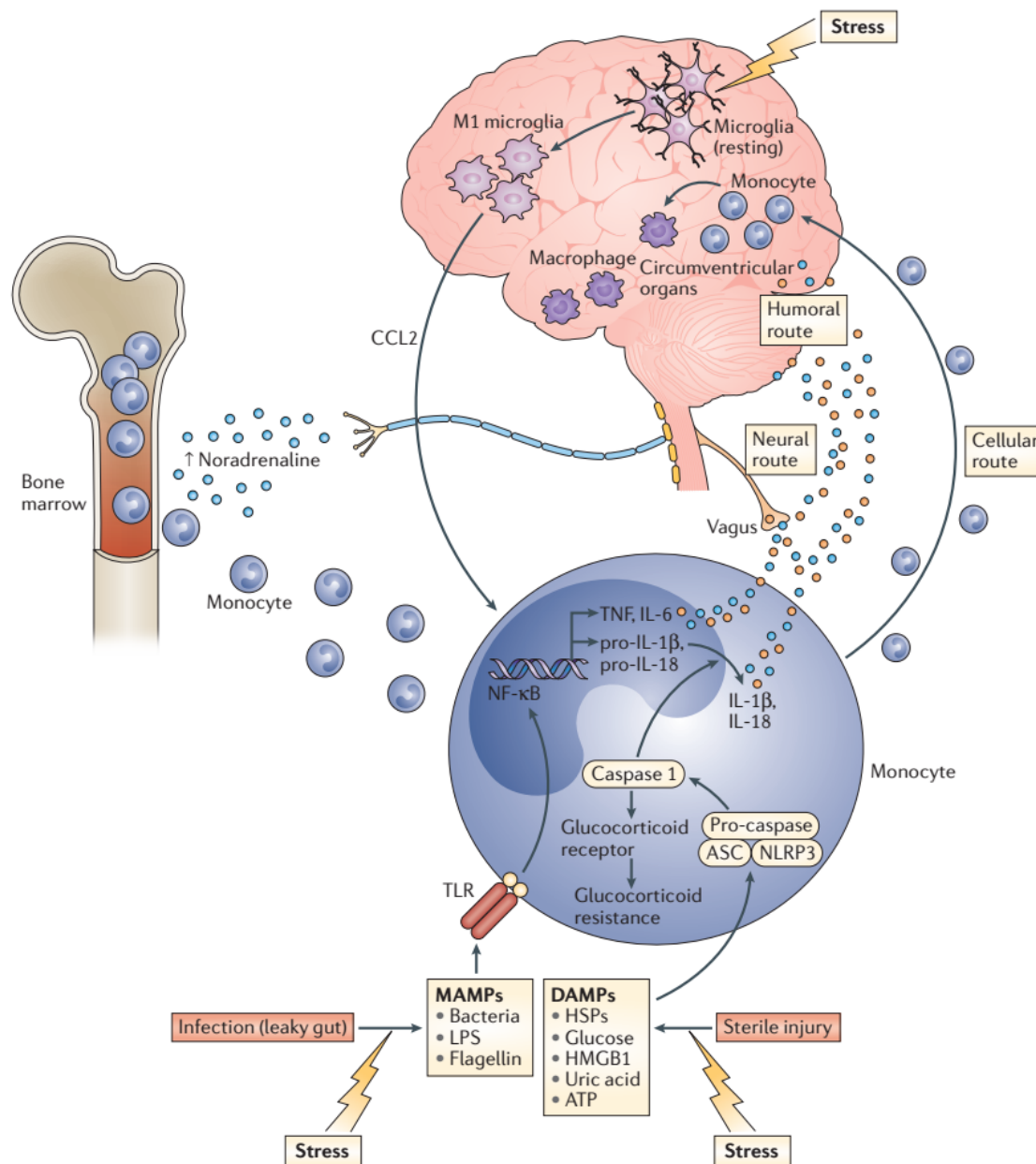


Figura 18: Mecanismos imunes associados ao MDD. O desenvolvimento da depressão envolve a maturação dos monócitos para um estado inflamatório. A depressão é capaz de estimular a síntese de DAMPs, cujo papel é estimular, a síntese de Caspase 1 via ASC, NLRP3 e pro-caspase. A Caspase 1 ativa a pro-IL-1 β e a pro-IL-18 convertendo-as em IL-1 β e IL-18, respectivamente. Além disso, esta molécula é capaz de inibir a atividade dos receptores de glucocorticóides, promovendo a resistência ao cortisol. O estresse também é capaz de promover a redução da barreira epitelial intestinal, permitindo o extravasamento dos antígenos luminiais para a *lamina propria* e desencadear a síntese das MAMPs, as quais são capazes de estimular a síntese de NF- κ B pelos monócitos. O papel do NF- κ B estimular a síntese de IL-6, além de pro-IL-1 β e a pro-IL-18. Além disso, o estresse estimula as micróglias a produzirem CCL2 (do inglês - *CC-chemokine ligand 2*) cujo papel é atrair os monócitos circulantes para manter a inflamação no sistema nervoso. Traduções: Estresse (*stress*), infecção (*infection*), extravasamento intestinal (*leaky gut*), injúria

estéril (*sterile injury*), flagelina (flagellin), glicose (glucose), resistência ao glucocorticóide (*glucocorticoid resistance*), receptor de glucocorticóide (*glucocorticoid receptor*), monócito (*monocyte*), noradrenalina (*noradrenaline*), medula óssea (*bone marrow*), rota celular (*cellular route*), rota neural (*neural route*), rota humoral (*humoral route*), macrófago (*macrophage*), órgãos circumventriculares (*circumventricular organs*). Abreviações: HSP (proteína do choque térmico - *heat shock protein*), LPS (lipopolissacarídeo), TLR (receptores Toll - *Toll-like receptors*). Retirado de Miller e Raison, 2016.

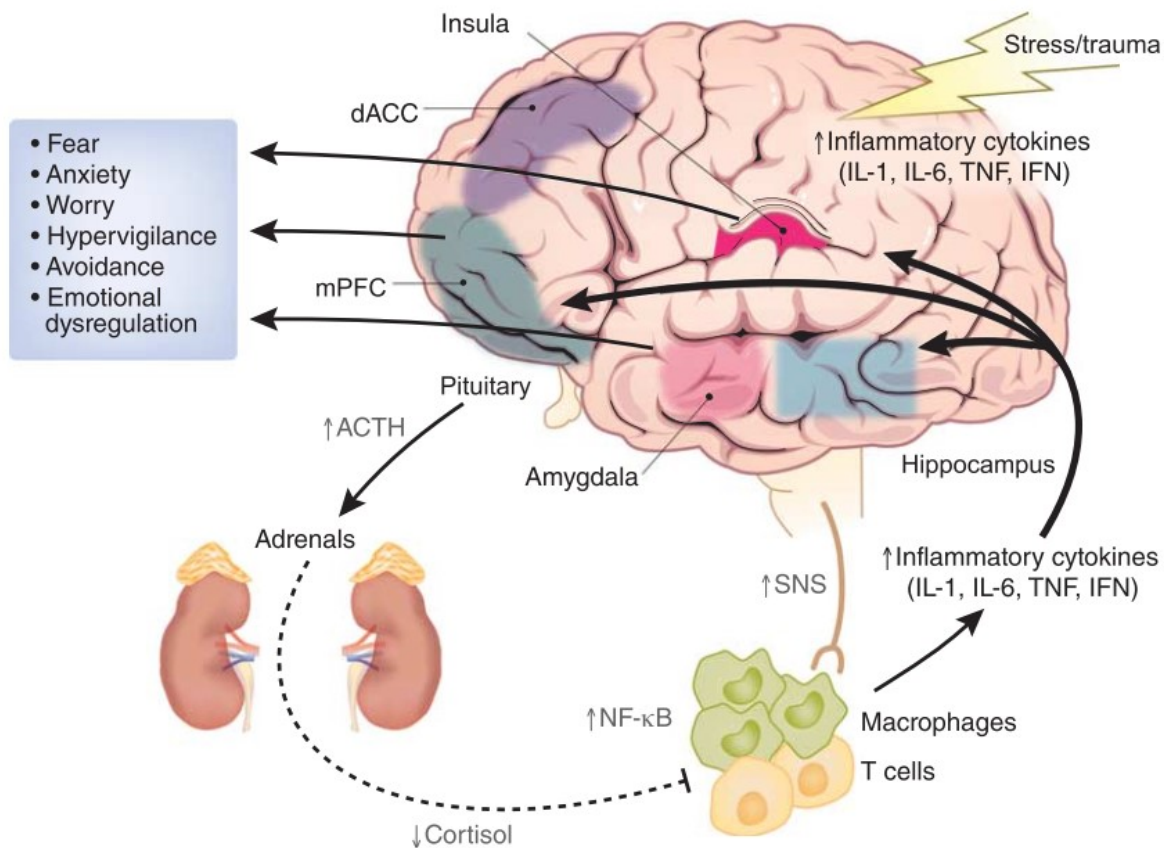


Figura 19: Mecanismos imunes associados à ansiedade. De forma semelhante ao MDD, o desenvolvimento do AD envolve o direcionamento do sistema nervoso central para um estado inflamatório. A hiperatividade do sistema nervoso simpático promove a produção de citocinas inflamatórias, as quais afetam a atividade nas regiões cerebrais associadas à etiologia da doença como a amígdalas cerebelosas, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (mPFC – do inglês *medial prefrontal cortex*). Traduções: Medo (*fear*), ansiedade (*anxiety*), preocupação (*worry*), hipervigilância (*hypervigilance*), comportamento de evitar (*avoidance*), desregulação emocional (*emotional dysregulation*), adrenais (*adrenals*), citocinas inflamatórias (*inflammatory cytokines*), macrófagos (*macrophages*), células T (*T cells*), hipocampo (*hippocampus*), amígdalas cerebelosas (*amygdala*), pituitária (*pituitary*). Retirado de Michopoulos *et al.*, 2017.

III.2. OBJETIVOS

III.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se *Weissella paramesenteroides* WpK4 possui papel psicobiótico em um modelo de estresse crônico em camundongos.

III.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar aspectos comportamentais e moleculares dos camundongos tratados e não tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 submetidos ou não ao estresse psicológico crônico, levando em consideração:

- (1) o comportamento social;
- (2) o desenvolvimento da ansiedade;
- (3) o desenvolvimento da depressão;
- (4) a imunomodulação hipocampal desencadeada pelos diferentes desafios e tratamentos.

III.3. METODOLOGIA

III.3.1 ENSAIO DE ESTRESSE CRÔNICO

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos descritos no item II.3.2 deste trabalho e foi aprovado pelo CETEA/UFMG (Protocolo 246/2016 – localizado no item II.6. Anexo). Neste experimento foram utilizados 32 camundongos, estabelecendo-se 4 grupos. Os ensaios de tratamento e indução do estresse foram divididos em duas fases: período pré-desafio (1° ao 10° dia) e desafio (11° ao 32° dia), os quais iniciaram quando os camundongos atingiram 5 semanas de idade, após o período de vermifugação. Para evitar um estresse excessivo dos animais, não houve gavagens neste ensaio, sendo que a concentração da *W. paramesenteroides* WpK4 foi calculada baseado em um consumo médio de 3mL de água por dia por cada camundongo. Dessa forma, foi estabelecida uma ingestão diária de 10^8 UFC da *W. paramesenteroides* WpK4. O estresse crônico foi induzido diariamente no período desafio (11° ao 32° dia), no qual os camundongos foram contidos em tubos plásticos ventilados (3cm de diâmetro por 12cm de comprimento) por duas horas, prevenindo-os de moverem livremente, mas não os pressionando. Durante a contenção, os camundongos não tiveram acesso à água e à ração, sendo imediatamente colocados em suas gaiolas com acesso livre à alimentação e à hidratação (O'Mahony *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2016; Chu *et al.*, 2016).

Em relação aos diferentes tratamentos, o primeiro (Ct) e o segundo (WpK4) grupos receberam *ad libidum*, respectivamente, água autoclavada e água contendo de 10^8 UFC da bactéria *W. paramesenteroides* WpK4 ao longo de todo o período experimental (**Tabela 3**). No terceiro grupo (Stress) os camundongos consumiram *ad libidum* água autoclavada e foram diariamente contidos a partir do 11° dia até o fim do ensaio. Assim como no terceiro grupo, os camundongos pertencentes ao quarto grupo (Wpk4Stress) receberam tratamento semelhante, mas consumiram *ad libidum* água contendo 10^8 UFC da bactéria *W. paramesenteroides* WpK4 (**Tabela 3**).

Os testes de sociabilidade, ansiedade e depressão foram realizados para avaliar a influência do estresse crônico, por meio da contenção forçada, e dos tratamentos no comportamento de cada camundongo, sendo realizados no 14° e no 21° dia após o início das contenções.

Tabela 3. Grupos e diferentes tratamentos com *Weissella paramesenteroides* WpK4 e/ou estresse crônico.

Grupo	Período Pré-desafio (1° ao 10° dia)	Desafio (11° ao 32° dia)
Ct	Consumo normal de água	Consumo normal de água
WpK4	Consumo diário de 10 ⁸ UFC de WpK4	Consumo diário de 10 ⁸ UFC de WpK4
Stress	Consumo normal de água	Contenções diárias
WpK4Stress	Consumo diário de 10 ⁸ UFC de WpK4	Consumo diário de 10 ⁸ UFC de WpK4; Contenções diárias

III.3.1.1 Avaliação do comportamento social

O ensaio de sociabilidade foi realizado de acordo com Desbonnet *et al.* (2014). Os camundongos foram colocados em um aparato transparente no formato de prisma retangular (36x20x20 cm) e divididos em três câmaras (lados direito e esquerdo 13x20x20 e centro 9x20x20) por partições transparentes com pequenas aberturas, permitindo aos animais o acesso a todos os compartimentos. O ensaio foi composto de uma fase de aclimação, na qual o camundongo avaliado teve livre acesso às três câmaras durante 5 minutos, e uma de sociabilidade, na qual o camundongo avaliado foi deparado com um desconhecido, um Swiss NIH, colocado em uma pequena gaiola localizada em uma das câmaras laterais (direita ou esquerda). A interação ou não entre os camundongos foi documentada e gravada em câmera digital durante o período de 10 minutos, sendo que o tempo despendido pelo camundongo teste em cada câmara foi medido.

III.3.1.2 Avaliação do comportamento tipo-ansioso

O ensaio de ansiedade foi realizando utilizando um labirinto em cruz elevado (Cryan and Holmes, 2005), compreendendo dois braços abertos perpendiculares a dois fechados, cujas dimensões do comprimento e da largura eram de 35 cm e 5 cm, respectivamente. Os braços fechados possuíam um “muro” de 15cm de altura ao seu entorno. O aparato, construído de acrílico fosco, foi mantido a uma altura de 60cm do chão durante as sessões de filmagens. Todos os camundongos experimentais foram previamente transferidos e mantidos por 30 minutos na sala de

filmagem para aclimação às condições ambientais. Para cada sessão, os camundongos foram colocados no centro do aparato e o tempo despedido nos braços abertos foi documentado durante 10 minutos. Estas medidas serviram como base para o estabelecimento de um índice de ansiedade (Komada *et al.*, 2008).

III.3.1.3 Avaliação do comportamento tipo-depressivo

O comportamento tipo-depressivo foi acessado pelo teste de suspensão pela cauda (Cryan and Holmes, 2005) no qual os camundongos foram mantidos suspensos em um aparato consistindo de uma haste vertical de 60 cm de altura associada a uma barra horizontal no seu topo. Um tubo cilíndrico de aproximadamente 4 cm de comprimento foi colocado ao redor da cauda dos camundongos a fim de se evitar o comportamento escalador normalmente observado na linhagem C57BL/6J. Uma fita adesiva de 17 cm foi utilizada para manter os camundongos suspensos na barra horizontal a uma altura aproximada de 45cm. Os movimentos dos camundongos associados ao escape foram documentados e o período de imobilidade foi medido ao longo de seis minutos de ensaio (Cryan *et al.*, 2005; Can *et al.*, 2011).

III.3.1.4 Análises moleculares de citocinas

No final do período experimental, os encéfalos dos camundongos foram removidos, embebidos e fixados em RNAlater (Ambion, Austin, Estados Unidos) e armazenados a -20°C até o seu processamento. Em seguida, os hipocampus foram delicadamente removidos de acordo com Spijker (2011) e o isolamento do RNA total, o tratamento com DNaseI e a síntese do cDNA foram realizados de acordo com item II.3.3.4 deste trabalho.

As reações de qPCR foram realizadas usando o kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e os primers gene-específicos para *Il1b* e *Il6* descritos por Giulietti *et al.* (2001). Os genes constitutivos codificadores da beta-actina (*Actb*) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foram usados como referência para as normalizações (Giulietti *et al.*, 2001). As reações foram otimizadas ajustando a concentração dos primers para uma especificidade e eficiência ótimas (**Tabela 4**). Os níveis de expressão gênica do grupo controle, sem qualquer tipo de tratamento, foram usados como calibradores e os resultados

obtidos dos grupos experimentais foram apresentados graficamente como razão de quantidades (*fold change*), usando as médias e os desvios padrões da expressão gênica dos alvos estudados de acordo com Hellemans *et al.* (2007).

III.3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no pacote estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos). O teste de Shapiro Wilk foi usado para avaliar se os dados possuíam uma distribuição normal. Neste caso, as amostras paramétricas foram submetidas a análises da variância das médias, realizando múltiplas comparações entre os diferentes tratamentos ou grupos de dados (*one-way* Anova) seguido do teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias obtidas. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando os valores dos níveis de significância eram maiores que 95% ($p < 0,05$).

Tabela 4. Primers e condições de amplificação utilizados neste trabalho.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Referência
Primers	Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Il1bF	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	250	40.00	-3.52	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			Il1bR	GATCCACACTCTCCAGCTGCA				
	Interleukin 6	<i>Il6</i>	IL6F	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	250	4.00	-3.35	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			IL6R	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA				
	Actin, beta	<i>Actb</i>	bActF	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	250	3.25	-3.37	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			bActR	CAATAGTGATGACCTGGCCGT				
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	GapdgF	TCACCACCATGGAGAAGGC	250	3.25	-3.42	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			GapdhR	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA				

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidade de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou a eficiência das reações de qPCR, a qual variou de 92.35% (slope igual a -3.52) a 98.84% (slope igual a -3.35).

III.4. RESULTADOS

III.4.1 A *Weissella paramesenteroides* WpK4 REDUZIU OS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIOSO E TIPO-DEPRESSIVO EM CAMUNDONGOS CRONICAMENTE ESTRESSADOS

Visando identificar alterações comportamentais dos camundongos psicologicamente estressados associados aos diferentes tipos de tratamentos foram realizados os testes de sociabilidade, de ansiedade e de depressão nos animais no 14° e no 21° dia após o início das contenções forçadas.

Em relação ao ensaio de sociabilidade, no 14° dia não houve diferenças estatísticas entre os diferentes grupos (dados não mostrados). No 21°, apesar das contenções não terem reduzido a sociabilidade dos camundongos (grupo Stress), foi observado que camundongos tratados apenas com a *W. paramesenteroides* WpK4 apresentaram maior sociabilidade, ficando por um tempo estatisticamente maior no compartimento o qual o camundongo desconhecido permanecia em comparação com os outros grupos (**Figura 20**).

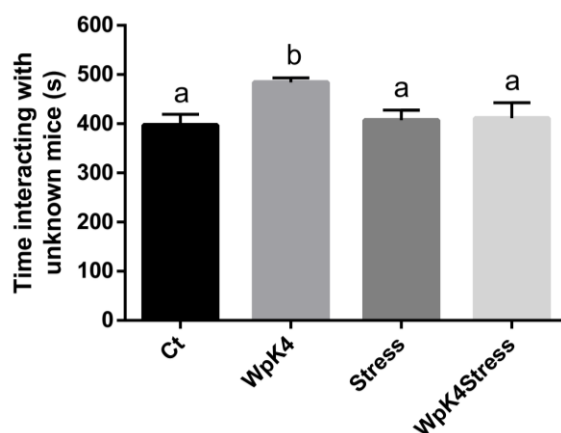


Figura 20: A *W. paramesenteroides* WpK4 aumentou a sociabilidade dos camundongos após 21 dias de contenção forçada. A sociabilidade dos camundongos (*Time interacting with unknown mice*) pertencentes aos grupos Ct, WpK4Stress e Stress foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, Stress – camundongos cronicamente estressados, WpK4Stress – camundongos cronicamente estressados e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4.

Em seguida foi realizado o teste de ansiedade. Neste ensaio, camundongos cronicamente estressados desenvolveram um comportamento tipo-ansioso somente no 21° dia desse modo, as comparações estatísticas foram realizadas somente neste período. Como observado na **Figura 21**,

o tratamento com a *W. paramesenteroides* WpK4 foi capaz de aumentar o tempo despendido pelos camundongos cronicamente estressados nos braços abertos do labirinto em cruz (grupo WpK4Stress), resultando em um comportamento menos ansioso.

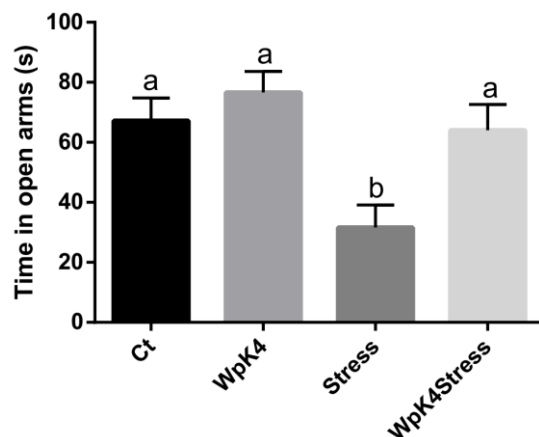


Figura 21: A *W. paramesenteroides* WpK4 reduziu a ansiedade dos camundongos após 21 dias de contenção forçada. O tempo de permanência nos braços abertos pelos camundongos (*Time in open arms*) pertencentes ao grupo Ct, WpK4 e WpK4Stress foram semelhantes entre si ($p>0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, Stress – camundongos cronicamente estressados, WpK4Stress – camundongos cronicamente estressados e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4.

Nos ensaios de suspensão pela cauda, os camundongos estressados e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 tiveram a imobilidade reduzida no 14º e no 21º dia quando comparados com aqueles que foram somente contidos (**Figura 22**).

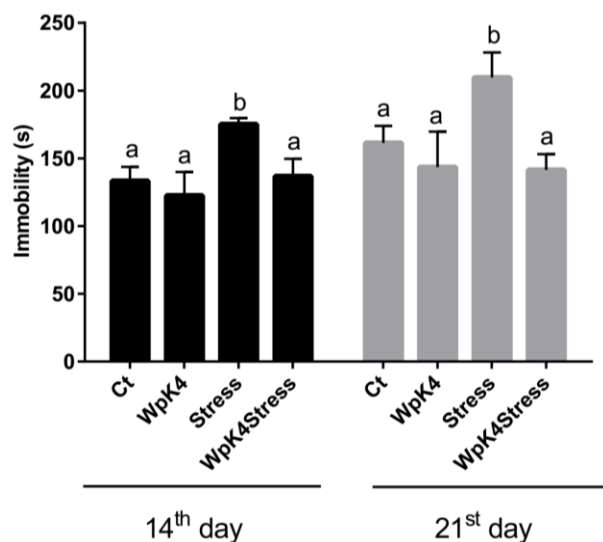


Figura 22: A *W. paramesenteroides* WpK4 reduziu o comportamento tipo-depressivo dos camundongos após 14 e 21 dias de contenção forçada. A imobilidade dos camundongos

(*Immobility*) pertencentes ao grupo Ct, WpK4 e WpK4Stress foram semelhantes entre si ($p>0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, Stress – camundongos cronicamente estressados, WpK4Stress – camundongos cronicamente estressados e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4.

III.4.2 A REDUÇÃO DOS COMPORTAMENTOS TIPO-ANSIOSO E TIPO-DEPRESSIVO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS FOI ASSOCIADA À IMUNOMODULAÇÃO HIPOCAMPAL DESENCADEADA PELA INJESTÃO DA *W. paramesenteroides* WpK4

Ao comparar a expressão gênica relativa de moléculas do sistema imune entre os diferentes grupos de camundongos, foi observado que no contexto do estresse crônico (grupo WpK4Stress) a *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduziu a expressão de moléculas pró-inflamatórias (**Figura 23**).

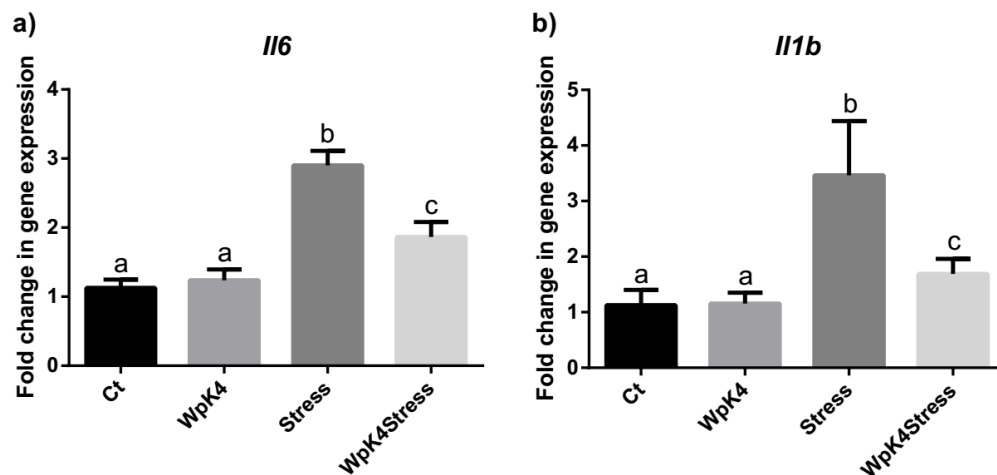


Figura 23: Imunomodulação do hipocampo dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental. Camundongos estressados e tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 tiveram a expressão de **a) *Il6*** e de **b) *Il1b*** reduzidas (grupo WpK4Stress). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, Stress – camundongos estressados, WpK4Stress – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

III.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, R., Whear, R., Nikolaou, V., Bethel, A., Coon, J. T., Stein, K., *et al.* (2015). Tumour necrosis factor- α inhibitor therapy in chronic physical illness: A systematic review and meta-analysis of the effect on depression and anxiety. *J. Psychosom. Res.* 79, 175–184. doi: 10.1016/j.jpsychores.2015.04.008.
- Aizawa, E., Tsuji, H., Asahara, T., Takahashi, T., Teraishi, T., Yoshida, S., *et al.* (2016). Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 202, 254–257. doi: 10.1016/j.jad.2016.05.038.
- Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., and Gould, T. D. (2011). The Tail Suspension Test. *J. Vis. Exp.*, 3–7. doi:10.3791/3769.
- Chu, X., Zhou, Y., Hu, Z., Lou, J., Song, W., Li, J., *et al.* (2016). 24-Hour-Restraint Stress Induces Long-Term Depressive-Like Phenotypes in Mice. *Sci. Rep.* 6, 32935. doi:10.1038/srep32935.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., and Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 571–625. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.
- Cryan, J. F., and Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4, 775–790. doi:10.1038/nrd1825.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol. Psychiatry* 19, 146–8. doi:10.1038/mp.2013.65.
- Dinan, T. G., Stanton, C., and Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biol. Psychiatry* 74, 720–726. doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.001.
- Drago, A., Crisafulli, C., Calabrò, M., and Serretti, A. (2015). Enrichment pathway analysis. The inflammatory genetic background in Bipolar Disorder. *J. Affect. Disord.* 179, 88–94. doi:10.1016/j.jad.2015.03.032.
- Fung, T. C., Olson, C. A., and Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Publ. Gr.* 20. doi:10.1038/nm.4476.
- Giulietti, a, Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.

- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., *et al.* (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain. Behav. Immun.* 48, 186–194. doi:10.1016/j.bbi.2015.03.016.
- Komada, M., Takao, K., and Miyakawa, T. (2008). Elevated plus maze for mice. *J. Vis. Exp.*, 2007–2009. doi:10.3791/1088.
- Le, C. P., Nowell, C. J., Kim-Fuchs, C., Botteri, E., Hiller, J. G., Ismail, H., *et al.* (2016). Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat. Commun.* 7, 10634. doi:10.1038/ncomms10634.
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., *et al.* (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* 105, 755–764. doi:10.1017/S0007114510004319.
- Michopoulos, V., Powers, A., Gillespie, C. F., Ressler, K. J., and Jovanovic, T. (2017). Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology* 42, 254–270. doi:10.1038/npp.2016.146.
- Miller, A. H., Maletic, V., and Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol. Psychiatry* 65, 732–741. doi:10.1016/j.biopsych.2008.11.029.
- Miller, A. H., and Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 22–34. doi:10.1038/nri.2015.5.
- Mohammadi, A. A., Jazayeri, S., Khosravi-Darani, K., Solati, Z., Mohammadpour, N., Asemi, Z., *et al.* (2016). The effects of probiotics on mental health and hypothalamic–pituitary–adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutr. Neurosci.* 19, 387–395. doi:10.1179/1476830515Y.0000000023.
- O'Donovan, A., Cohen, B. E., Seal, K. H., Bertenthal, D., Margaretten, M., Nishimi, K., *et al.* (2015). Elevated risk for autoimmune disorders in iraq and afghanistan veterans with posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 77, 365–374. doi:10.1016/j.biopsych.2014.06.015.
- O'Mahony, C. M., Sweeney, F. F., Daly, E., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2010). Restraint stress-induced brain activation patterns in two strains of mice differing in their anxiety behaviour. *Behav. Brain Res.* 213, 148–154. doi:10.1016/j.bbr.2010.04.038.
- Petra, A. I., Panagiotidou, S., Hatzigelaki, E., Stewart, J. M., Conti, P., and Theoharides, T. C. (2015). Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. *Clin. Ther.* 37, 984–995. doi:10.1016/j.clinthera.2015.04.002.

- Slavich, G. M., and Irwin, M. R. (2014). From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol. Bull.* 140, 774–815. doi:10.1037/a0035302.
- Spijker, S. (2011). “Dissection of Rodent Brain Regions BT - Neuropoteomics” in, ed. K. W. Li (Totowa, NJ: Humana Press), 13–26. doi:10.1007/978-1-61779-111-6_2.
- Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., *et al.* (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host’s metabolism. *Mol. Psychiatry* 21, 786. doi:10.1038/mp.2016.44.

CAPÍTULO IV

**O Citalopram e a *Weissella paramesenteroides* WpK4
reduziram a permeabilidade intestinal em camundongos
estressados com colite, regulando moléculas constituintes da
barreira epitelial, do sistema imune e do sistema
enteroendócrino**

IV.1. O PAPEL DA DEPRESSÃO NO DESENVOLVIMENTO E NA REMISSÃO DA COLITE

A relação entre o IBD e as desordens emocionais, como a depressão, é bastante complexa e envolve vias metabólicas sobrepostas, podendo determinar comorbidade (Gracie *et al.*, 2018). Como discutido anteriormente, o desenvolvimento do IBD é bastante complexo e envolve vários fatores, entretanto a causa mais significativa permanece desconhecida e a alta prevalência da depressão em pacientes com IBD tem levado os médicos e os pesquisadores da área a sugerirem que o estresse neuropsiquiátrico possa impactar, significativamente, no curso da doença (Ananthakrishnan, 2013). Ghia *et al.*, (2009), por exemplo, observaram em um modelo murino de colite quiescente que a indução da depressão era capaz de reativar processos inflamatórios na mucosa intestinal, determinando alterações histopatológicas significativas. Mais recentemente, estudos em populações humanas vêm demonstrando que o efeito da comorbidade sobre o curso clínico do IBD pode agravar o prognóstico dos pacientes de tal forma a aumentar o número de episódios de crises inflamatórias, de cirurgias intestinais e menor resposta à diferentes tipos de tratamento (Neuendorf *et al.*, 2016; Frolkis *et al.*, 2018; Gracie *et al.*, 2018; Kochar *et al.*, 2018). Além disso, tem sido observado que pacientes com IBD são mais susceptíveis a experienciar a depressão ao longo da vida (Gracie *et al.*, 2018). Apesar destas e outras observações clínicas e experimentais, ainda não é sabido se, de fato, a depressão é uma consequência ou um fator etiológico para o desenvolvimento do IBD (Hall *et al.*, 2018).

Do ponto de vista metabólico, o desenvolvimento do IBD e da depressão envolvem mecanismos de respostas do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo, de forma a alterar a regulação do sistema imune, desencadeando a inflamação (Sgambato *et al.*, 2017). Uma das consequências mais relevantes do estresse, incluindo a depressão, é a sua capacidade de alterar a liberação de mediadores inflamatórios, determinando maior permeabilidade intestinal (Soderholm *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2015). Como revisado no Capítulo 1, a redução da barreira epitelial permite o extravasamento dos antígenos luminiais para a *lamina propria*, estimulando a maturação e a proliferação local de linfócitos T CD4⁺ inflamatórios, os quais podem contribuir para a inflamação ao nível sistêmico, impactando ainda mais a cognição (Sgambato *et al.*, 2017).

Uma abordagem mais recente sobre o manejo do IBD envolve a modulação do eixo intestino-cérebro através do uso de antidepressivos (Mikocka-Walus e Andrew, 2018). Na colite

experimental, por exemplo, foi observado que estes fármacos, incluindo o Citalopram, além dos seus efeitos diretos sobre o metabolismo dos neurotransmissores, são capazes de interferir nas respostas imunes intestinais via nervo vago, de forma a inibir a atividade dos macrófagos inflamatórios locais e determinar melhora sintomatológica (Ghia *et al.*, 2009; Mikocka-Walus e Andrew, 2018). Além disso, translacionalmente, o uso de antidepressivos tem melhorado a qualidade de vida dos pacientes com IBD, reduzindo as taxas de remissão, do uso de corticosteroides e o número de endoscopias (Mikocka-Walus e Andrew, 2018). Como visto anteriormente, uma outra abordagem sobre o manejo do IBD, envolve o uso de probióticos, os quais, através de seus papéis imunomodulatórios, também podem contribuir para a redução dos sintomas da depressão. Neste sentido, e levando em consideração os papéis benéficos do Citalopram, observados na literatura, e da *W. paramesenteroides* WpK4, observados nos Capítulos 2 e 3, este estudo tem por objetivo avaliar no cólon de camundongos o papel destes agentes nos contextos da colite, do estresse crônico e do estresse combinado com a colite.

IV.2. OBJETIVOS

IV.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os papéis do Citalopram e da *Weissella paramesenteroides* WpK4 nos cólons de camundongos estressados e com colite.

IV.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros de saúde dos camundongos tratados e não tratados com Citalopram ou *W. paramesenteroides* WpK4 e submetidos ou não ao estresse crônico associado à colite, levando em consideração:

- (1) a permeabilidade intestinal;
- (2) a modulação de moléculas constituintes da barreira epitelial;
- (3) a variação de peso;
- (4) a consistência e presença de sangue nas fezes;
- (4) as alterações na arquitetura da mucosa do cólon;
- (5) a imunomodulação local;
- (6) a modulação de moléculas enteroendócrinas.

IV.3. METODOLOGIA

IV.3.1 ENSAIO DE ESTRESSE CRÔNICO COMBINADO COM O DE COLITE

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos descritos no item II.3.2 deste trabalho e foi aprovado pelo CETEA/UFMG (Protocolo 246/2016 – localizado no item II.6. Anexo). Neste experimento foram utilizados 192 camundongos, sendo 96 machos e 96 fêmeas, estabelecendo-se 12 grupos para cada sexo. O ensaio foi dividido em duas fases: período de indução do estresse crônico (1° ao 21° dia) e período de indução da colite (22° ao 26° dia). Durante a primeira fase, os camundongos foram diariamente contidos por 2 horas durante 21 dias, de acordo com o item III.3.1. A partir do 22° dia, os camundongos estressados passaram a ingerir *ad libidum* água autoclavada contendo 1% de DSS até o dia da eutanásia (26° dia). Nesta fase, os animais continuaram a sofrer as contenções forçadas (**Figura 24**).

Para os tratamentos do estresse crônico e da colite, foram utilizados o Citalopram ou a *W. paramesenteroides* WpK4. Neste contexto, para evitar um estresse excessivo dos animais, não houve gavagens neste ensaio, sendo que as concentrações do antidepressivo Citalopram e da *W. paramesenteroides* WpK4 foram calculadas baseado em um consumo médio de 3mL de água por dia por cada camundongo. Dessa forma, foi estabelecida uma ingestão diária de 10^8 UFC da *W. paramesenteroides* WpK4 e de 0,3mg do Citalopram, equivalente a uma dose de 15mg/kg. Os grupos, tratamentos e desafios são esquematizados na **Figura 25**.

IV.3.1.1 Quantificação dos parâmetros de saúde

Ao longo de todo período experimental, os pesos dos animais foram mensurados. Além disso, a partir do 22° dia, a consistência e a presença de sangue nas fezes também passaram a ser monitoradas para o estabelecimento do DAI (do inglês *Disease Activity Index*) de acordo com o item II.3.3.1.

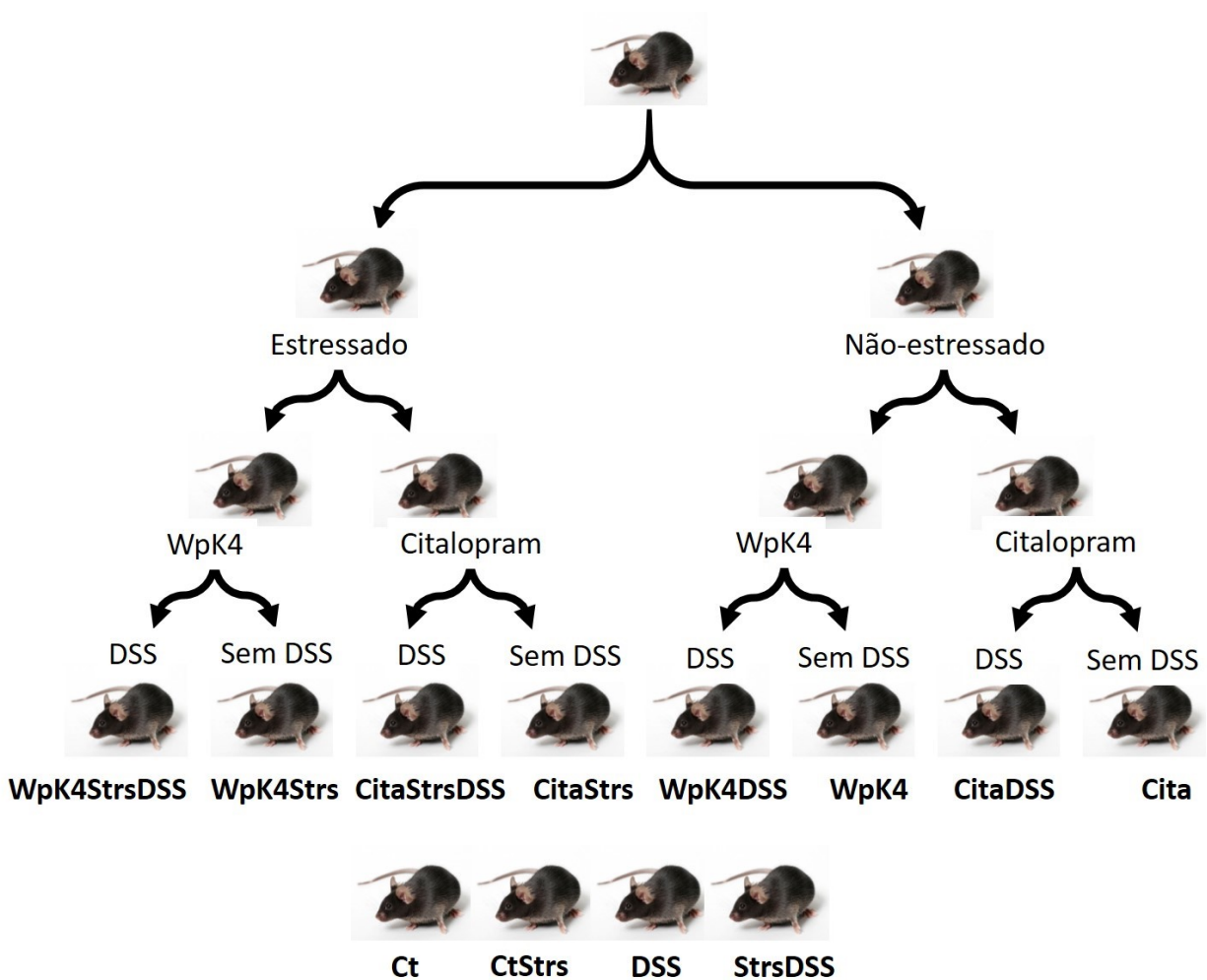


Figura 24. Grupos controles e experimentais estabelecidos no ensaio de estresse crônico combinado com o de colite. 96 camundongos machos e fêmeas foram divididos em dois grupos, um contendo 48 animais submetidos ao estresse crônico e o outro com animais não estressados. Estes camundongos, tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 ou com o Citalopram, foram desafiados ou não com DSS. Na base da figura: Ct – camundongos não-estressados sem qualquer tipo de tratamento; CtStrs – camundongos estressados sem qualquer tipo de tratamento; DSS – camundongos não-estressados com colite; StrsDSS – camundongos estressados e desafiados com DDS.

IV.3.1.2 Avaliação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada no último dia experimental e foi realizado no Laboratório de Radiofarmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais de acordo com o item II.3.3.2.

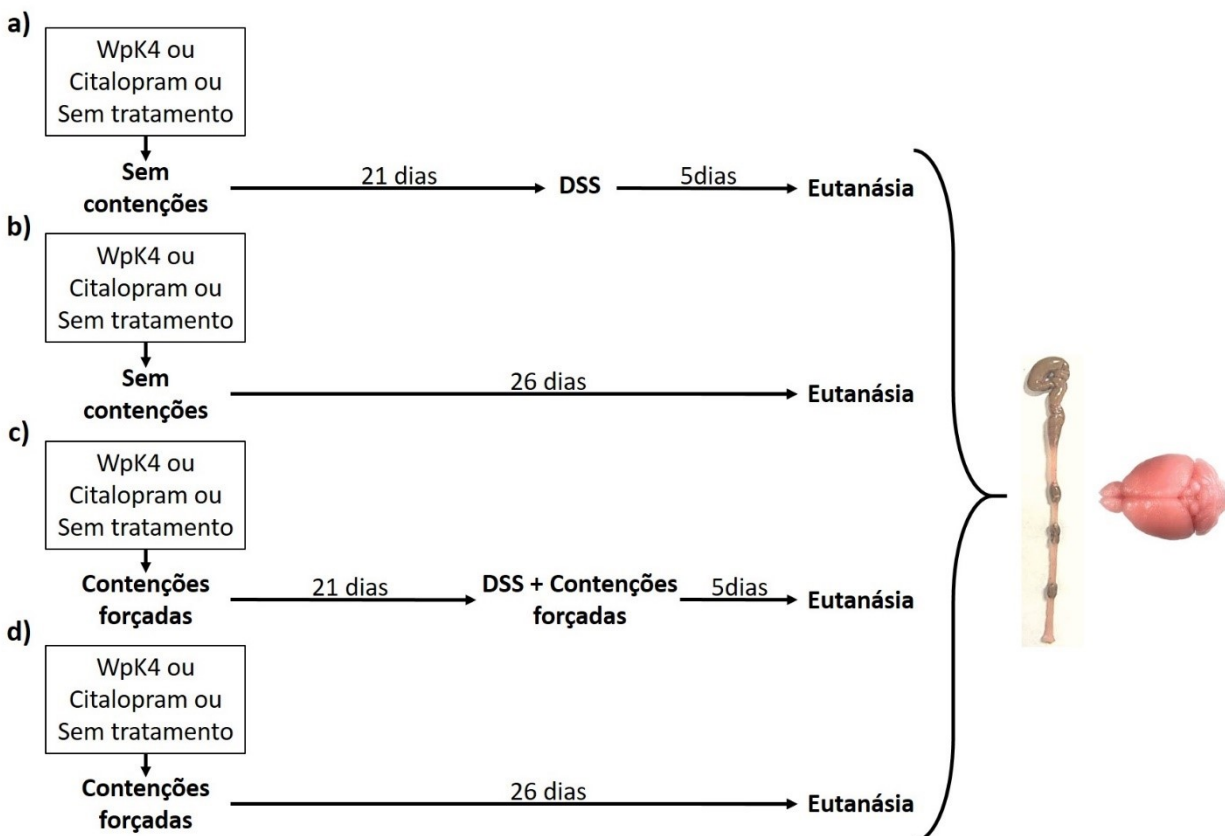


Figura 25. Desenho experimental do ensaio de estresse crônico combinado com o de colite.

a) Camundongos tratados ou não com WpK4 ou Citalopram consumiram DSS a partir do 22º dia até o final do ensaio. **b)** Camundongos controle tratados ou não com WpK4 ou Citalopram não sofreram qualquer tipo de desafio. **c)** Camundongos tratados ou não com WpK4 ou Citalopram foram submetidos ao estresse crônico durante todo o período experimental, a partir do 22º dia o DSS foi adicionado e mantido na água dos animais até a eutanásia. **d)** Os camundongos tratados ou não sofreram estresse durante todo o período experimental, mas não foram desafiados com o DSS. No final do período experimental, os camundongos foram profundamente sedados e eutanasiados, sendo coletado cólon e encéfalo de cada animal.

IV.3.1.3 Análises histopatológicas

O processamento do material foi realizado de acordo com o item II.3.3.3. Em todos os cortes histológicos a *lamina propria* foi manualmente delimitada, mensurando, em μm^2 , a sua área. Os dados obtidos dos animais dos grupos controles foram considerados como o padrão normal de área de *lamina propria*, sem infiltrado inflamatório. Já nos animais dos outros grupos, a

mensuração da área incluiu as células do infiltrado inflamatório, permitindo a avaliação quantitativa da inflamação através de metodologia descrita por Ferreira Júnior *et al.*, (2015).

IV.3.1.4 Análises moleculares

No final do período experimental, fragmentos de cólon, de aproximadamente 2 cm, foram embebidos e fixados em RNAlater (Ambion, Austin, Estados Unidos) e armazenados a -20°C até o seu processamento. O isolamento do RNA total, o tratamento com DNaseI e a síntese do cDNA foram realizados de acordo com item II.3.3.4 deste trabalho.

As reações de qPCR foram realizadas usando o kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e primers gene-específicos de moléculas reguladoras da imunidade (**Tabela 5**), do sistema enteroendócrino (**Tabela 6**), além de moléculas reguladoras da barreira epitelial (**Tabela 7**). Os genes constitutivos codificadores da beta-actina (*Actb*) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foram usados como referência para as normalizações (Giulietti *et al.*, 2001). As reações foram otimizadas ajustando a concentração dos primers para uma especificidade e eficiência ótimas (**Tabelas 5, 6 e 7**). Os níveis de expressão gênica do grupo controle, sem qualquer tipo de tratamento, foram usados como calibradores e os resultados obtidos dos grupos experimentais foram apresentados graficamente como razão de quantidades (*fold change*), usando as médias e os desvios padrões da expressão gênica dos alvos estudados de acordo com Hellemans *et al.* (2007).

IV.3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no pacote estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos). O teste de Shapiro Wilk foi usado para avaliar se os dados possuíam uma distribuição normal. Neste caso, as amostras paramétricas foram submetidas a análises da variância das médias, realizando múltiplas comparações entre os diferentes tratamentos ou grupos de dados (*one-way* Anova) seguido do teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias obtidas. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando os valores dos níveis de significância eram maiores que 95% ($p < 0,05$).

Tabela 5. Painel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da imunidade.

Molécula		Símbolo	Primer	Sequencia (5' -3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Reguladores da imunidade	Absent in melanoma 2	Aim2	Aim2F	AGGCTGCTACAGAAGTCTGTCC	250	3.25	-3.4	Cólon	Xie <i>et al.</i> , 2016
			Aim2R	TCAGCACCGTGACAACAAGTGG					
	Aryl-hydrocarbon receptor	Ahr	AhrF	CCAGGACCAGTGTAGAGCAC	250	3.25	-3.44	Cólon	Este estudo
			AhrR	AGCCATTTCAGCGCCTGTAAC					
	B cell leukemia/lymphoma 6	Bcl6	Bcl6F	AGGGACCTGTTACGAGATTATTG	250	3.25	-3.09	Cólon	Ohl <i>et al.</i> , 2016
			Bcl6R	GTCCCCGACCAAGCTCAGT					
	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	KcF	TGCACCCAAACCGAAGTCAT	250	3.25	-3.45	Cólon	Deriu <i>et al.</i> , 2013
			KcR	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC					
	Forkhead box P3	Foxp3	Foxp3F	CCTGCCTTGGTACATTCGTG	250	3.25	-3.45	Cólon	Parastouei <i>et al.</i> , 2016
			Foxp3R	TGTTGTGGGTGAGTGCTTTG					
	GATA binding protein 3	Gata3	Gata3F	GACTCTTCCCACCCAGCAGC	250	32.5	-3.27	Cólon	Schedel <i>et al.</i> , 2016
			Gata3R	CCATCTCGCCGCCACAG					
	Interferon (alpha and beta) receptor 1	Ifnar1	Ifn-ar1F	ACACCCTAAAGTGGAGCAGC	250	3.25	-3.34	Cólon	Este trabalho
			Ifn-ar1R	TTCGCCTCGTCTTTTGTTTCG					
	Interferon gamma	Ifng	IfnF	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	250	3.25	-3.09	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			IfnR	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG					
Interleukin 1 beta	Il1b	Il1bF	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	250	3.25	-3.34	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001	
		Il1bR	GATCCACACTCTCCAGCTGCA						
Interleukin 4	Il4	Il4F	GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG	250	32.5	-3.48	Cólon	Judd, <i>et al.</i> , 2016	
		Il4R	TCTTTCAGTGATGTGGACTTGGA						
Interleukin 9	Il9	Il9F	CGTCCCAACTGATGATTGTACC	250	32.5	-3.26	Cólon	Judd, <i>et al.</i> , 2016	
		Il9R	TGCATCTCTGTCTTCTGGAACG						
Interleukin 13	Il13	Il13F	GTGCCAAGATCTGTGTCTCTCC	250	32.5	-3.37	Cólon	Judd, <i>et al.</i> , 2016	
		Il13R	TTACAGAGGCCATGCAATATCC						
Interleukin 17A	Il17a	Il17aF	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	250	32.5	-3.43	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001	
		Il17aR	AGCTTTCCTCCGCATTGA						

Tabela 5 (continuação).

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Reguladores da imunidade	Interleukin 18	<i>Il18</i>	Il18F	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	250	3.25	-3.18	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			IF18R	TCTGACATGGCAGCCATTGT					
	Interleukin 21	<i>Il21</i>	Il21F	AAGATTCCTGAGGATCCGAGAAG	250	32.5	-2.99	Cólon	Ohl <i>et al.</i> , 2016
			Il21R	GCATTCGTGAGCGTCTATAGTGTC					
	Interleukin 22	<i>Il22</i>	Il22F	AGACAGGTTCCAGCCCTACA	250	32.5	-3.18	Cólon	Loonen <i>et al.</i> , 2014
			Il22R	CAGGTCCAGTTCCCAATC					
	Nitric oxide synthase 2, inducible	<i>Nos2</i>	iNosF	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	250	3.25	-3.37	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			iNosR	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG					
	NLR family, pyrin domain containing 3	<i>Nlrp3</i>	Nlrp3F	ATGGTATGCCAGGAGGACAG	250	3.25	-3.58	Cólon	Ng <i>et al.</i> , 2015
			Nlrp3R	ATGCTCCTTGACCAGTTGGA					
	NLR family, pyrin domain containing 6	<i>Nlrp6</i>	Nlrp6F	TGACCAGAGCTTCCAGGAGT	250	3.25	-3.61	Cólon	Seregin <i>et al.</i> , 2017
			Nlrp6R	TTAGCAGGCCAAAGAGGAA					
	Nucl. factor of κ light polypeptide enhancer in B cells	<i>Nfkb1</i>	NfkbF	ATGGCAGACGATGATCCCTAC	250	3.25	-3.22	Cólon	Bertolini <i>et al.</i> , 2017
			NfkbR	TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG					
	RAR-related orphan receptor gamma	<i>Rorc</i>	RorF	CAAGTCATCTGGGATCCACTAC	250	3.25	-3.58	Cólon	Parastouei <i>et al.</i> , 2016
			RorR	GCAGGAGTAGGCCACATTACA					
	Signal transducer and activator of transcription 3	<i>Stat3</i>	Stat3F	CATGTCAAACGTGAGCGACT	250	3.25	-3.23	Cólon	Filgueiras <i>et al.</i> , 2017
			Stat3R	GGAAATAACGGTGAAGGTGCT					
	Signal transducer and activator of transcription 4	<i>Stat4</i>	Stat4F	CCTGGGTGGACCAATCTGAA	250	3.25	-3.53	Cólon	Zaman <i>et al.</i> , 2016
			Stat4R	CTCGCAGGATGTCAGCGAA					
	Signal transducer and activator of transcription 5B	<i>Stat5b</i>	Stat5bF	CCAAGCCGTCACCCCG	250	32.5	-3.09	Cólon	Este trabalho
			Stat5bR	GGTTCACAACCTCGTTCTGC					
	Signal transducer and activator of transcription 6	<i>Stat6</i>	Stat6F	TGAGGTGGGGACCAGCCGG	250	3.25	-3.44	Cólon	Gong <i>et al.</i> , 2016
			Stat6R	GTGACCAGGACACACAGCGG					
	T-box 21	<i>Tbx21</i>	TbetF	CATTGCAGTGACTGCCTACC	250	3.25	-3.30	Cólon	Singh <i>et al.</i> , 2017
			TbetR	CACTCGTATCAACAGATGCG					
	Transforming growth factor, beta 1	<i>Tgfb1b</i>	TgfbF	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	250	3.25	-3.44	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			TgfbR	GGTTCATGTCATGGATGGTGC					
	Tumor necrosis factor	<i>Tnfa</i>	TnfaF	CATCTTCTCAAAATTTCGAGTGACAA	250	3.25	-3.29	Cólon	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			TnfaR	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC					

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidades de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência da reação de qPCR.

Tabela 6. Paineis de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas do sistema enteroendócrino.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Moléculas enteroendócrinas	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	<i>Ido1</i>	Ido1F	CCTTCTGGGAATAAAACACGAGG	250	3.25	-3.55	Cólon	Donley <i>et al.</i> , 2016
			Ido1R	CTAAGAAGAAAAGGAAGTTCCG					
	Protein S100-A10	<i>p11</i>	p11F	GGCCCAGGTTTCGACAGACT	250	3.25	-3.49	Cólon	Este estudo
			p11R	GGGAACTCCCGTTCCATGAG					
	Serotonin transporter 1	<i>Sert1</i>	SertF	TTCGCCCAGGACAACATCAC	250	3.25	-3.61	Cólon	Hata <i>et al.</i> , 2017
			SertR	TGACTGATGGATCTGCAGGACA					
	Tryptophan 2,3-dioxygenase	<i>Tdo2</i>	Tdo2F	TGGCAATTACTTGCAGTTGGA	250	3.25	-3.69	Cólon	Este estudo
			Tdo2R	GTGCTCGTCATGGATTTTGTC					
	Tryptophan hydroxylase 1	<i>Tph1</i>	Tph1F	ACTGCGACATCAGCCGAGAA	250	3.25	-3.57	Cólon	Hata <i>et al.</i> , 2017
			Tph1R	CGCAGAAGTCCAGGTCAGAAATC					

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidades de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência da reação de qPCR.

Tabela 7. Pannel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da barreira epitelial.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Barreira epitelial	Claudin 1	<i>Cldn1</i>	Cld1F	CTGGAAGATGATGAGGTGCAGAAGA	250	3.25	-3.26	Cólon	Tokumasu <i>et al.</i> , 2016
			Cld1R	CCACTAATGTCGCCAGACCTGAA					
	Occludin	<i>Ocln</i>	OclnF	CAGCCTTCTGCTTCATCG	250	3.25 4.00	-3.55	Cólon	Hu <i>et al.</i> , 2016
			OclnR	GTCGGGTTCCTCCCATTA					
	Tight junction protein 1	<i>Tjp1</i>	Tjp1F	GACCTTGAGCAGCCGTCATA	250	3.25	-3.47	Cólon	Hu <i>et al.</i> , 2016
			Tjp1R	CCGTAGGCGATGGTCATAGTT					
	Tight junction protein 2	<i>Tjp2</i>	Tjp2F	GGAGACCAGATTCTGAAGGTGAACACAC	250	3.25	-3.36	Cólon	Tokumasu <i>et al.</i> , 2016
			Tjp2R	ACCTTTGGGGATTCTAGCAGGTAGAGGAC					
	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	<i>Cxcl9</i>	CkmF	AGACAAGCATAAGACCGACCT	250	3.25	-3.45	Cólon	Lee <i>et al.</i> , 2017
			CkmR	AGGCAGAGTGTAACCCTTGAT					
	Myosin, light polypeptide kinase	<i>Mylk</i>	MylkF	CCAAGGACCGGATGAAGAAATA	250	3.25	-3.42	Cólon	DeLaughter <i>et al.</i> , 2016
			MylkR	CCCTGAGATCATTGCCATAGAG					
	Mucin 2	<i>Muc2</i>	Muc2F	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	250	3.25	-3.39	Cólon	Wlodarska <i>et al.</i> , 2011
			Muc2R	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC					

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidades de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência da reação de qPCR.

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 REDUZIRAM A PERMEABILIDADE INTESTINAL DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS E COM COLITE

Neste estudo foi observado que a permeabilidade intestinal dos camundongos foi aumentada nos contextos do estresse crônico (grupo CtStrs), da colite (DSS) e do estresse com colite (StrsDSS) e que os tratamentos com o Citalopram (grupos CitaStrs, CitaDSS e CitaStrsDSS) ou *W. paramesenteroides* WpK4 (grupos WpK4Strs, WpK4DSS e WpK4StrsDSS) tenderam a reduzir esta permeabilidade, independentemente do sexo dos camundongos (Figuras 26 e 27).

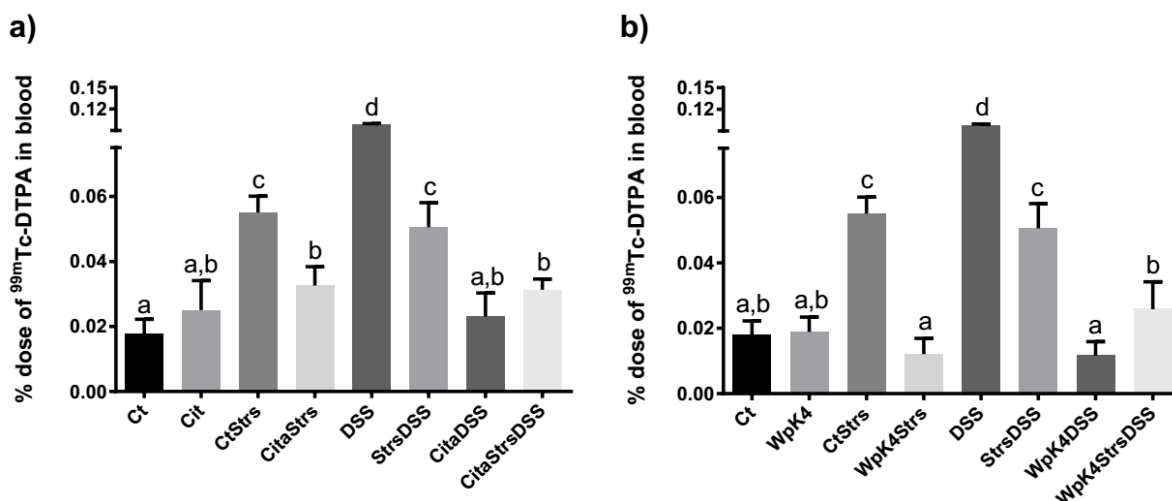


Figura 26. Permeabilidade intestinal dos camundongos fêmeas pertencentes a cada grupo experimental. Camundongos estressados, com colite e estressados com colite tratados com **a)** Citalopram (grupos CitaStrs, CitaDSS e CitaStrsDSS) ou **b)** *W. paramesenteroides* WpK4 (grupos WpK4Strs, WpK4DSS e WpK4StrsDSS) tiveram a permeabilidade intestinal reduzida em comparação àqueles não tratados (grupos CtStrs, DSS e StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

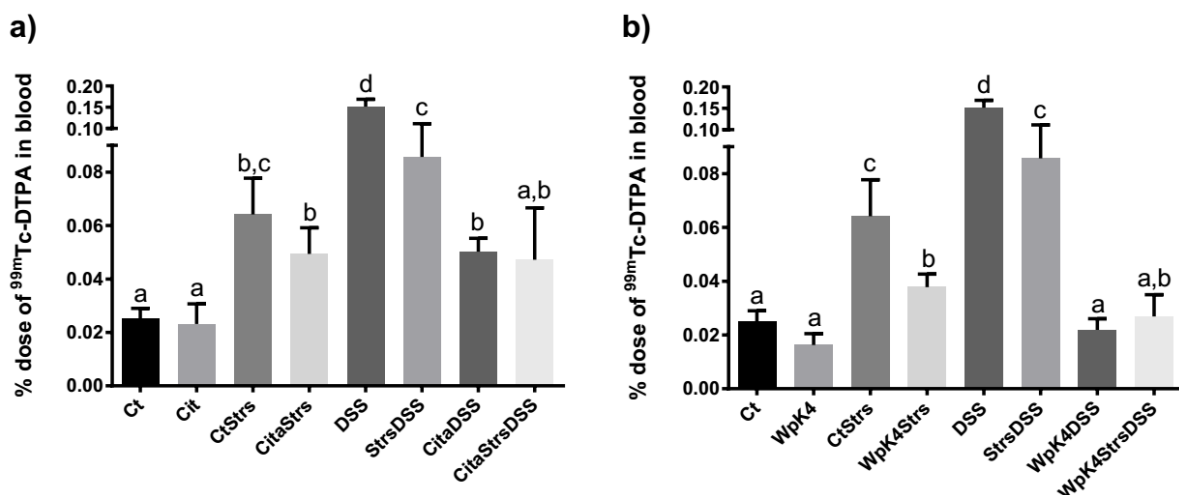


Figura 27. Permeabilidade intestinal dos camundongos machos pertencentes a cada grupo experimental. Camundongos estressados, com colite e estressados com colite tratados com **a)** Citalopram (grupos CitaStrs, CitaDSS e CitaStrsDSS) ou **b)** *W. paramesenteroides* WpK4 (grupos WpK4Strs, WpK4DSS e WpK4StrsDSS) tiveram a permeabilidade intestinal reduzida em comparação àqueles não tratados (grupos CtStrs, DSS e StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

IV.4.2 A REGULAÇÃO DAS MOLÉCULAS CONSTITUINTES DA BARREIRA EPITELIAL REDUZIU A PERMEABILIDADE INTESTINAL NOS GRUPOS TRATADOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4

Uma vez observadas alterações na permeabilidade intestinal entre os diferentes grupos, foi investigada a expressão gênica de moléculas reguladoras da barreira epitelial - *Cldn1*, *Ocln*, *Tjp1*, *Tjp2*, *Cxcl9*, *Mylk* e *Muc2*. Neste estudo, os camundongos fêmeas estressados (CtStrs) tiveram a expressão de *Ocln*, *Tjp1*, *Tjp2*, e *Muc2* reduzidos e a de *Mylk* aumentada em relação aos camundongos controle (Ct). Os tratamentos com Citalopram (CitaStrs) ou com WpK4 (WpK4Strs) regulou a expressão destes genes, de tal forma a reduzir a permeabilidade intestinal. O mesmo foi

observado nos camundongos estressados com colite, onde os tratamentos (CitaStrsDSS e WpK4StrsDSS) regularam a expressão dessas moléculas de forma semelhante (Figuras 28 e 29).

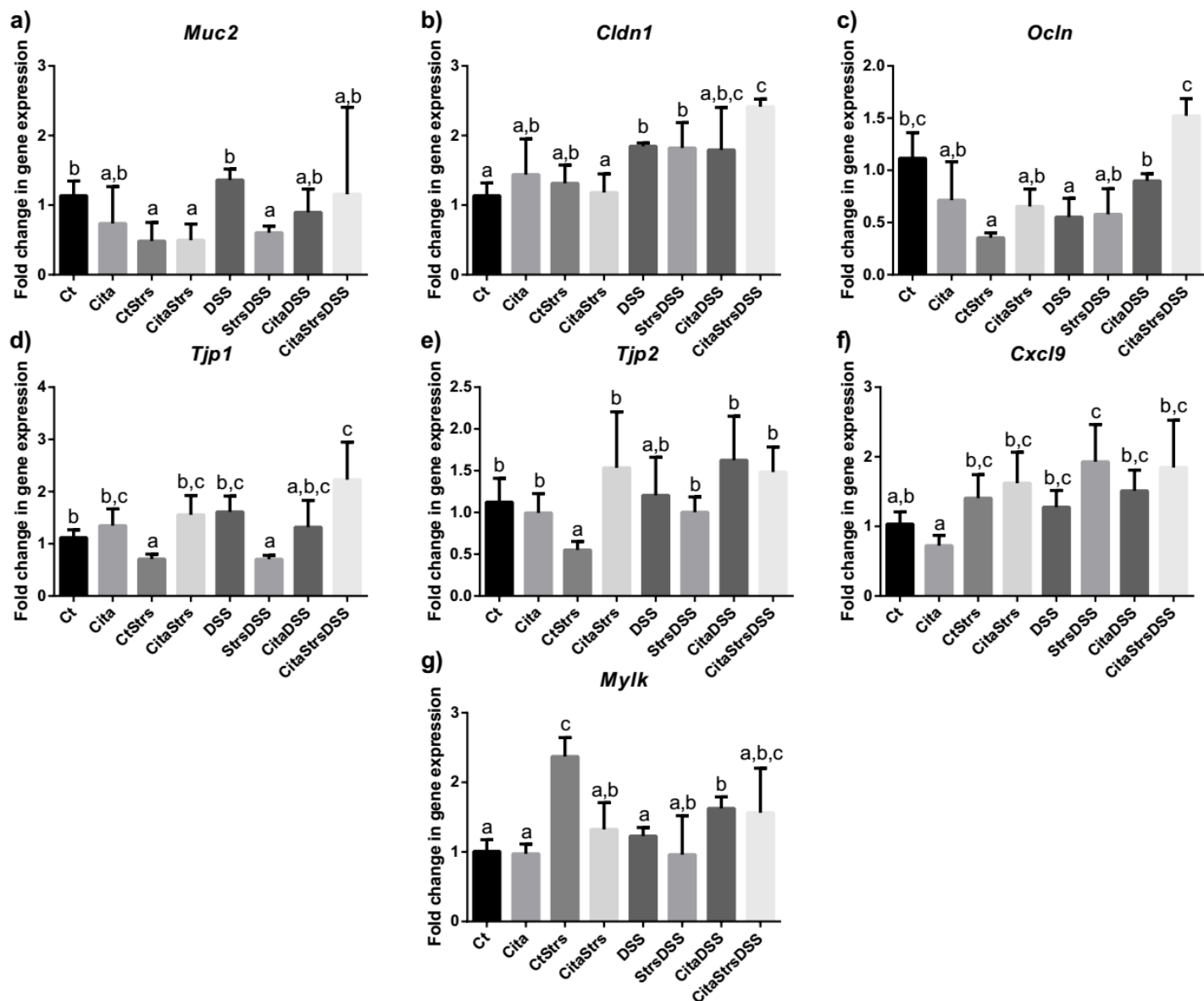


Figura 28. Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Camundongos estressados e tratados com Citalopram (CitaStrs) aumentaram a expressão de *Tjp1* e de *Tjp2* além de terem reduzido a de *Mylk* em comparação aos camundongos somente estressados (CtStrs). Os camundongos com colite e tratados com Citalopram (CitaDSS) tiveram a expressão da *Ocl* aumentado e a de *Mylk* reduzida em comparação aos camundongos com colite (DSS). Camundongos estressados com colite e tratado com Citalopram (CitaStrsDSS) tiveram a expressão de *Cldn1*, *Ocln* e *Tjp1* aumentados em comparação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não

receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

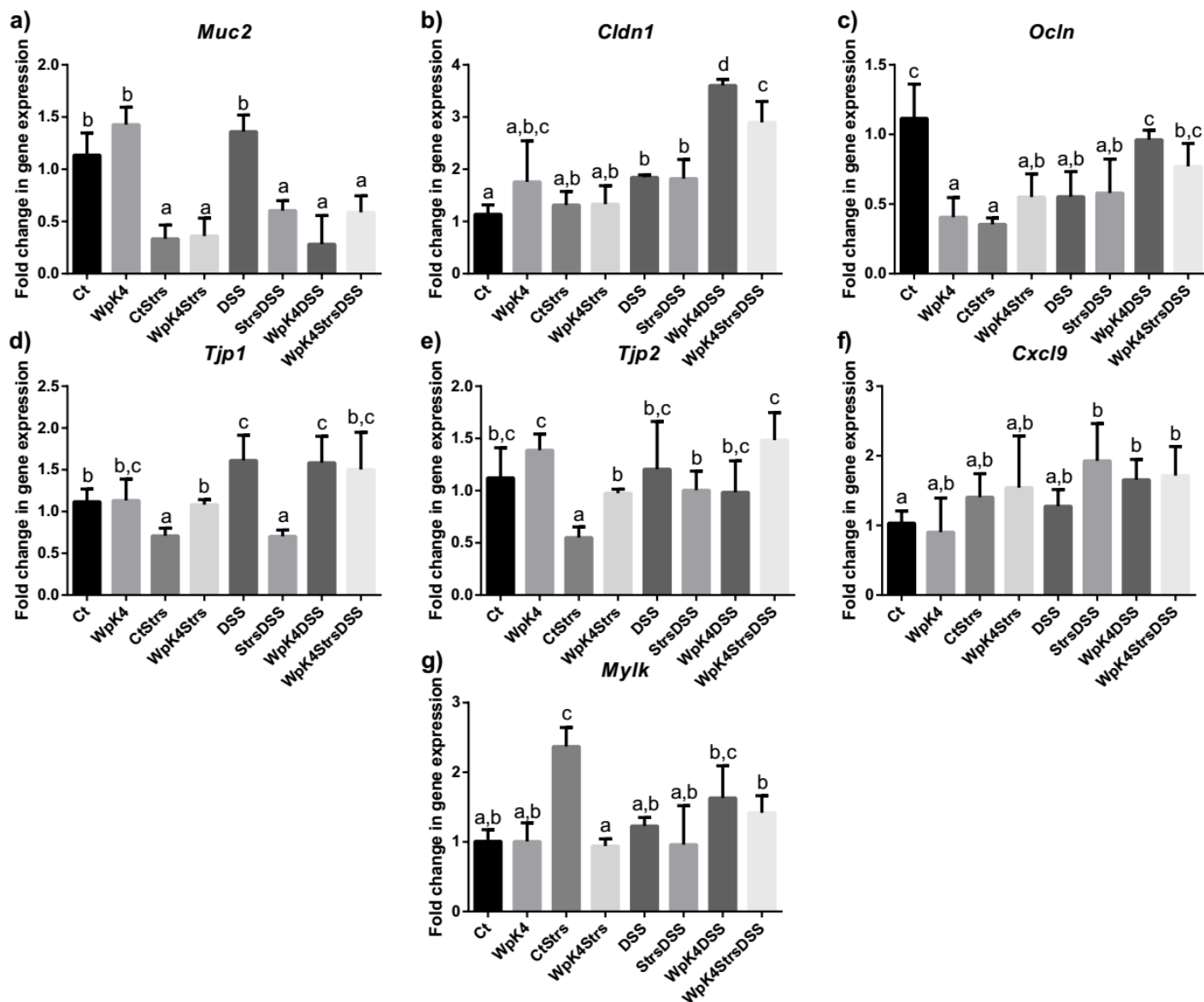


Figura 29. Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos fêmeas tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4. Camundongos estressados e tratados com WpK4 (WpK4Strs) aumentaram a expressão de *Tjp1* e de *Tjp2* além de terem reduzido a de *Mylk* em comparação aos camundongos somente estressados (CtStrs). Os camundongos com colite e tratados com a WpK4 (WpK4DSS) tiveram a expressão de *Cldn1* e *Ocln* aumentados em comparação aos camundongos com colite (DSS). Camundongos estressados com colite e tratado com a WpK4 (WpK4StrsDSS) tiveram a expressão de *Cldn1*, *Tjp1* e *Tjp2* aumentados em comparação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS). Letras diferentes

indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

Em relação aos camundongos machos, o estresse crônico aumentou a expressão de *Muc2*, *Tjp1* e *Mylk* e reduziu a de *Tjp2*, comparativamente ao grupo controle (Ct). Apesar disso, os camundongos estressados e tratados (CitaStrs e WpK4Strs) apresentaram uma menor permeabilidade intestinal o que pôde ser determinada por uma maior expressão de *Tjp2* (CitaStrs) ou *Cxcl9* (WpK4Strs), além de uma redução significativa de *Mylk*. No contexto do estresse crônico com colite, os tratamentos também modularam as moléculas constituintes da barreira epitelial de forma a reduzir a expressão de *Mylk*. Além disso, foi observado que a ingestão da WpK4 teve um impacto mais abrangente, aumentando a expressão de *Muc2*, *Tjp1* e *Tjp2* (**Figuras 30 e 31**).

Além disso, ao comparar os diferentes grupos de camundongos fêmeas desafiados, foi observado que os tratamentos com Citalopram ou WpK4 modificaram a expressão das mesmas moléculas - *Tjp1*, *Tjp2*, *Mylk*, *Ocln* e *Cldn1*. Nos camundongos machos, foi observado que o tratamento com o Citalopram modulou *Tjp2*, *Mylk* e *Muc2*, enquanto que o tratamento com a WpK4 modulou as mesmas moléculas, além de *Cxcl9* e *Tjp1*.

Também foi observado que os tratamentos nos camundongos fêmeas foi capaz de regular a expressão da *Ocln*, algo que não foi observado nos camundongos machos. Em contrapartida, foi observado que os tratamentos modificaram a expressão de *Muc2* e *Cxcl9* nos camundongos machos, mas não nos camundongos fêmeas, podendo indicar a existência de uma regulação sexo-dependente.

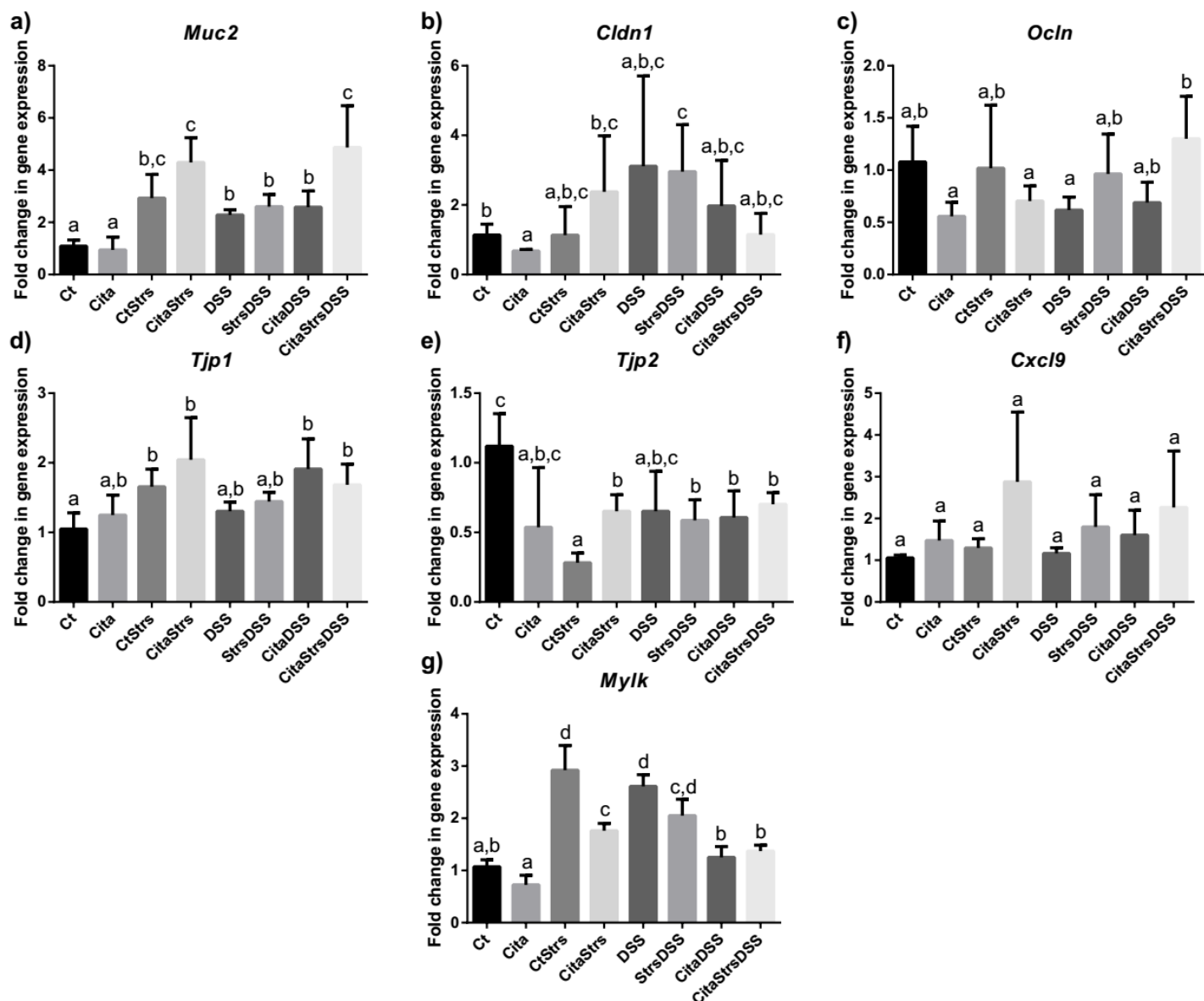


Figura 30. Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos machos tratados com Citalopram. Camundongos estressados e tratados com Citalopram (CitaStrs) aumentaram a expressão de *Tjp2* e reduziram a de *Mylk* em comparação aos camundongos somente estressados (CtStrs). Os camundongos com colite e tratados com Citalopram (CitaDSS) tiveram a expressão de *Mylk* reduzida em comparação aos camundongos com colite (DSS). Camundongos estressados com colite e tratado com Citalopram (CitaStrsDSS) tiveram a expressão de *Muc2* aumentado e o de *Mylk* reduzido em comparação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

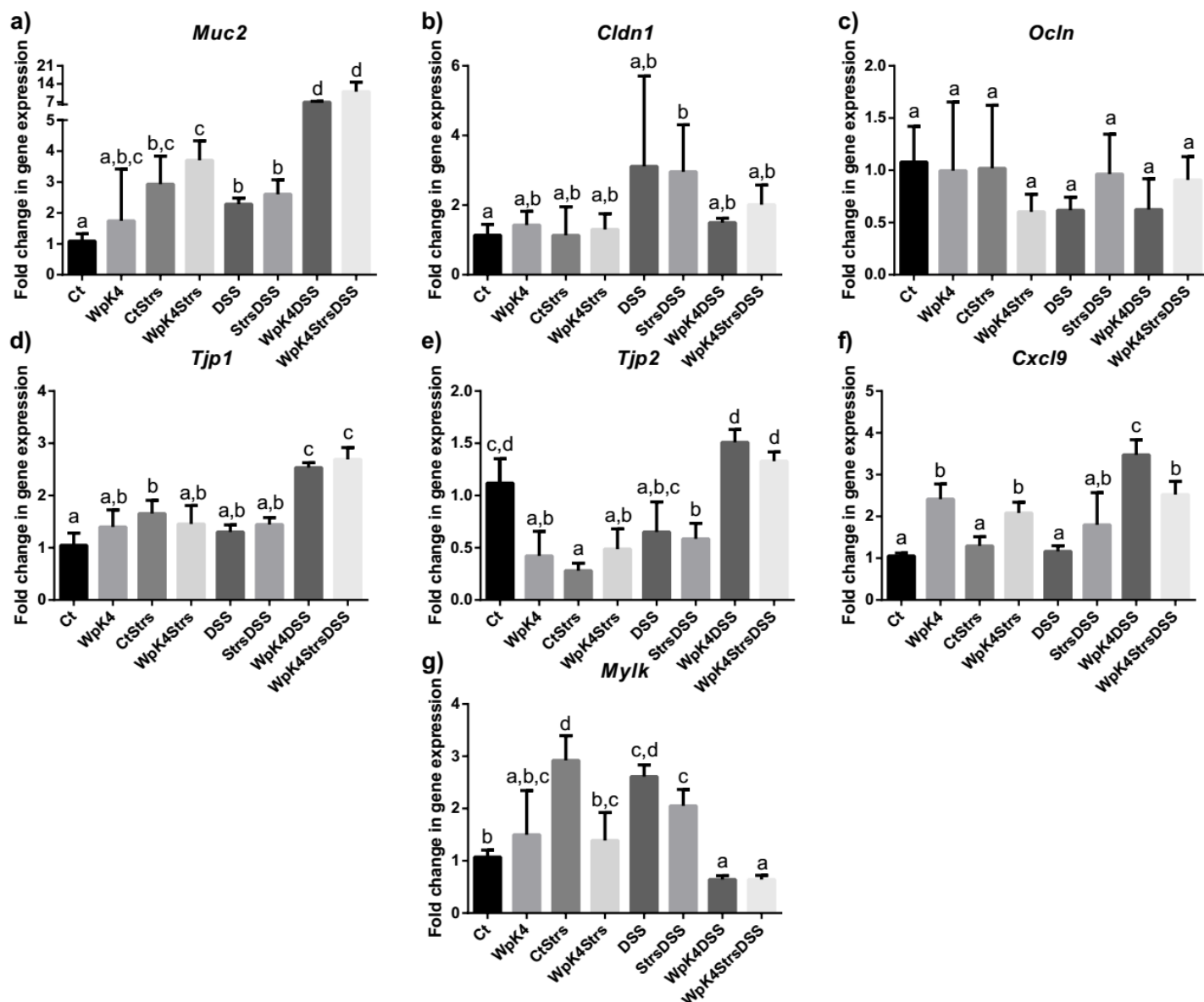


Figura 31. Expressão gênica de moléculas moduladoras da barreira intestinal nos camundongos machos tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4. Camundongos estressados e tratados com WpK4 (WpK4Strs) aumentaram a expressão de *Cxcl9* e reduziram a de *Mylk* em comparação aos camundongos somente estressados (CtStrs). Os camundongos com colite e tratados com a WpK4 (WpK4DSS) tiveram a expressão de *Muc2*, *Tjp1*, *Tjp2* e *Cxcl9* aumentados e a de *Mylk* reduzida em comparação aos camundongos com colite (DSS). Camundongos estressados com colite e tratado com a WpK4 (WpK4StrsDSS) tiveram a expressão de *Muc2*, *Tjp1* e *Tjp2* aumentados e a de *Mylk* reduzida em comparação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS –

camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

IV.4.3 O TRATAMENTO COM W. paramesenteroides WpK4 REDUZIU O INFILTRADO INFLAMATÓRIO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS E COM COLITE

A partir do 22º dia de experimento, quando os camundongos passaram a consumir o DSS, a variação de peso e a consistência e a presença de sangue nas fezes foram monitoradas para o estabelecimento de um índice de desenvolvimento da colite (DAI – *Disease Activity Index*), o qual não variou significativamente entre os diferentes grupos, indicando que os tratamentos e desafios submetidos aos camundongos neste ensaio não interferiram nestes parâmetros fisiológicos. Mesmo nos grupos desafiados com DSS, as variações de peso não foram significativas, isto porque a concentração de 1% de DSS administrada neste estudo foi menor daquela sugerida para o desenvolvimento de uma retocolite ulcerativa severa (a partir de 2,5%). Esta abordagem foi utilizada com a intenção de induzir um processo inflamatório mais ameno, de tal forma a não comprometer a arquitetura da mucosa colônica. Neste contexto, não foram observadas diferenças significativas entre os tamanhos dos cólons dos diferentes grupos de camundongos. Além disso, nas análises histopatológicas, não foram observadas áreas de colite ulcerativa nos cólons dos animais, apenas pequenas alterações das criptas com infiltrado inflamatório nos grupos desafiados com o DSS (**Figuras 32 e 33**). Nesta situação, independentemente do sexo, foi notado que os camundongos com colite e tratados com a WpK4 (grupo WpK4DSS) apresentaram áreas de infiltrado menores quando comparados aos grupos de camundongos com colite (grupo DSS). O mesmo foi observado nos camundongos estressados com colite e tratados com WpK4 (grupo WpK4StrsDSS - **Figuras 32 e 33**).

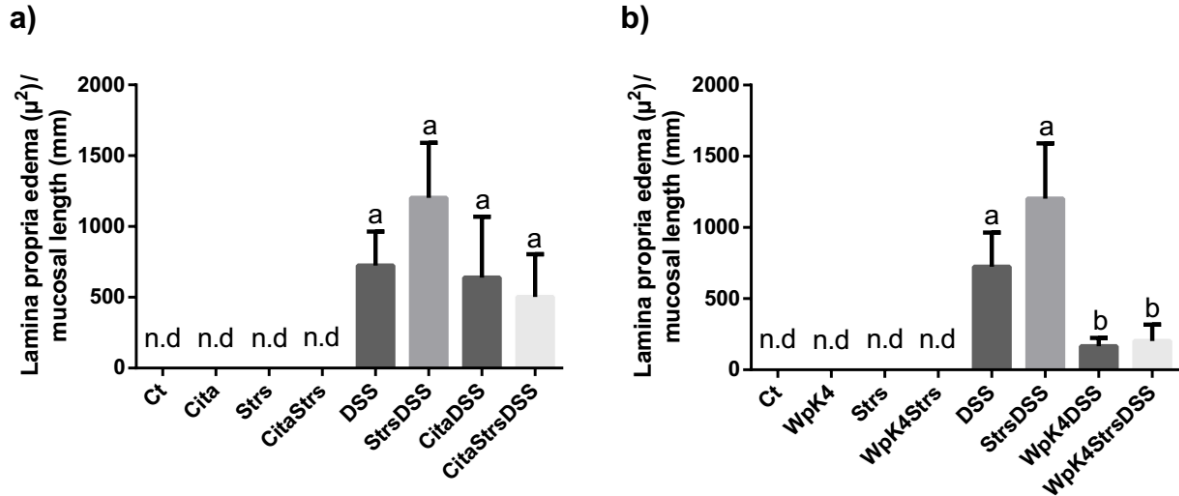


Figura 32. Infiltrado inflamatório nos cólons dos camundongos fêmeas pertencentes a cada grupo experimental. Camundongos com colite e estressados com colite tratados com a) Citalopram (grupos CitaDSS e CitaStrsDSS) não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os grupos não tratados (grupos DSS e StrsDSS). Em contrapartida, os camundongos tratados com b) *W. paramesenteroides* WpK4 (grupos WpK4DSS, WpK4StrsDSS) tiveram a área de infiltração inflamatória reduzida em comparação aos animais não tratados (grupos DSS e StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

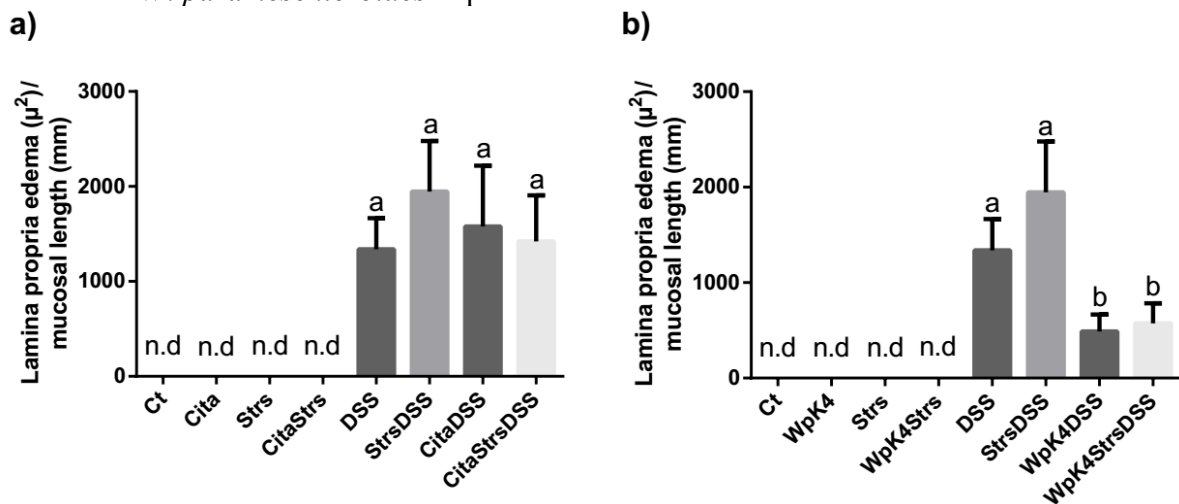


Figura 33. Infiltrado inflamatório nos cólons dos camundongos machos pertencentes a cada grupo experimental. Camundongos com colite e estressados com colite tratados com a) Citalopram (grupos CitaDSS e CitaStrsDSS) não apresentaram diferenças significativas quando

comparados com os grupos não tratados (grupos DSS e StrsDSS). Em contrapartida, os camundongos tratados com **b) *W. paramesenteroides* WpK4** (grupos WpK4DSS, WpK4StrsDSS) tiveram a área de infiltração inflamatória reduzida em comparação aos animais não tratados (grupos DSS e StrsDSS). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

IV.4.4 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE NO CÓLON DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS COM COLITE

Uma vez observada a presença de infiltrado inflamatório na mucosa colônica dos camundongos, foi realizado um ensaio de qPCR para verificar o tipo de resposta imune local desencadeado em função dos diferentes desafios e tratamentos. Neste estudo, foi observado que os camundongos fêmeas estressados (CtStrs) tiveram a expressão de *Il1b*, *Nlrp3*, *Nfkb1* e *Il22* aumentadas e a de *Ifnar1*, *Nlrp6* e *Ahr* diminuídas em relação aos camundongos controle (Ct). O tratamento com Citalopram (CitaStrs) reduziu a expressão de *IL17a*, *Il22*, *Nfkb1* e aumentou a de *Nos2*, *Aim2* e de *Ahr* em comparação aos camundongos estressados (CtStrs). No grupo dos camundongos com colite (DSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS) reduziu a expressão de *Il1b*, *Tnfa* e de *Cxcl1* e aumentou a de *Il17a*. Já os camundongos estressados com colite (StrsDSS) quando tratados com Citalopram (CitaStrsDSS) reduziram a expressão de *Tnfa*, *Nfkb1* e *Nos2* e aumentaram a de *Il22* e de *Nrlp6*, comparativamente aos camundongos que foram apenas desafiados (StrsDSS) (**Figura 34**).

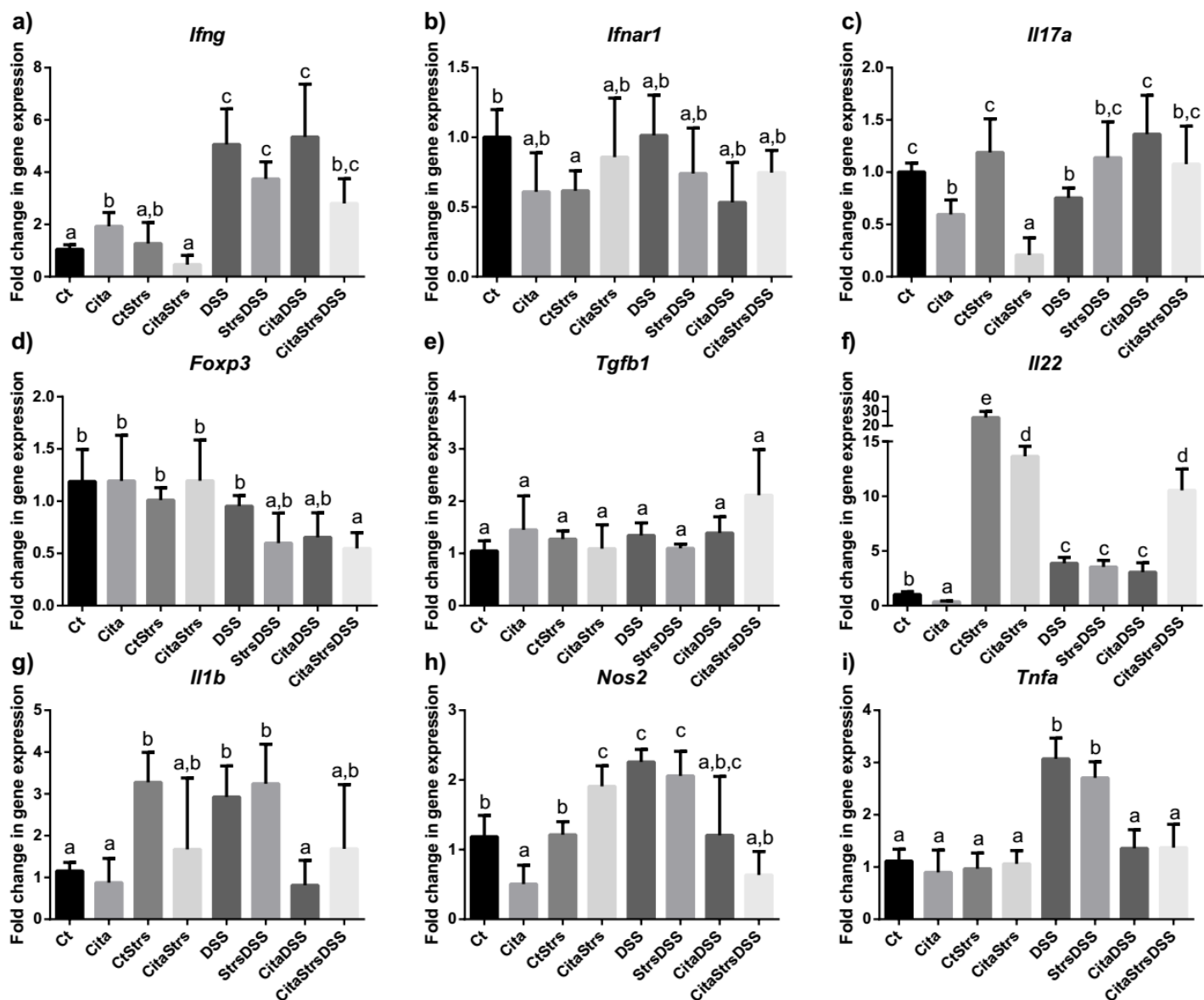


Figura 34. Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

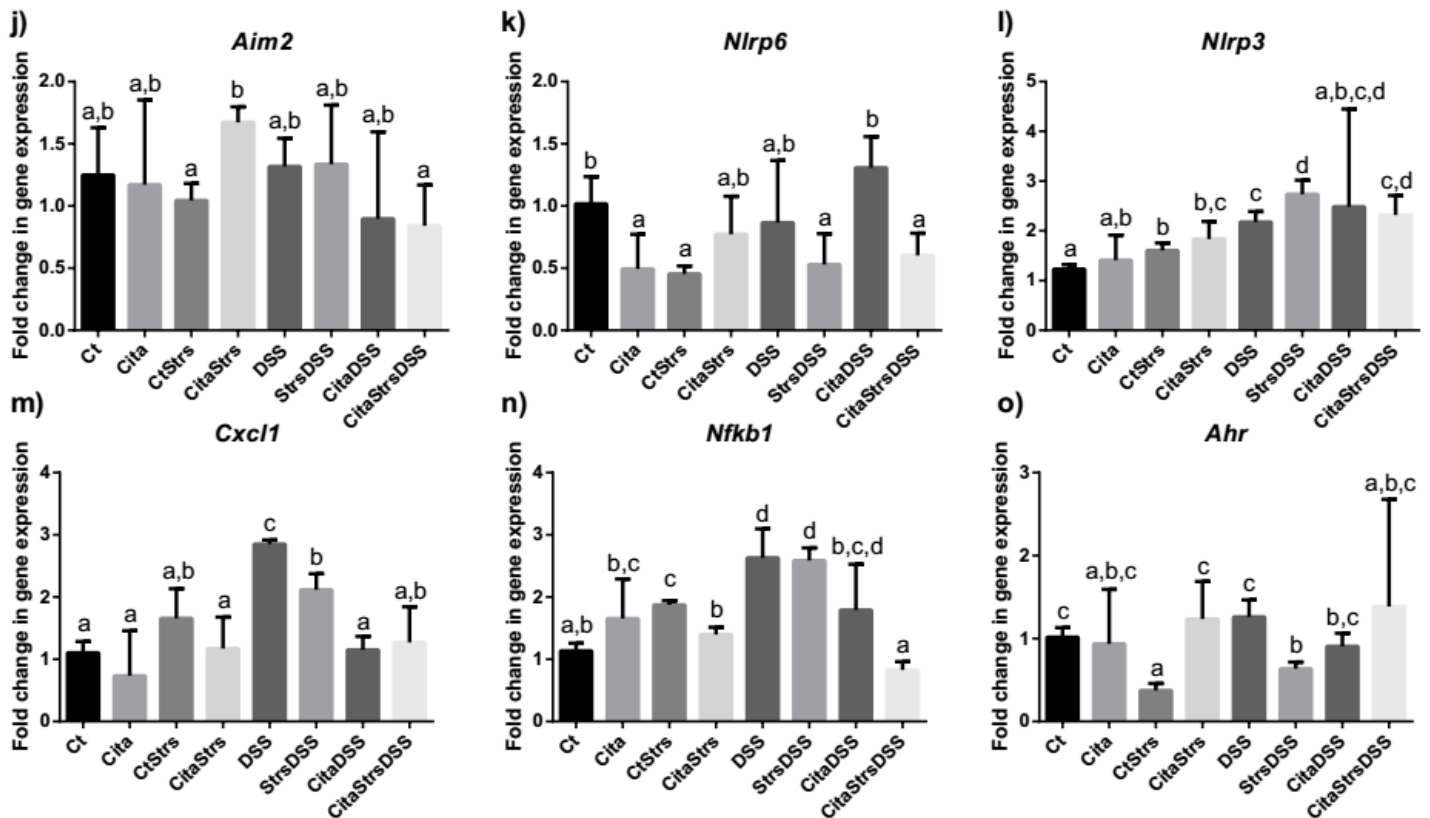


Figura 34. Continuação.

Ao analisar os camundongos fêmeas estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Il1b* e de *Il22* e o aumento de *Tgfb1* e de *Aim2*, comparativamente aos camundongos estressados (CtStrs). No contexto da colite (DSS) e do estresse com colite (StrsDSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS e WpK4StrsDSS) reduziu a expressão de várias moléculas inflamatórias, como *Ifng*, *Ilb1*, *Nos2*, *Tnfa*, *Cxcl1* e *Nfkb1* (Figura 35).

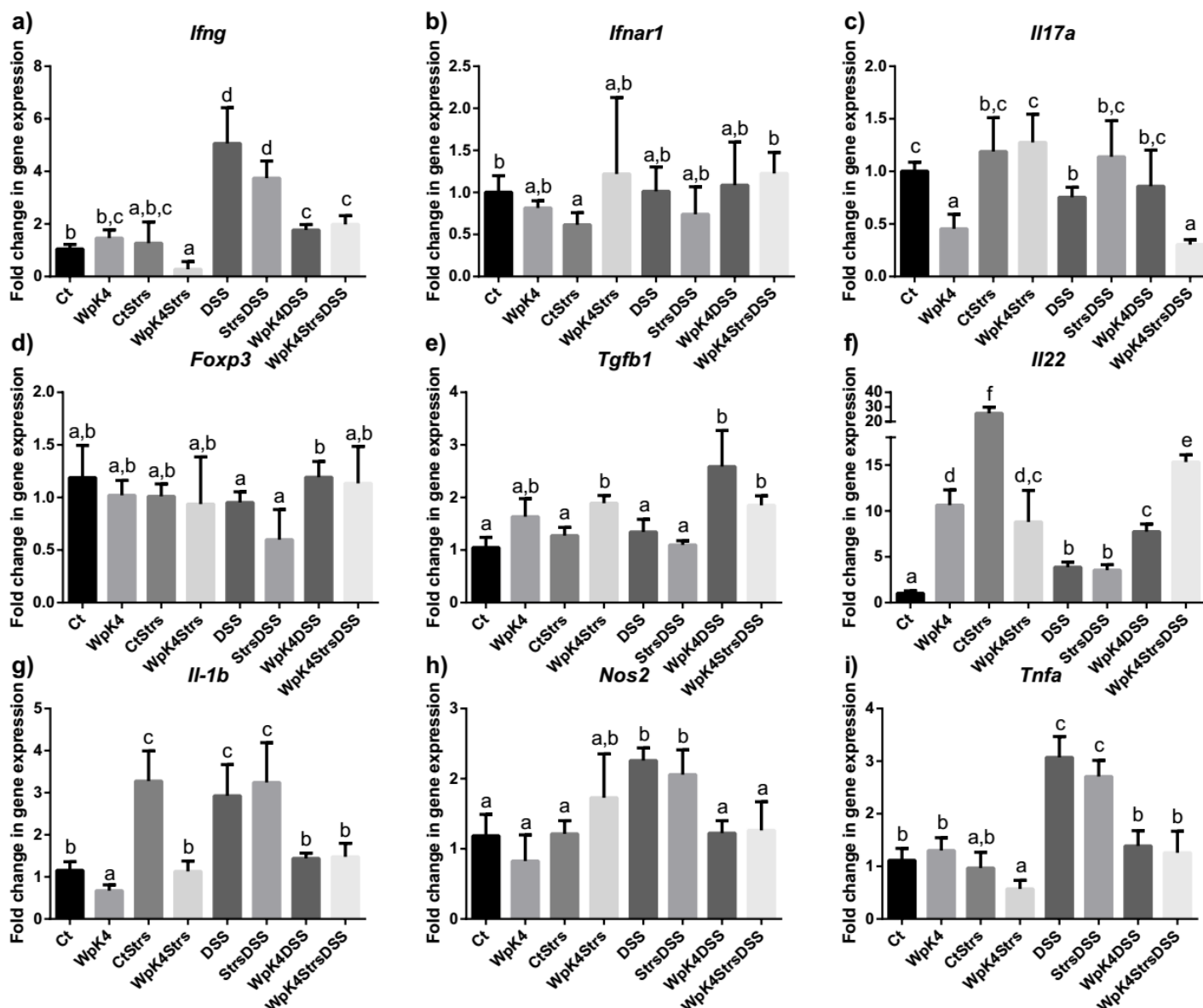


Figura 35. Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos fêmeas tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsdSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

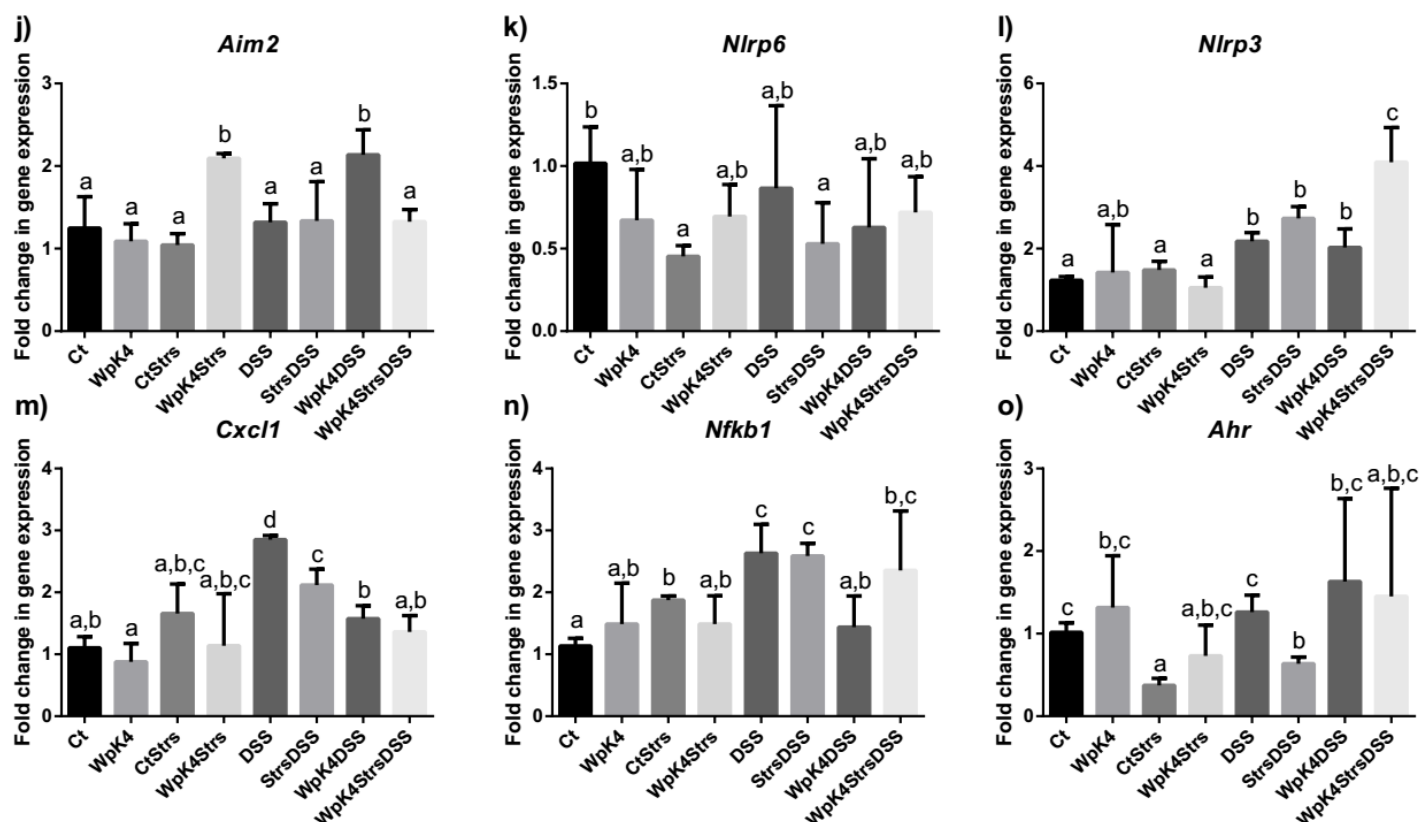


Figura 35. Continuação.

Em relação aos camundongos machos, o estresse crônico (CtStrs) aumentou a expressão de *Ifng*, *Foxp3*, *Il1b*, *Nos2*, *Tnfa* e *Ahr* e reduziu a de *Tgfb1*, comparativamente ao grupo controle (Ct). O tratamento com Citalopram (CitaStrs) reduziu a expressão de *IL1b* e *Nos2* em comparação aos camundongos estressados (CtStrs). No grupo dos camundongos com colite (DSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS) reduziu a expressão de *Il17a*, *Il22* e de *Nos2*. Os camundongos estressados com colite (StrsDSS) quando tratados com Citalopram (CitaStrsDSS) reduziram a expressão de *Ifng*, *Nos2* e de *Tnfa* (**Figura 36**).

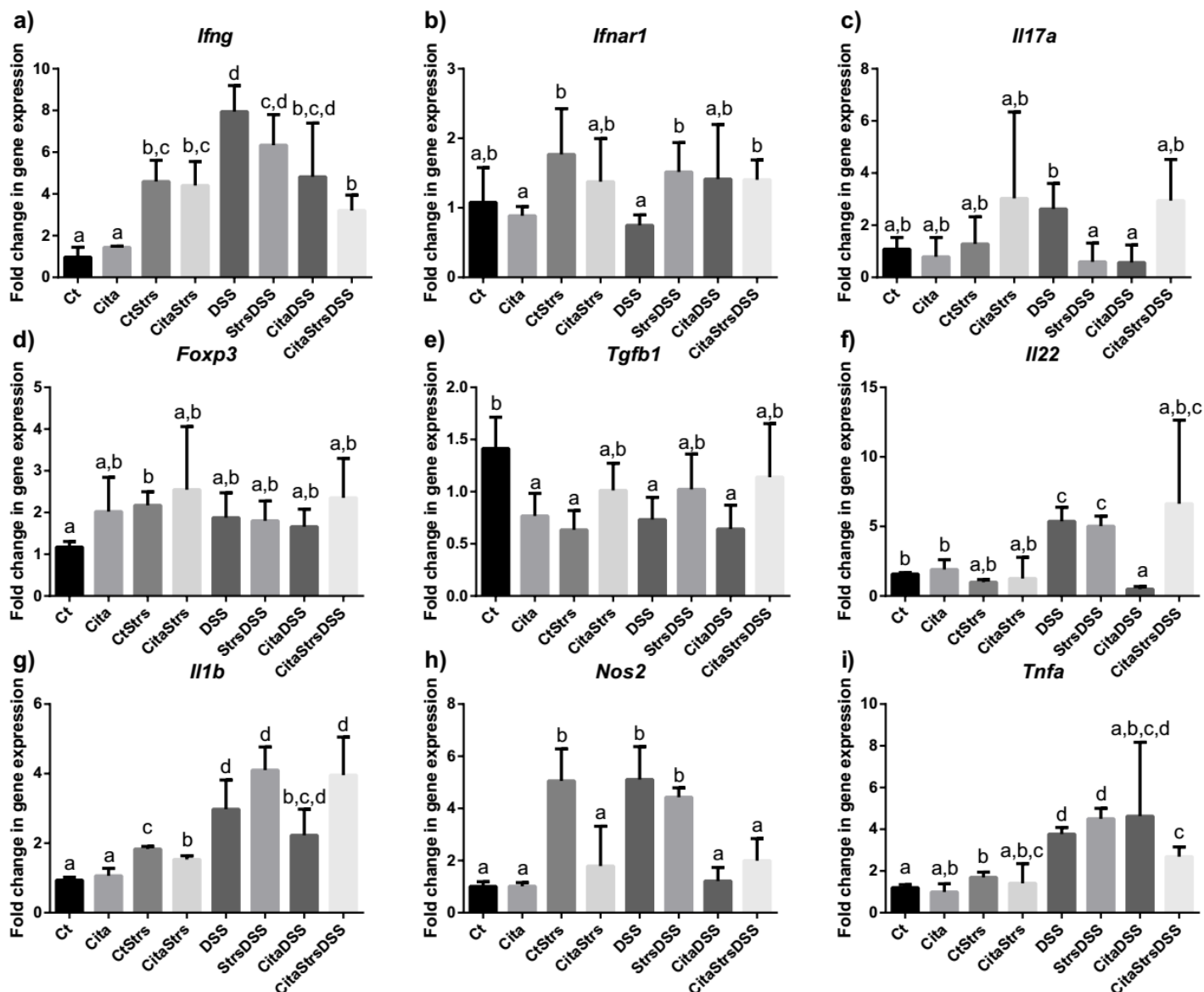


Figura 36. Expressão gênica de moléculas imunes nos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtSts – camundongos estressados, CitaSts – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

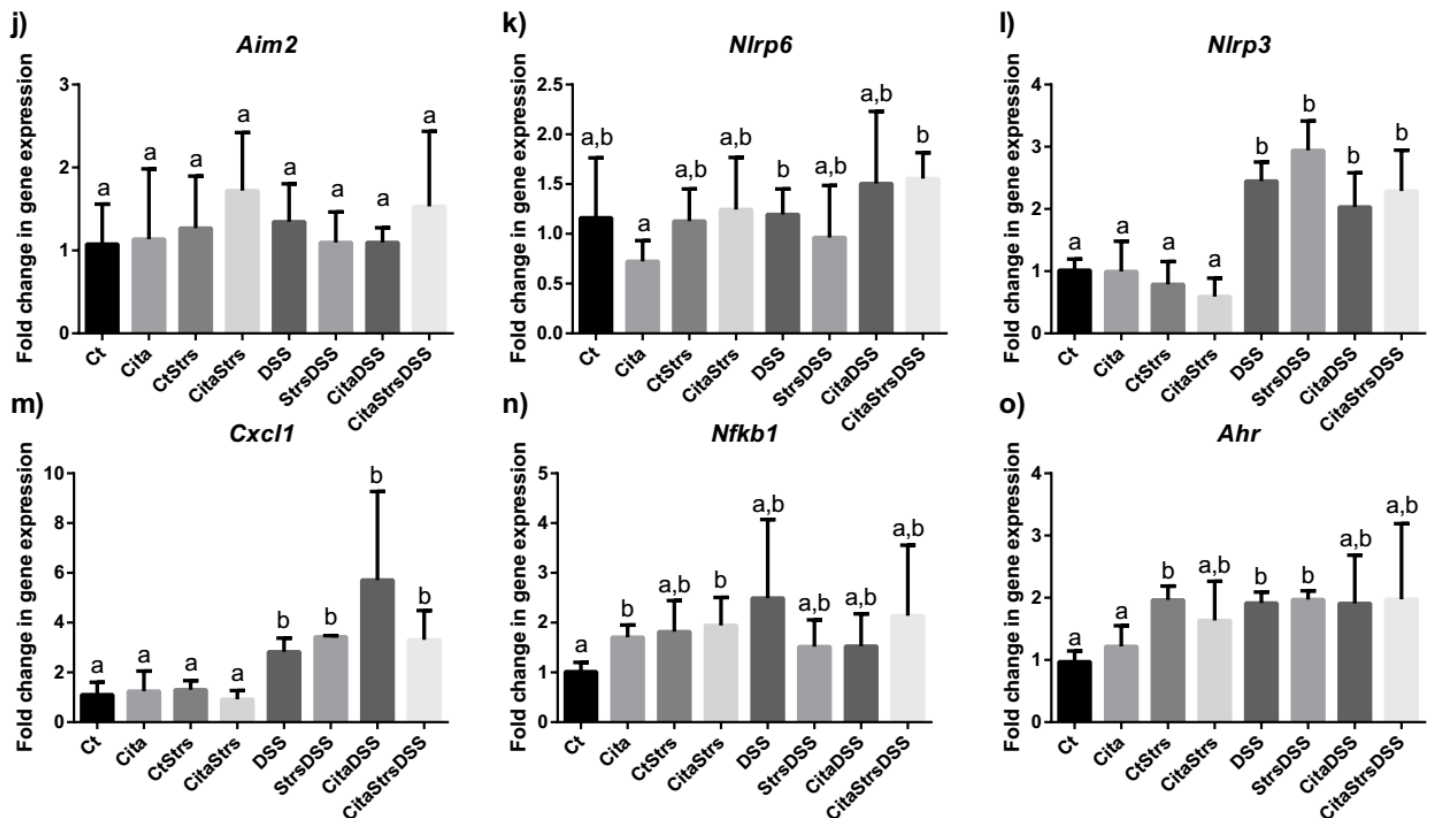


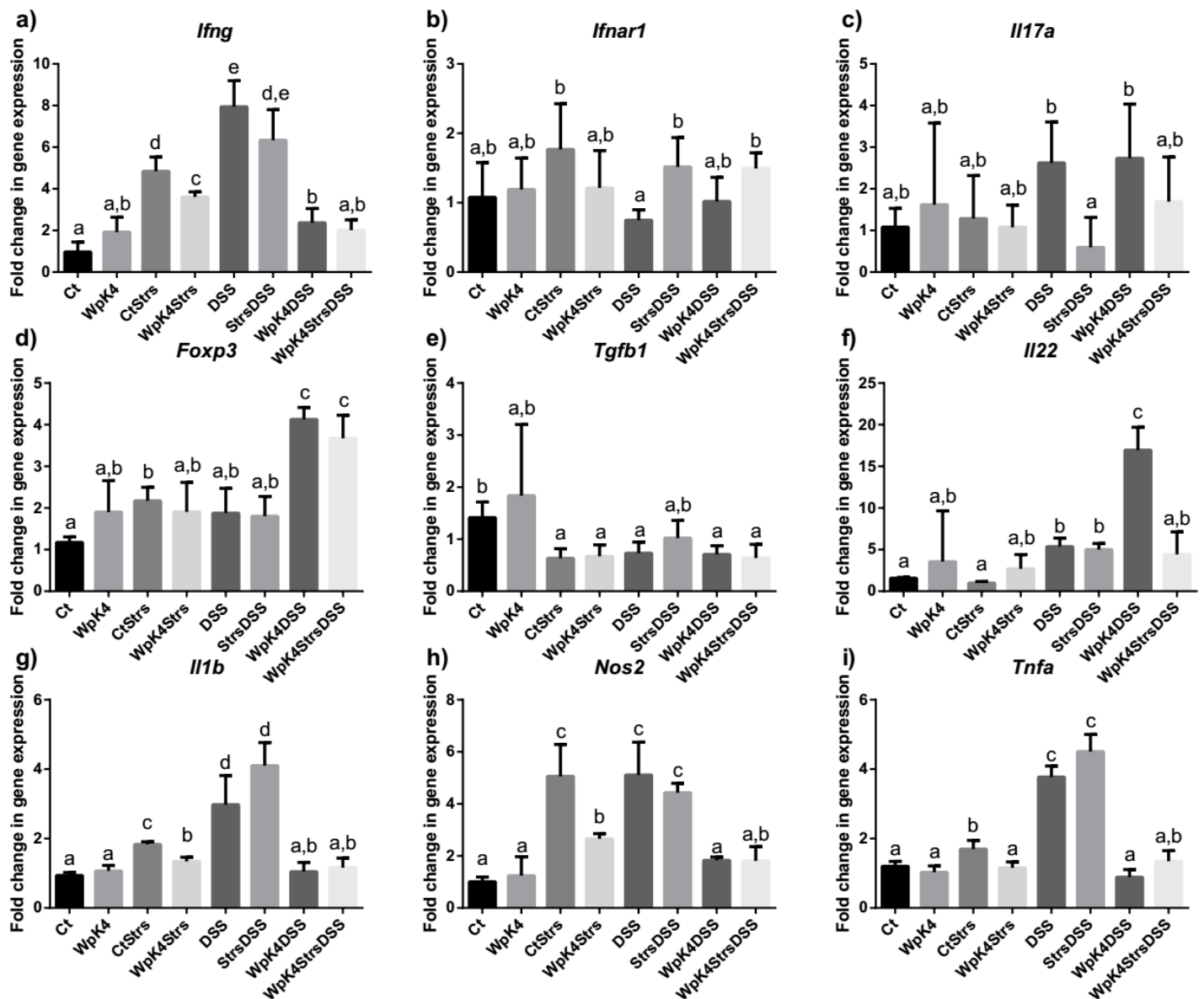
Figura 36. Continuação

Nos ensaios de tratamento com a WpK4, ao analisar os camundongos machos estressados e tratados com a bactéria (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Ifng*, *Il1b*, *Nos2*, *Tnfa* e *Cxcl1*, comparativamente aos camundongos apenas estressados (CtStrs). Nos camundongos com colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) reduziu a expressão de *Ifng*, *Il1b*, *Nos2*, *Tnfa* e *Cxcl1* e induziu a expressão de *Foxp3*, *Il22*, *Aim2*, *Nlrp6* e *Ahr*. No contexto do estresse crônico com colite (StrsDSS), o tratamento com a WpK4 (WpK4StrsDSS) modulou, de forma semelhante, as mesmas moléculas do ensaio anterior (DSS x WpK4DSS), com exceção de *Il22* na qual a expressão não foi alterada e de *Nlrp3* na qual a expressão foi reduzida nos camundongos tratados (**Figura 37**).

Além disso, foi observada uma modulação tratamento-dependente nos camundongos fêmeas desafiados e tratados, onde a expressão de *Ahr* e *Nlrp6* foi modulada apenas nos camundongos tratados com Citalopram e a de *Tgfb*, *Aim2*, *Ifng*, *Foxp3* e *Nlrp3* apenas naqueles tratados com WpK4. Nos camundongos machos, foi observado que o tratamento com o Citalopram

modulou *Il17a* enquanto que o tratamento com a WpK4 modulou *Cxcl1*, *Foxp3*, *Aim2*, *Nlrp6* e *Ahr*.

Também foi observado que os tratamentos nos camundongos fêmeas foi capaz de regular a expressão de *Aim2*, *Nfkb*, *Tgfb*, *Il17a* e *Nlrp3*, algo que não foi observado nos camundongos machos. Em contrapartida, foi observado que os tratamentos modificaram a expressão de *Ifng* nos camundongos machos, mas não nos camundongos fêmeas, podendo indicar a existência de uma regulação sexo-dependente.



específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

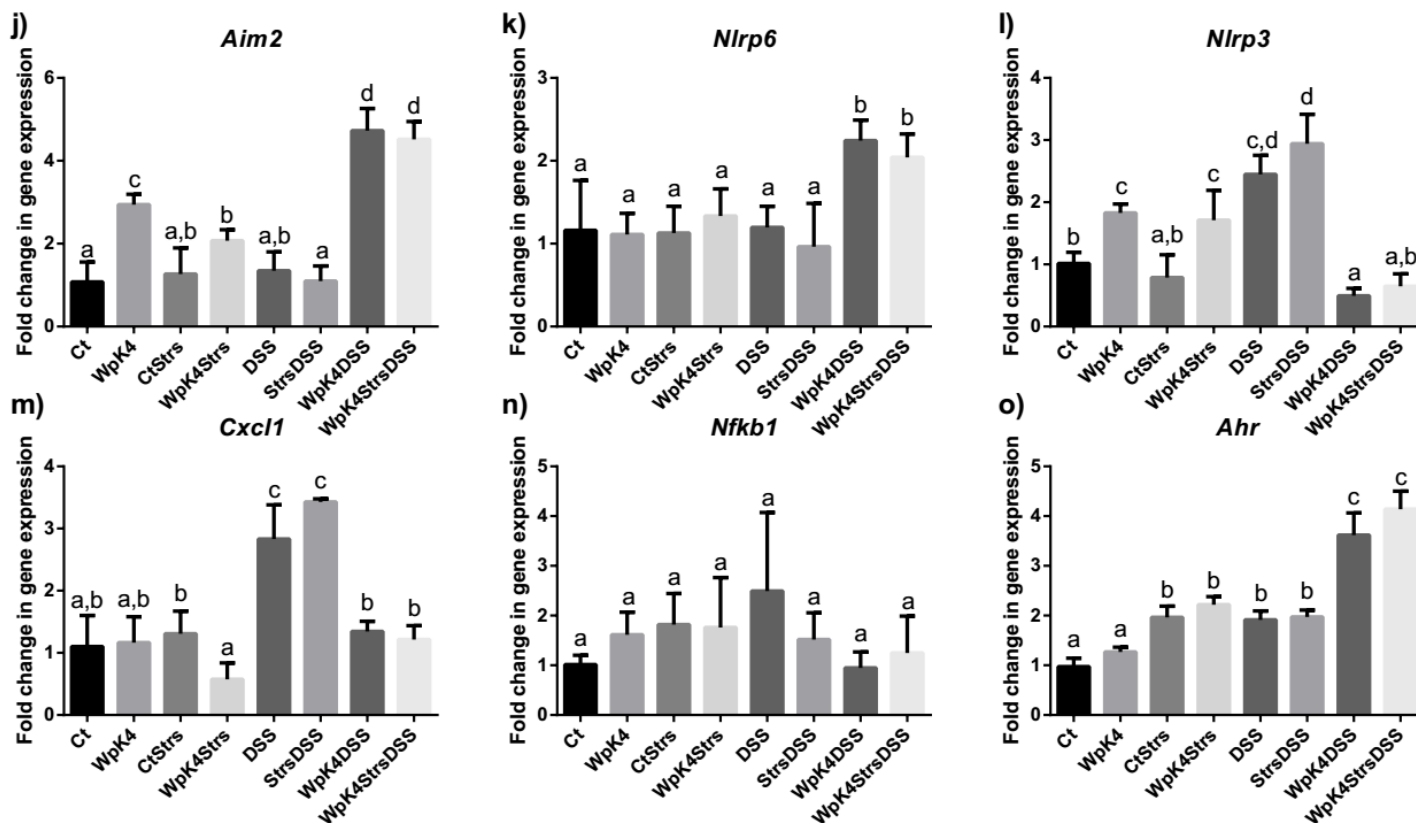


Figura 37. Continuação.

IV.4.5 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 MODULAM MOLÉCULAS ENTEROENDÓCRINAS NO CÓLON DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS COM COLITE

Devido à importância das células enterocromafins no metabolismo de alguns aminoácidos precursores de neurotransmissores, a expressão de algumas moléculas enteroendócrinas foi acessada nos diferentes grupos de camundongos desafios e/ou tratados. Neste estudo, foi observado que os camundongos fêmeas estressados (CtStrs) aumentaram a expressão de *Tdo2* e diminuíram a de *Ido1* em relação aos camundongos controle (Ct). O tratamento com Citalopram (CitaStrs) inverteu a situação, aumentando a expressão de *Ido1* e diminuindo a de *Tdo2*. No grupo

dos camundongos com colite (DSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS) também modulou estas moléculas da mesma forma. Já os camundongos estressados com colite (StrsDSS) quando tratados com Citalopram (CitaStrsDSS) reduziram a expressão de *Ido1*, *Sert* e *Tdo2* (**Figura 38**).

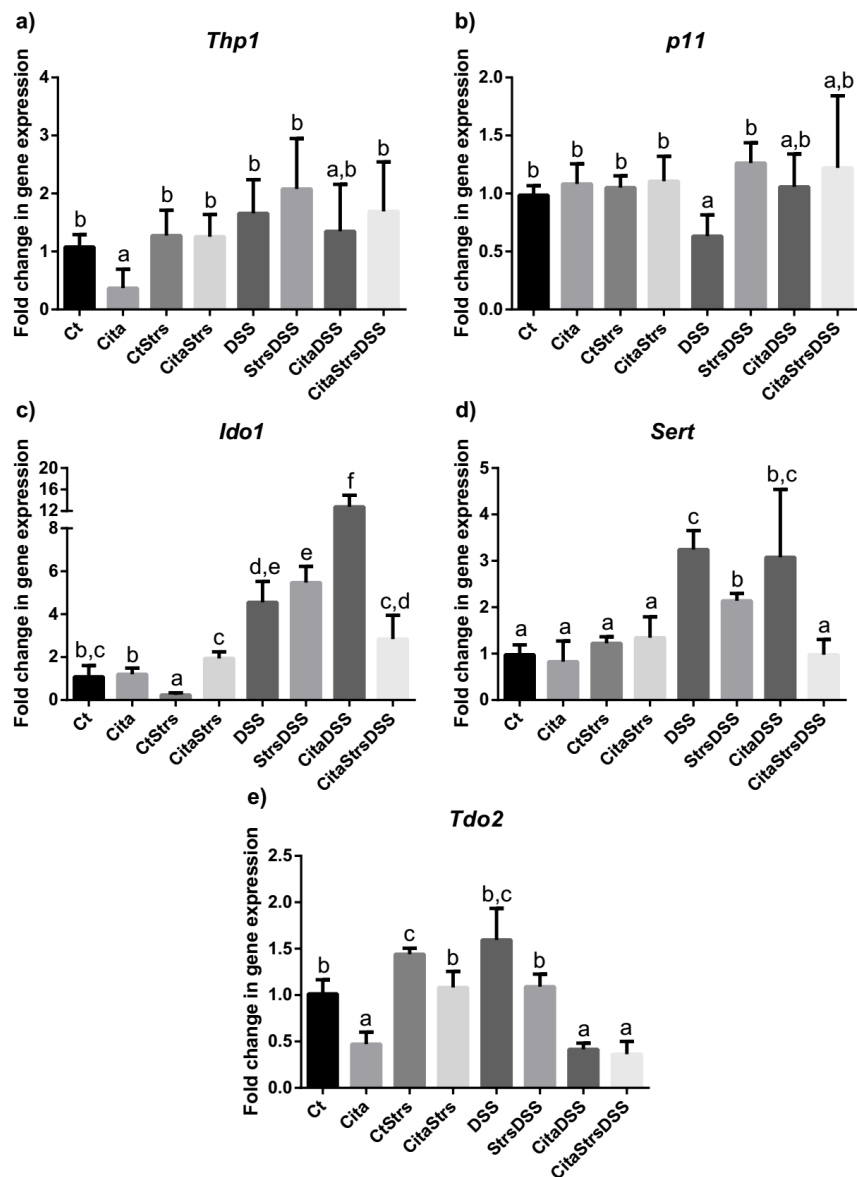


Figura 38. Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

O tratamento com a WpK4 parece ter influenciado, mais abrangentemente, a modulação das moléculas enteroendócrinas analisadas. Neste estudo, foi observado que os camundongos fêmeas estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs) expressavam uma maior quantidade de *p11* e *Ido1* e uma menor quantidade de *Tph1*, *Sert* e *Tdo2*, comparativamente aos camundongos estressados (CtStrs). No contexto do estresse com colite (StrsDSS), o tratamento com a bactéria (WpK4StrsDSS) reduziu a expressão de *Sert* e *Tdo2*. Já no contexto da colite (DSS), o tratamento (WpK4DSS) reduziu a expressão destas mesmas moléculas, além de *Tph1* e *Ido1* (Figura 39).

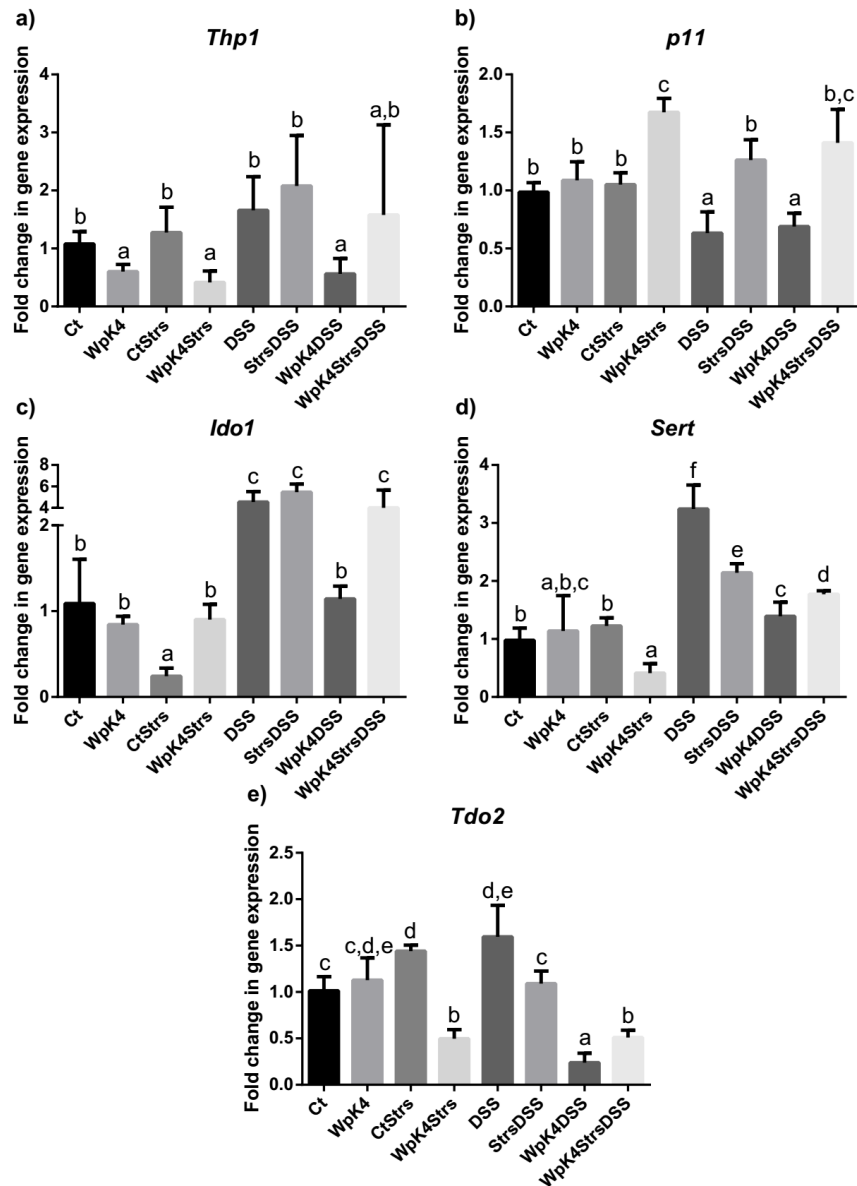


Figura 39. Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos fêmeas tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam

tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

Em relação aos camundongos machos, o estresse crônico (CtStrs) diminuiu a expressão de *Tph1* e aumentou a de *Idol* e de *Tdo2*, comparativamente ao grupo controle (Ct). O tratamento com Citalopram (CitaStrs) não alterou a expressão das moléculas estudadas em comparação aos camundongos estressados (CtStrs). No grupo dos camundongos com colite (DSS) e estressado com colite (StrsDSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS e CitaStrsDSS) reduziu a expressão de *Idol* (**Figura 40**).

Nos ensaios de tratamento com a WpK4, ao analisar os camundongos machos estressados e tratados com a bactéria (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Idol* e de *Tdo2*, comparativamente aos camundongos apenas estressados (CtStrs). No grupo dos camundongos com colite (DSS) e estressado com colite (StrsDSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS e WpK4StrsDSS) reduziu apenas a expressão de *Idol* (**Figura 41**).

Além disso, foi observado que o tratamento com Citalopram nos camundongos fêmeas desafiados modificaram a expressão de *Idol*, *Tdo2* e *Sert*, enquanto que o tratamento com WpK4 modulou as mesmas moléculas, além de *Tph1* e *p11*. Nos camundongos machos, foi observado que o tratamento com o Citalopram modulou *Idol* enquanto que o tratamento com a WpK4 regulou a mesma molécula, além de *Tdo2*.

Também foi observado que os tratamentos nos camundongos fêmeas foi capaz de regular a expressão de *Sert*, *Tph1* e *p11*, algo que não foi observado nos camundongos machos, podendo indicar a existência de uma regulação sexo-dependente.

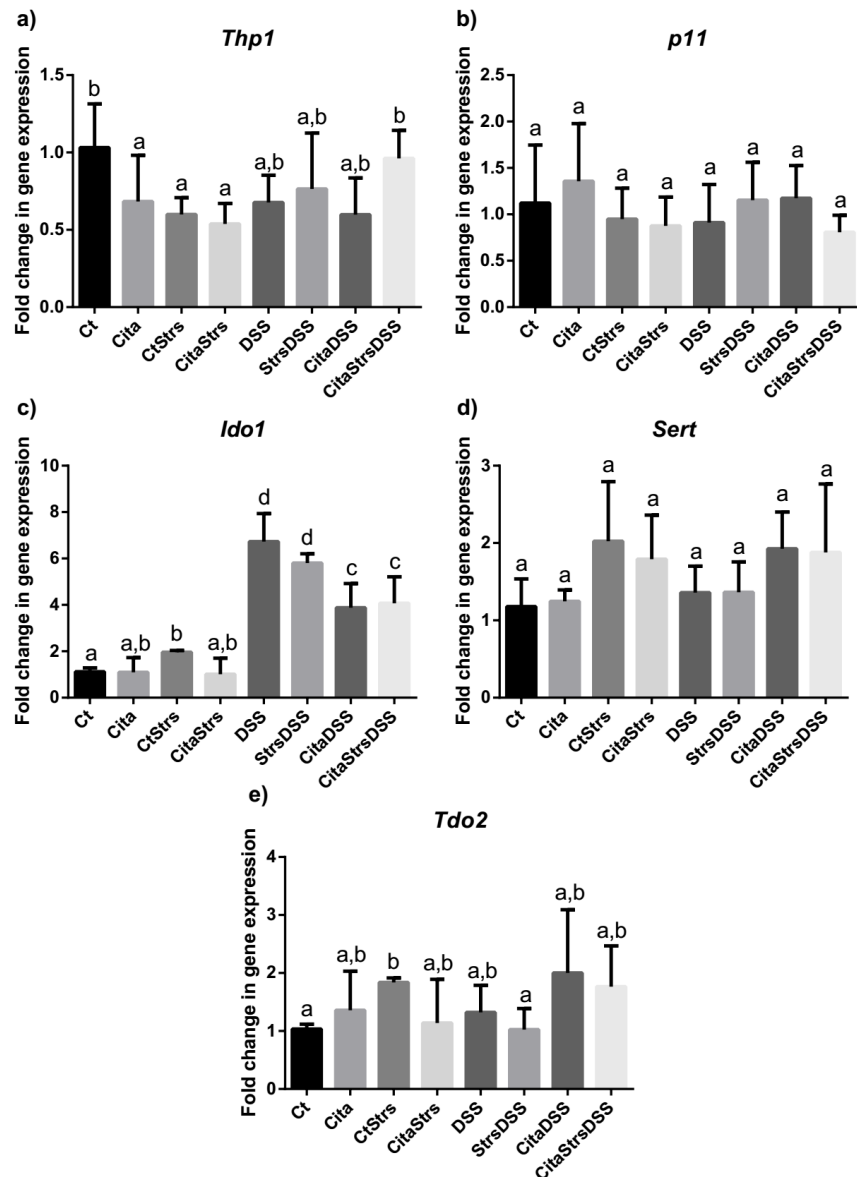


Figura 40. Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtSts – camundongos estressados, CitaSts – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

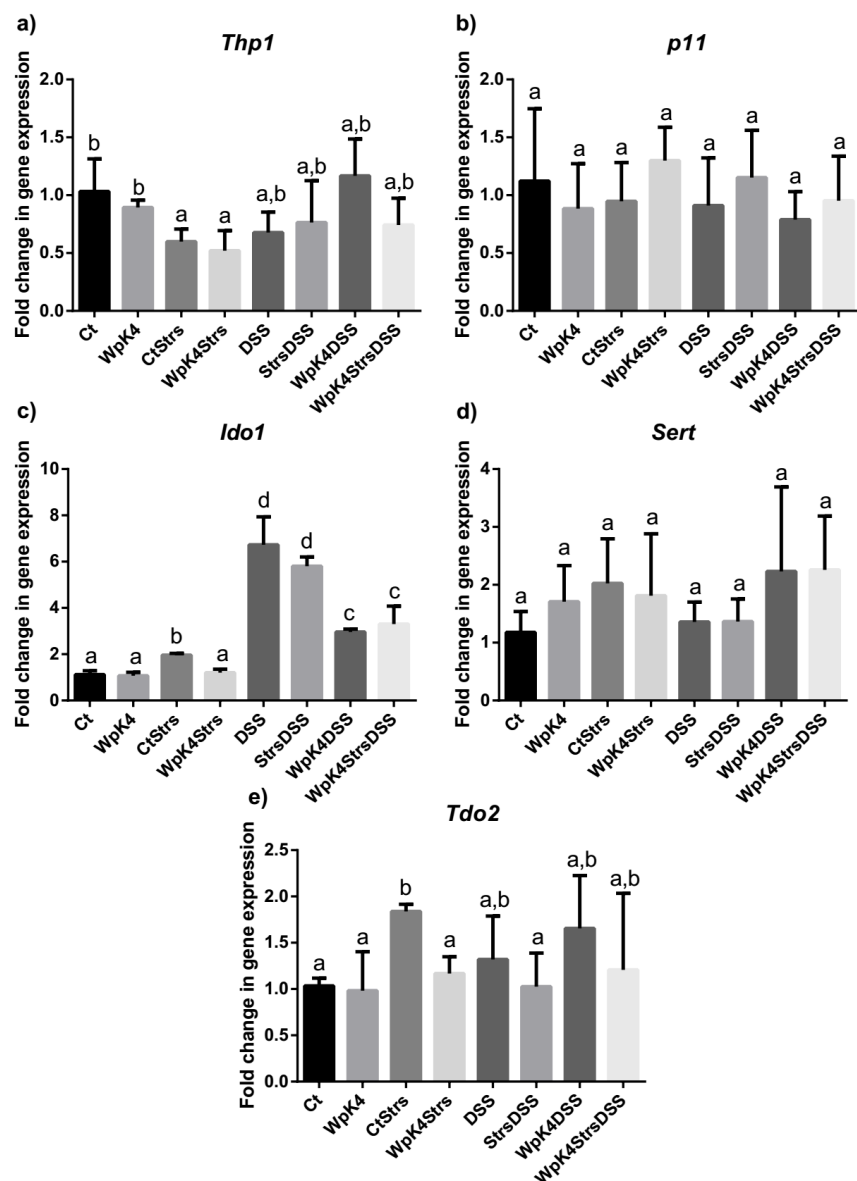


Figura 41. Expressão gênica de moléculas enteroendócrinas nos camundongos machos tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

O resumo dos resultados deste capítulo pode ser observado nas Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Tabela 8. Resumo dos resultados: Citalopram - Permeabilidade intestinal e moléculas da barreira epitelial

Grupos		Permeabilidade	<i>Muc2</i>	<i>Cldn1</i>	<i>Ocln</i>	<i>Tjp1</i>	<i>Tjp2</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Mylk</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	↑	↓	n.s.	↓	↓	↓	n.s.	↑
	Ct X DSS	↑	n.s.	↑	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	↓	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↓
	DSS X CitaDSS	↓	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↑
	StrsDSS x CitaStrsDSS	↓	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.
Grupos		Permeabilidade	<i>Muc2</i>	<i>Cldn1</i>	<i>Ocln</i>	<i>Tjp1</i>	<i>Tjp2</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Mylk</i>
Machos	Ct X CtStrs	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↓	n.s.	↑
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↓
	DSS X CitaDSS	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓
	StrsDSS x CitaStrsDSS	↓	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 9. Resumo dos resultados: WpK4 - Permeabilidade intestinal e moléculas da barreira epitelial

		Grupos	Permeabilidade	<i>Muc2</i>	<i>Cldn1</i>	<i>Ocln</i>	<i>Tjp1</i>	<i>Tjp2</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Mylk</i>
Fêmeas		Ct X CtStrs	↑	↓	n.s.	↓	↓	↓	n.s.	↑
		Ct X DSS	↑	n.s.	↑	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		CtStrs X WpK4Strs	↓	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	↓
		DSS X WpK4DSS	↓	↓	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	n.s.	↑	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.
		Grupos	Permeabilidade	<i>Muc2</i>	<i>Cldn1</i>	<i>Ocln</i>	<i>Tjp1</i>	<i>Tjp2</i>	<i>Cxcl9</i>	<i>Mylk</i>
Machos		Ct X CtStrs	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↓	n.s.	↑
		Ct X DSS	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑
		CtStrs X WpK4Strs	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↓
		DSS X WpK4DSS	↓	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	↓
		StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↓

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 10. Resumo dos resultados: Citalopram - Infiltrado inflamatório e moléculas imunes

Grupos		Infiltrado	<i>Ifng</i>	<i>Ifnar1</i>	<i>Il17a</i>	<i>Foxp3</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Il22</i>	<i>Il1b</i>	<i>Nos2</i>	<i>Tnfa</i>	<i>Aim2</i>	<i>Nlrp6</i>	<i>Nlrp3</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Nfkb1</i>	<i>Ahr</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑	n.s.	↑	↓
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑
	DSS X CitaDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.
Grupos		Infiltrado	<i>Ifng</i>	<i>Ifnar1</i>	<i>Il17a</i>	<i>Foxp3</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Il22</i>	<i>Il1b</i>	<i>Nos2</i>	<i>Tnfa</i>	<i>Aim2</i>	<i>Nlrp6</i>	<i>Nlrp3</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Nfkb1</i>	<i>Ahr</i>
Machos	Ct X CtStrs	n.s.	↑	n.s.	n.s.	↑	↓	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↑
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	DSS X CitaDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 11. Resumo dos resultados: WpK4 - Infiltrado inflamatório e moléculas imunes

Grupos		Infiltrado	<i>Ifng</i>	<i>Ifnar1</i>	<i>Il17a</i>	<i>Foxp3</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Il22</i>	<i>Il1b</i>	<i>Nos2</i>	<i>Tnfa</i>	<i>Aim2</i>	<i>Nlrp6</i>	<i>Nlrp3</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Nfkb1</i>	<i>Ahr</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑	n.s.	↑	↓
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	DSS X WpK4DSS	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	↓	↓	↓	↑	n.s.	n.s.	↓	↓	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	↓	n.s.	↓	n.s.	↑	↑	↓	↓	↓	n.s.	n.s.	↑	↓	n.s.	n.s.
Grupos		Infiltrado	<i>Ifng</i>	<i>Ifnar1</i>	<i>Il17a</i>	<i>Foxp3</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Il22</i>	<i>Il1b</i>	<i>Nos2</i>	<i>Tnfa</i>	<i>Aim2</i>	<i>Nlrp6</i>	<i>Nlrp3</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Nfkb1</i>	<i>Ahr</i>
Machos	Ct X CtStrs	n.s.	↑	n.s.	n.s.	↑	↓	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↑
	CtStrs X WpK4Strs	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↓	↓	n.s.	n.s.	↑	↓	n.s.	n.s.
	DSS X WpK4DSS	↓	↓	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	n.s.	↑
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	↓	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	n.s.	↑

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 12. Resumo dos resultados: Citalopram - Moléculas enteroendócrinas

Grupos		<i>Tph1</i>	<i>p11</i>	<i>Ido1</i>	<i>Sert1</i>	<i>Tdo2</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑
	Ct X DSS	n.s.	↓	↑	↑	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↓
	DSS X CitaDSS	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↓
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	n.s.	↓	↓	↓
Grupos		<i>Tph1</i>	<i>p11</i>	<i>Ido1</i>	<i>Sert1</i>	<i>Tdo2</i>
Machos	Ct X CtStrs	↓	n.s.	↑	n.s.	↑
	Ct X DSS	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	DSS X CitaDSS	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 13. Resumo dos resultados: WpK4 - Moléculas enteroendócrinas

Grupos		<i>Tph1</i>	<i>p11</i>	<i>Ido1</i>	<i>Sert1</i>	<i>Tdo2</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑
	Ct X DSS	n.s.	↓	↑	↑	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	↓	↑	↑	↓	↓
	DSS X WpK4DSS	↓	n.s.	↓	↓	↓
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↓
Grupos		<i>Tph1</i>	<i>p11</i>	<i>Ido1</i>	<i>Sert1</i>	<i>Tdo2</i>
Machos	Ct X CtStrs	↓	n.s.	↑	n.s.	↑
	Ct X DSS	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↓
	DSS X WpK4DSS	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

IV.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ananthakrishnan, A. N. (2013). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* 9, 367–374. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935543>.
- Bertolini, M., Sobue, T., Thompson, A., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2017). Chemotherapy Induces Oral Mucositis in Mice Without Additional Noxious Stimuli. *Transl. Oncol.* 10, 612–620. doi:10.1016/j.tranon.2017.05.001.
- DeLaughter, D. M., Clark, C. R., Christodoulou, D. C., Seidman, C. E., Baldwin, H. S., Seidman, J. G., et al. (2016). Transcriptional Profiling of Cultured, Embryonic Epicardial Cells Identifies Novel Genes and Signaling Pathways Regulated by TGF β R3 In Vitro. *PLoS One* 11, e0159710. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159710>.
- Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., et al. (2013). Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella* Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host Microbe* 14, 26–37. doi:10.1016/j.chom.2013.06.007.
- Donley, D. W., Olson, A. R., Raisbeck, M. F., Fox, J. H., and Gigley, J. P. (2016). Huntingtons Disease Mice Infected with *Toxoplasma gondii* Demonstrate Early Kynurenine Pathway Activation, Altered CD8+ T-Cell Responses, and Premature Mortality. *PLoS One* 11, e0162404. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162404>.
- Ferreira Júnior, M., Batista, S. A., Vidigal, P. V. T., Cordeiro, A. A. C., Oliveira, F. M. S., Prata, L. O., et al. (2015). Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Eur. J. Histochem.* 59, 2489. doi:10.4081/ejh.2015.2489.
- Filgueiras, L. R., Brandt, S. L., Ramalho, T. R. de O., Jancar, S., and Serezani, C. H. (2017). Imbalance between HDAC and HAT activities drives aberrant STAT1/MyD88 expression in macrophages from type 1 diabetic mice. *J. Diabetes Complications* 31, 334–339. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.08.001.
- Frolkis, A. D., Vallerand, I. A., Shaheen, A.-A., Lowerison, M. W., Swain, M. G., Barnabe, C., et al. (2018). Depression increases the risk of inflammatory bowel disease, which may be mitigated by the use of antidepressants in the treatment of depression. *Gut*, gutjnl-2018-317182. doi:10.1136/gutjnl-2018-317182.
- Ghia, J., Blennerhassett, P., Deng, Y., Verdu, E. F., Khan, W. I., and Collins, S. M. (2009). Reactivation of Inflammatory Bowel Disease in a Mouse Model of Depression. *Gastroenterology* 136, 2280–2288.e4. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.069.

- Giulietti, a, Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261.
- Gong, M., Zhuo, X., and Ma, A. (2017). STAT6 Upregulation Promotes M2 Macrophage Polarization to Suppress Atherosclerosis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 23, 240–249. doi:10.12659/MSMBR.904014.
- Gracie, D. J., Guthrie, E. A., Hamlin, P. J., and Ford, A. C. (2018). Bi-directionality of Brain-Gut Interactions in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 154, 1635–1646.e3. doi:10.1053/j.gastro.2018.01.027.
- Hall, B. J., Hamlin, P. J., Gracie, D. J., and Ford, A. C. (2018). The Effect of Antidepressants on the Course of Inflammatory Bowel Disease. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 2047242. doi:10.1155/2018/2047242.
- Hata, T., Asano, Y., Yoshihara, K., Kimura-Todani, T., Miyata, N., Zhang, X.-T., *et al.* (2017). Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice. *PLoS One* 12, e0180745. doi:10.1371/journal.pone.0180745.
- Helleman, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Hu, G.-Q., Song, P.-X., Li, N., Chen, W., Lei, Q.-Q., Yu, S.-X., *et al.* (2016). AIM2 contributes to the maintenance of intestinal integrity via Akt and protects against *Salmonella* mucosal infection. *Mucosal Immunol.* 9, 1330. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2015.142>.
- Judd, L. M., Heine, R. G., Menheniott, T. R., Buzzelli, J., O'Brien-Simpson, N., Pavlic, D., *et al.* (2015). Elevated IL-33 expression is associated with pediatric eosinophilic esophagitis, and exogenous IL-33 promotes eosinophilic esophagitis development in mice. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 310, G13–G25. doi:10.1152/ajpgi.00290.2015.
- Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G., and Hyland, N. P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 392. doi:10.3389/fncel.2015.00392.
- Kochar, B., Barnes, E. L., Long, M. D., Cushing, K. C., Galanko, J., Martin, C. F., *et al.* (2018). Depression Is Associated With More Aggressive Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterol.* 113, 80–85. doi:10.1038/ajg.2017.423.
- Lee, H.-J., Kao, C.-Y., Lin, S.-C., Xu, M., Xie, X., Tsai, S. Y., *et al.* (2017). Dysregulation of nuclear receptor COUP-TFII impairs skeletal muscle development. *Sci. Rep.* 7, 3136. doi:10.1038/s41598-017-03475-5.

- Loonen, L. M. P., Stolte, E. H., Jaklofsky, M. T. J., Meijerink, M., Dekker, J., van Baarlen, P., *et al.* (2013). REG3 γ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunol.* 7, 939. Available at: <https://doi.org/10.1038/mi.2013.109>.
- Mikocka-Walus, A., and Andrews, J. M. (2018). It is high time to examine the psyche while treating IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 329–330. doi:10.1038/s41575-018-0004-y.
- Neuendorf, R., Harding, A., Stello, N., Hanes, D., and Wahbeh, H. (2016). Depression and anxiety in patients with Inflammatory Bowel Disease: A systematic review. *J. Psychosom. Res.* 87, 70–80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2016.06.001>.
- Ng, G. Z., Menheniott, T. R., Every, A. L., Stent, A., Judd, L. M., Chionh, Y. T., *et al.* (2016). The MUC1 mucin protects against *Helicobacter pylori* pathogenesis in mice by regulation of the NLRP3 inflammasome. *Gut* 65, 1087 LP-1099. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307175.
- Ohl, K., Wiener, A., Lippe, R., Schippers, A., Zorn, C., Roth, J., *et al.* (2016). CREM Alpha Enhances IL-21 Production in T Cells In Vivo and In Vitro. *Front. Immunol.* 7, 618. doi:10.3389/fimmu.2016.00618.
- Oliveira, F. M. S., Horta, B. C., Prata, L. O., Santiago, A. F., Alves, A. C., Faria, A. M. C., *et al.* (2012). Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. *Infect. Dis. Rep.* 4, e27–e27. doi:10.4081/idr.2012.e27.
- Parastouei, K., Mirshafiey, A., Eshraghian, M. R., Shiri-Shahsavari, M. R., Solaymani-Mohammadi, F., Chahardoli, R., *et al.* (2018). The effect of 1, 25(OH)₂ D₃ (calcitriol) alone and in combination with all-trans retinoic acid on ROR- γ t, IL-17, TGF- β , and FOXP3 gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nutr. Neurosci.* 21, 210–218. doi:10.1080/1028415X.2016.1263039.
- Schedel, M., Jia, Y., Michel, S., Takeda, K., Domenico, J., Joetham, A., *et al.* (2016). 1,25D₃ prevents CD8(+)Tc2 skewing and asthma development through VDR binding changes to the Cyp11a1 promoter. *Nat. Commun.* 7, 10213. doi:10.1038/ncomms10213.
- Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N. A., Mitchell, J., *et al.* (2017). NLRP6 Protects Il10^{-/-} Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila*. *Cell Rep.* 19, 733–745. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.080.
- Sgambato, D., Miranda, A., Ranaldo, R., Federico, A. and Romano, M (2017). The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases (2017). *Curr. Pharm. Des.* 23, 3997-4002. doi:10.2174/1381612823666170228123357.

- Singh, R., Miao, T., Symonds, A. L. J., Omodho, B., Li, S., and Wang, P. (2017). Egr2 and 3 Inhibit T-bet-Mediated IFN- γ Production in T Cells. *J. Immunol.* Available at: <http://www.jimmunol.org/content/early/2017/04/28/jimmunol.1602010.abstract>.
- Söderholm, J. D., Yates, D. A., Gareau, M. G., Yang, P.-C., MacQueen, G., and Perdue, M. H. (2002). Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 283, G1257–G1263. doi:10.1152/ajpgi.00314.2002.
- Tokumasu, R., Yamaga, K., Yamazaki, Y., Murota, H., Suzuki, K., Tamura, A., *et al.* (2016). Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4061--E4068. doi:10.1073/pnas.1525474113.
- Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K. M., Menendez, A., Bergstrom, K. S., Gill, N., *et al.* (2011). Antibiotic Treatment Alters the Colonic Mucus Layer and Predisposes the Host to Exacerbated *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis. *Infect. Immun.* 79, 1536 LP-1545. Available at: <http://iai.asm.org/content/79/4/1536.abstract>.
- Xie, M., Yu, Y., Kang, R., Zhu, S., Yang, L., Zeng, L., *et al.* (2016). PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Nat. Commun.* 7, 13280. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms13280>.
- Zaman, M. M.-U., Masuda, K., Nyati, K. K., Dubey, P. K., Ripley, B., Wang, K., *et al.* (2016). Arid5a exacerbates IFN- γ mediated septic shock by stabilizing T-bet mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 11543–11548. doi:10.1073/pnas.1613307113.

CAPÍTULO V
O Citalopram e a *Weissella paramesenteroides* WpK4
reduziram o comportamento tipo-depressivo em
camundongos estressados com colite, regulando moléculas
imunes, além de fatores e receptores neuronais

IV.1. O PAPEL DA COLITE NO DESENVOLVIMENTO DO ESTRESSE

Como mencionado anteriormente, a relação entre o IBD e as desordens emocionais é bastante intrincada e complexa. Apesar de várias observações clínicas e experimentais, ainda é vago as vias pelas quais a colite é capaz de desencadear de forma a prejudicar a cognição (Neuendorf *et al.*, 2016; Frolkis *et al.*, 2018; Gracie *et al.*, 2018; Hall *et al.*, 2018; Kochar *et al.*, 2018). Recentemente, alguns estudos vêm elucidando os mecanismos pelos quais a inflamação intestinal é capaz de modificar funções cerebrais. Nyuyki *et al.*, (2018), por exemplo, observaram que a colite desencadeada pelo DSS era capaz de aumentar a excitabilidade do cérebro de camundongos, promovendo comportamentos associados à ansiedade. Reichmann *et al.*, (2015), também usaram um modelo de colite induzido pelo DSS para avaliar o papel da inflamação intestinal na modulação do sistema límbico. Estes autores observaram que camundongos com colite submetidos à separação materna apresentavam menor capacidade exploratória, determinando maiores períodos de imobilidade comparativamente aos camundongos não desafiados. Além disso, foram observadas alterações moleculares na amígdala, no hipocampo e no hipotálamo, evidenciando os papéis do neuropeptídeo Y, do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e dos receptores de glicocorticoides nos processos cognitivos (Reichmann *et al.*, 2015). De acordo com estes autores, o impacto negativo da colite sobre o sistema límbico poderia estar associado à disbiose microbiológica (Reichmann *et al.*, 2015). Neste sentido, o estudo deste capítulo tem por objetivo avaliar o papel do estresse psicológico, da colite e do estresse combinado com a colite na modulação molecular do hipocampo e as suas consequências comportamentais. Além disso, também será levado em consideração os papéis da *W. paramesenteroides* WpK4 e do Citalopram nos diferentes tipos de desafio.

V.2. OBJETIVOS

V.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os papéis biológicos do Citalopram e da *Weissella paramesenteroides* WpK4 na modulação hipocampal de camundongos estressados e com colite.

V.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar aspectos comportamentais e moleculares dos camundongos tratados e não tratados com Citalopram ou *W. paramesenteroides* WpK4 e submetidos ou não ao estresse crônico associado à colite, levando em consideração:

- (1) o desenvolvimento da depressão;
- (2) a imunomodulação hipocampal;
- (3) a modulação de fatores, transportadores e receptores neuronais;
- (4) a modulação de moléculas constituintes da barreira epitelial.

V.3. METODOLOGIA

V.3.1 ENSAIO DE ESTRESSE CRÔNICO COMBINADO COM O DE COLITE

Este estudo foi uma continuação do ensaio de estresse crônico com colite desenvolvido no capítulo anterior e leva em consideração as respostas comportamentais e as modulações moleculares no hipocampo dos diferentes grupos desafiados e tratados. Os detalhes metodológicos encontram-se no IV.3.1.

V.3.1.1 Avaliação do comportamento tipo-depressivo

O comportamento tipo-depressivo dos camundongos foi acessado pelo teste de suspensão pela cauda, de acordo com o *III.3.1.3*, e pelo teste de nado forçado no qual os camundongos foram mantidos em frascos de vidro tipo Bécker contendo um volume aproximado de 1L de água, sendo o período de imobilidade acessado ao longo de 6 minutos (Can *et al.*, 2012).

V.3.1.2 Análises moleculares

No final do período experimental, os encéfalos dos camundongos foram embebidos e fixados em RNAlater (Ambion, Austin, Estados Unidos) e armazenados a -20°C até o seu processamento. Os hipocampus foram delicadamente removidos de acordo com Spijker (2011) e o isolamento do RNA total, o tratamento com DNaseI e a síntese do cDNA foram realizados de acordo com item *II.3.3.4* deste trabalho.

As reações de qPCR foram realizadas usando o kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos) e primers gene-específicos de moléculas reguladoras da imunidade (**Tabela 11**), de fatores, transportadores e receptores neuronais (**Tabela 12**), além de moléculas reguladoras da barreira epitelial (**Tabela 13**). Os genes constitutivos codificadores da beta-actina (*Actb*) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foram usados como referência para as normalizações (Giulietti *et al.*, 2001). As reações foram otimizadas ajustando a concentração dos primers para uma especificidade e eficiência ótimas (**Tabelas 11, 12 e 13**). Os níveis de expressão gênica do grupo controle, sem qualquer tipo de tratamento, foram usados como

calibradores e os resultados obtidos dos grupos experimentais foram apresentados graficamente como razão de quantidades (*fold change*), usando as médias e os desvios padrões da expressão gênica dos alvos estudados de acordo com Hellemans *et al.* (2007).

V.3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no pacote estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos). O teste de Shapiro Wilk foi usado para avaliar se os dados possuíam uma distribuição normal. Neste caso, as amostras paramétricas foram submetidas a análises da variância das médias, realizando múltiplas comparações entre os diferentes tratamentos ou grupos de dados (*one-way* Anova) seguido do teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias obtidas. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando os valores dos níveis de significância eram maiores que 95% ($p < 0,05$).

Tabela 14. Painel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da imunidade.

Molécula		Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Reguladores da imunidade	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	<i>Cxcl1</i>	KcF	TGCACCCAAACCGAAGTCAT	250	4.00	-3.56	Hipocampo	Deriu <i>et al.</i> , 2013
			KcR	TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC					
	Interferon gamma	<i>Ifng</i>	IfnF	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	250	40.00	-3.22	Hipocampo	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			IfnR	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG					
	Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Il1bF	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	250	40.00	-3.52	Hipocampo	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			Il1bR	GATCCACACTCTCCAGCTGCA					
	Interleukin 6	<i>Il6</i>	IL6F	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	250	4.00	-3.35	Hipocampo	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			IL6R	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA					
	Interleukin 10	<i>Il10</i>	Il10F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	250	40.00	-3.44	Hipocampo	Patial <i>et al.</i> , 2016
			Il10R	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG					
	Nitric oxide synthase 2, inducible	<i>Nos2</i>	iNosF	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	250	4.00	-3.48	Hipocampo	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			iNosR	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG					
	Transforming growth factor, beta 1	<i>Tgfb1b</i>	Tgff	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	250	3.25	-3.44	Hipocampo	Giulietti <i>et al.</i> , 2001
			Tgfr	GGTTCATGTCATGGATGGTGC					

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidades de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência da reação de qPCR.

Tabela 15. Painel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de fatores, transportadores e receptores neuronais.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Fatores, transportadores e receptores neuronais	Brain derived neurotrophic factor	<i>Bdnf</i>	BdnfF	AAGGACGCGGACTTGTACAC	250	4.00	-3.36	Hipocampo	Fukuchi <i>et al.</i> , 2017
			BdnfR	CGCTAATACTGTCACACACGC					
	Crystallin, beta B1	<i>Crybb1</i>	Crybb1F	CCGCCTGTCCACCAATACA	250	4.00	-3.63	Hipocampo	Este trabalho
			Crybb1R	CTTTTCCCTTGCCATCAGGC					
	Dopamine transporter 1	<i>Dat1</i>	DatF	GAGGTTTCCCTACCTGTGCT	250	40.00	-3.39	Hipocampo	Green <i>et al.</i> , 2017
			DatR	GTGAAGCCACACCTTTCAG					
	Dopa decarboxylase	<i>Ddc</i>	DdcF	CCTACTGGCTGCTCGGACTA	250	4.00	-3.69	Hipocampo	Liu <i>et al.</i> , 2017
			DdcR	TTTCTACAGAGGAATGCGCC					
	Myocardial infarction associated transcript	<i>Miat</i>	GomF	TGGAACAAGTCACGCTCGATT	250	4.00	-3.52	Hipocampo	Qu <i>et al.</i> , 2017
			GomR	GGTATCCCAAGGAATGAAGTCTGT					
	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)	<i>Grin1</i>	Grin1F	ATACAGATGGCCCTGTCAGTGT	250	4.00	-3.45	Hipocampo	Wei <i>et al.</i> , 2016
			Grin1R	AGTGAAGTGGTCGTTGGGAGTA					
	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)	<i>Grin2a</i>	Grin2aF	GGGATGACCAACGCTTAGTT	250	4.00	-3.27	Hipocampo	Jeong <i>et al.</i> , 2016
			Grin2aR	CCTCAAGGATGACCGAAGAT					
	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)	<i>Grin2b</i>	Grin2bF	CACCTTCATCTGTGAACATCTC	250	4.00	-3.40	Hipocampo	Wei <i>et al.</i> , 2016
			Grin2bR	TATAGCTACTCCGTGGATACAG					
	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	<i>Ido1</i>	Ido1F	CCTTCTGGGAATAAAACACGAGG	250	40.00	-3.19	Hipocampo	Donley <i>et al.</i> , 2016
			Ido1R	CTAAGAAGAAAAGGAAGTTCCG					
	Myelin basic protein	<i>Mpb</i>	MpbF	AACATTGTGACACCTCGAACA	250	4.00	-3.52	Hipocampo	Thakurela <i>et al.</i> , 2016
			MpbR	TGTCTCTTCCTCCCCAGCT					
	Protein S100-A10	<i>p11</i>	p11F	GGCCCAGGTTTCGACAGACT	250	4.00	-3.65	Hipocampo	Este estudo
			p11R	GGGAACCTCCCGTTCCATGAG					
	Proteolipid protein (myelin) 1	<i>Plp1</i>	Plp1F	CAAGACCTCTGCCAGTATAGG	250	4.00	-3.69	Hipocampo	Pereira <i>et al.</i> , 2013
			Plp1R	CAGCAATAAACAGGTGGAAGG					

Tabela 15 (continuação).

Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Serotonin transporter 1	<i>Sert1</i>	SertF	TTCGCCCAGGACAACATCAC	250	40.00	-3.44	Hipocampo	Hata <i>et al.</i> , 2017
		SertR	TGACTGATGGATCTGCAGGACA					
Tryptophan 2,3-dioxygenase	<i>Tdo2</i>	Tdo2F	TGGCAATTACTTGCAGTTGGA	250	4.00	-3.55	Hipocampo	Este estudo
		Tdo2R	GTGCTCGTCATGGATTTTGTTC					
Tyrosine hydroxylase	<i>Th</i>	ThF	AGTGCCAGAGAGGACAAGGT	250	40.00	-3.15	Hipocampo	Jeong <i>et al.</i> , 2016
		ThR	GTCCAGGTCAGGGTCAAACT					
Tryptophan hydroxylase 1	<i>Tph1</i>	Tph1F	ACTGCGACATCAGCCGAGAA	250	40.00	-3.45	Hipocampo	Hata <i>et al.</i> , 2017
		Tph1R	CGCAGAAGTCCAGGTCAGAAATC					
Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2	<i>Slc18a2</i>	Vmat2F	ATGCTATCGGTCCCTCTGCTGGTG	250	4.00	-3.48	Hipocampo	Pristerà <i>et al.</i> , 2015
		Vmat2R	GACGGGGTACGGCTGGACATTATT					

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidades de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência da reação de qPCR.

Tabela 16. Painel de primers cujos alvos foram transcritos codificadores de moléculas reguladoras da barreira epitelial.

Molécula	Símbolo	Primer	Sequencia (5'-3')	Conc. (nM) ¹	Qtd. cDNA (ng) ²	Slope ³	Sítio	Referência
Occludin	<i>Ocln</i>	OclnF	CAGCCTTCTGCTTCATCG	250	4.00	-3.48	Hipocampo	Hu <i>et al.</i> , 2016
		OclnR	GTCGGGTTCCTCCCATTA					
Claudin 5	<i>Cldn5</i>	Cld5F	CAGTTAAGGCACGGGTAGCA	250	4.00	-3.53	Hipocampo	Di Pardo <i>et al.</i> , 2017
		Cld5R	GGCACCGTCGGATCATAGAA					

¹Concentrações dos primers, em nano molar (nM). ²Quantidades de cDNA, em nano gramas (ng). ³Os valores de slope foram utilizados para calcular a linearidade ou eficiência da reação de qPCR.

V.4. RESULTADOS

V.4.1 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 REDUZIRAM O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE

Ao comparar o comportamento tipo-depressivo dos camundongos entre os diferentes grupos, foi observado que nos contextos do estresse crônico (grupo CtStrs), da colite (DSS) e do estresse com colite (StrsDSS) o tempo de imobilidade foi aumentado. Além disso, foi observado que os tratamentos com o Citalopram (grupos CitaStrs, CitaDSS e CitaStrsDSS) ou *W. paramesenteroides* WpK4 (grupos WpK4Strs, WpK4DSS e WpK4StrsDSS) tenderam a reduzir a imobilidade, independentemente do sexo dos camundongos (**Figuras 42, 43, 44 e 45**).

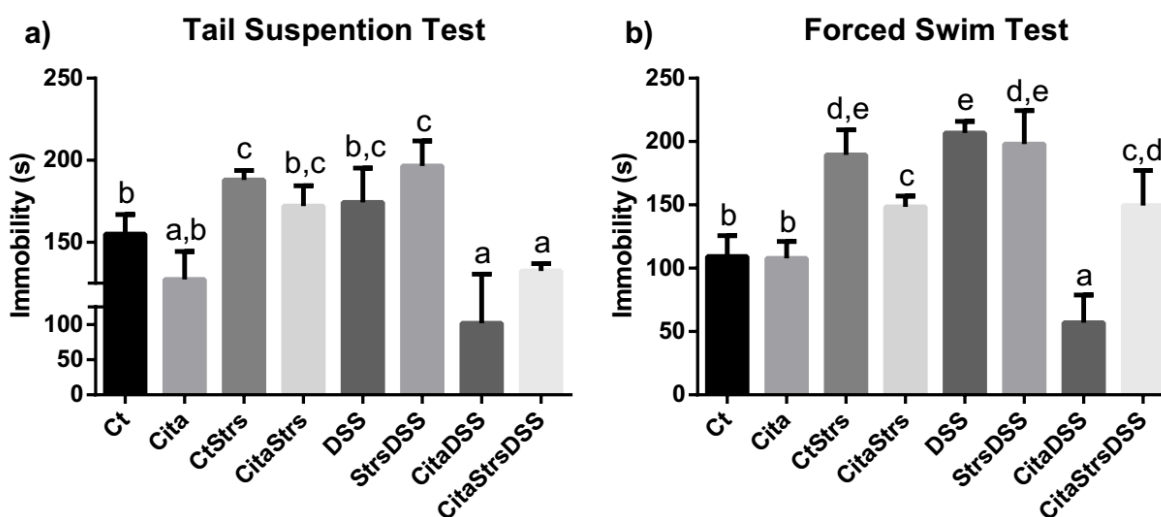


Figura 42. Imobilidade dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Camundongos estressados (CtStrs), com colite (DSS) e estressados com colite tratados (StrsDSS) tratados com Citalopram (CitaStrs, CitaDSS e CitaStrsDSS) apresentaram menor imobilidade nos testes de **a)** suspensão pela cauda (*Tail suspension test*) e de **b)** nado forçado (*Forced swim test*). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

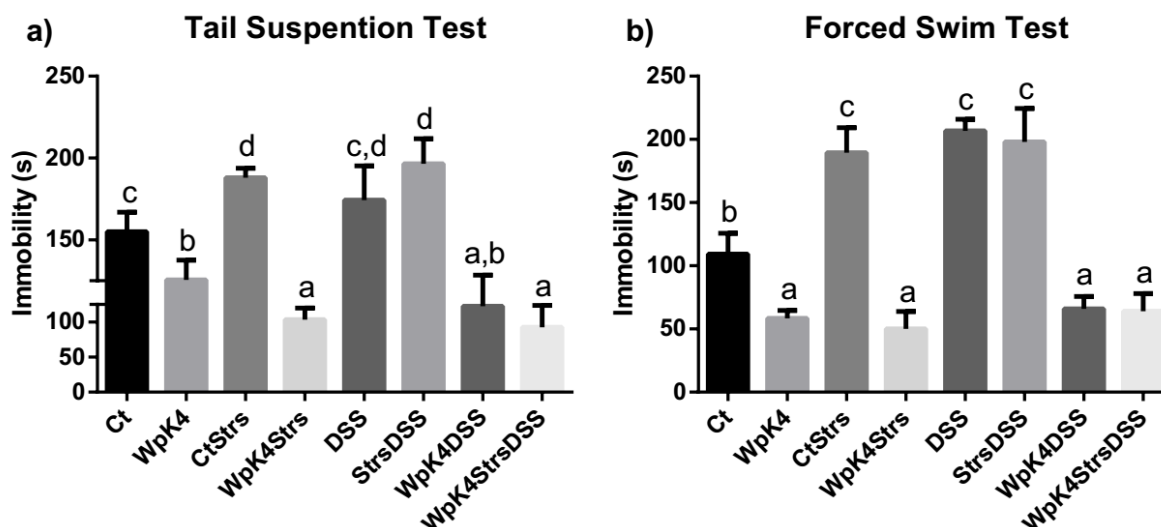


Figura 43. Imobilidade dos camundongos fêmeas tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Camundongos estressados (Strs), com colite (DSS) e estressados com colite tratados (StrsDSS) tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 (WpK4Strs, WpK4DSS e WpK4StrsDSS) apresentaram menor imobilidade nos testes de **a)** suspensão pela cauda (*Tail suspension test*) e de **b)** nado forçado (*Forced swim test*). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com WpK4.

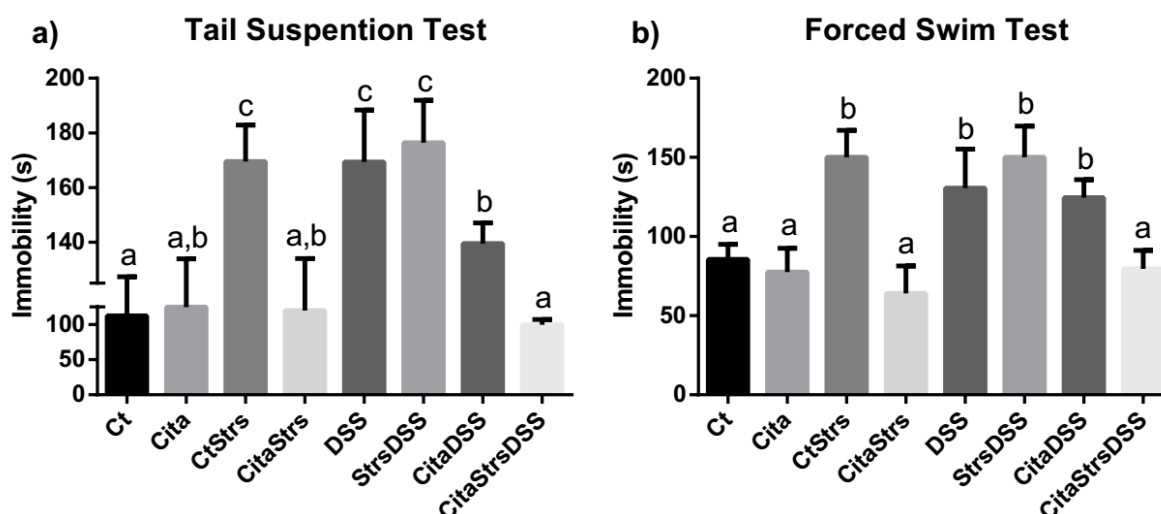


Figura 44. Imobilidade dos camundongos machos tratados com Citalopram. Camundongos estressados (CtStrs), com colite (DSS) e estressados com colite tratados (StrsDSS) tratados com Citalopram (CitaStrs, CitaDSS e CitaStrsDSS) apresentaram menor imobilidade nos testes de **a)** suspensão pela cauda (*Tail suspension test*) e de **b)** nado forçado (*Forced swim test*). Letras

diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

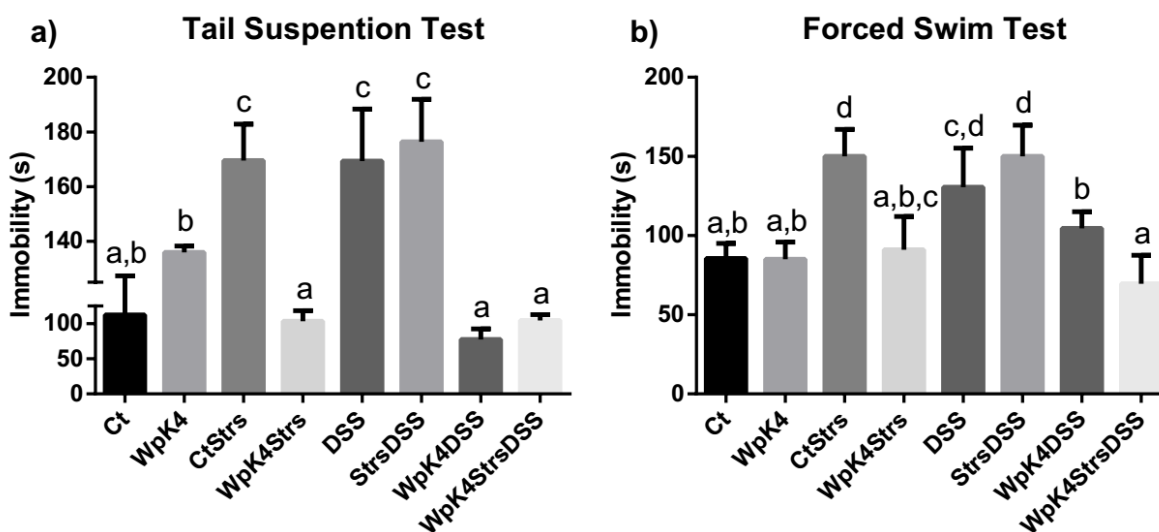


Figura 45. Imobilidade dos camundongos machos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Camundongos estressados (CtStrs), com colite (DSS) e estressados com colite tratados (StrsDSS) tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 (WpK4Strs, WpK4DSS e WpK4StrsDSS) apresentaram menor imobilidade nos testes de **a)** suspensão pela cauda (*Tail suspension test*) e de **b)** nado forçado (*Forced swim test*). Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com WpK4.

V.4.2 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS DO SISTEMA IMUNE NO HIPOCAMPO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE

Uma vez observadas alterações comportamentais entre os diferentes grupos de camundongos, foi investigada a expressão gênica de algumas moléculas no hipocampo, as quais foram, grosseiramente, agrupadas em moléculas reguladoras da imunidade (*Nos2*, *Il1b*, *Ifng*, *Cxcl1*, *Il6*, *Tgfb1* e *Il10*), moléculas associadas ao metabolismo das monoaminas (*Tph1*, *Th*, *Ddc*, *Ido1* e *Tdo2*), moléculas associadas à plasticidade neuronal (*Bdnf*, *p11*, *Miat* e *Crybb1*), à transportadores de neurotransmissores (*Sert*, *Dat*, *Slc18a2*, *Grin1*, *Gin2a* e *Grin2b*), à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica (*Mpb*, *Plp1*, *Cldn5* e *Ocn1*).

Neste estudo, os camundongos fêmeas estressados (CtStrs) tiveram a expressão de *Il1b* e de *Il6* aumentadas e a de *Cxcl1* reduzida. O tratamento com Citalopram (CitaStrs) reduziu a expressão de *Il1b* e *Il6* (**Figuras 46**). No contexto da colite (DSS) e do estresse com colite (StrsDSS), não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos (**Figuras 46**).

Ao analisar os camundongos fêmeas estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Il1b* e de *Il6* e o aumento de *Il10* comparativamente aos camundongos estressados (CtStrs). No contexto da colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) reduziu a expressão de *Il6* e aumentou a de *Il10* (**Figura 47**). Em relação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS), o tratamento (WpK4StrsDSS) reduziu apenas a expressão de *Il6* (**Figura 47**).

Em relação aos camundongos machos, o estresse crônico (CtStrs) aumentou a expressão de *Nos2*, *Il1b*, *Ifng*, *Cxcl1*, *Il6* e de *Tgfb1*. Em contrapartida, o tratamento com Citalopram (CitaStrs) inverteu a situação, reduzindo a expressão de *Nos2*, *Ifng*, *Cxcl1*, *Il6* e de *Tgfb1* (**Figura 48**). No grupo dos camundongos com colite (DSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS) reduziu a expressão de *Il1b* e de *Il10*. Já nos camundongos estressados com colite (StrsDSS), quando tratados (CitaStrsDSS), reduziram a expressão de *Ifng*, *Cxcl1* e de *Il10* (**Figuras 48**).

Nos ensaios de tratamento com a bactéria, ao analisar os camundongos machos estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Nos2*, *Il1b*, *Ifng*, *Cxcl1*, *Il6* e de *Tgfb1* comparativamente aos camundongos apenas estressados (CtStrs). Nos camundongos com colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) aumentou a expressão

de *Il6* (Figura 49). No contexto do estresse crônico com colite (StrsDSS), o tratamento com a WpK4 (WpK4StrsDSS) reduziu a expressão de *Nos2*, *Ifng* e de *Il6* (Figura 49).

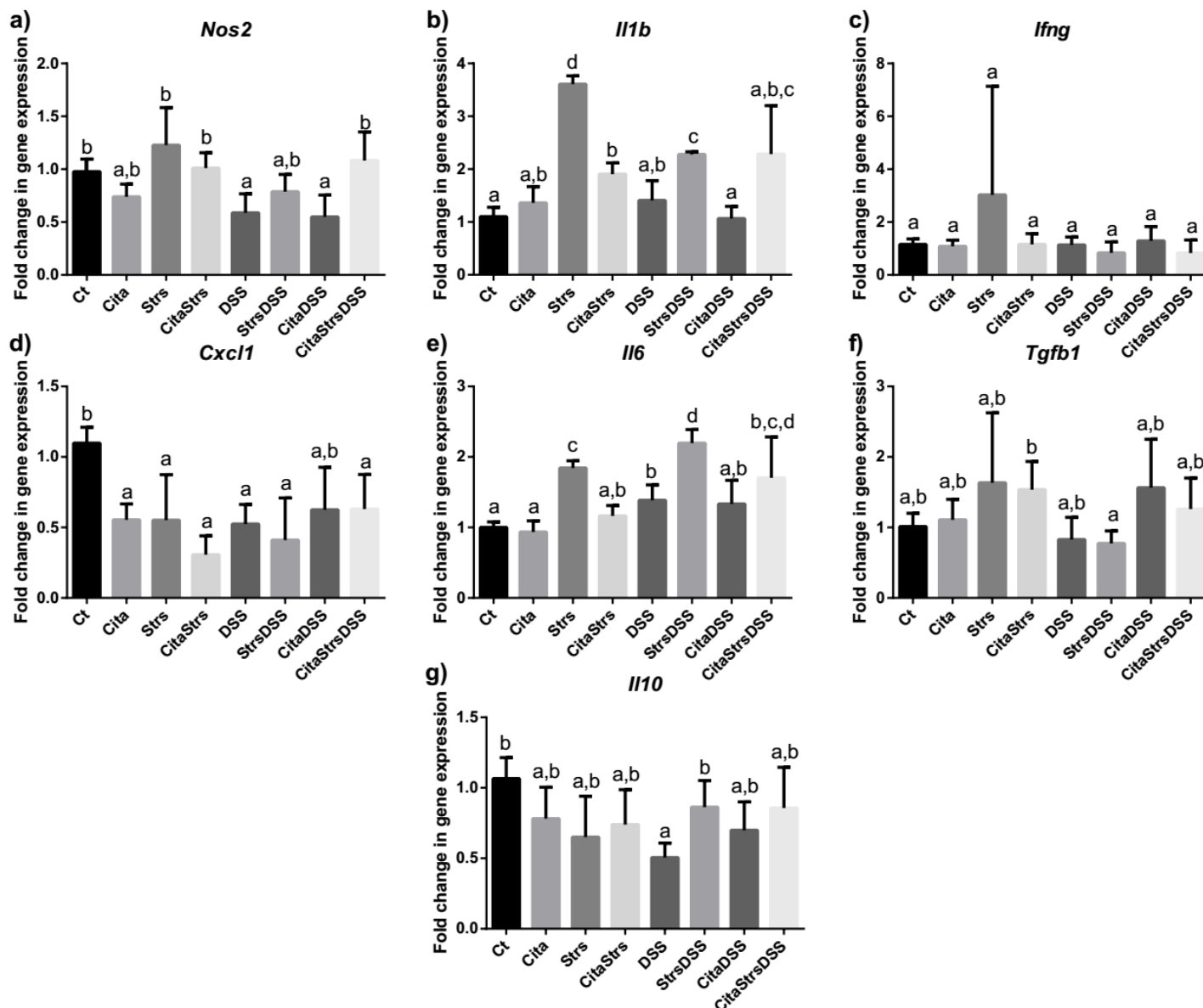


Figura 46. Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

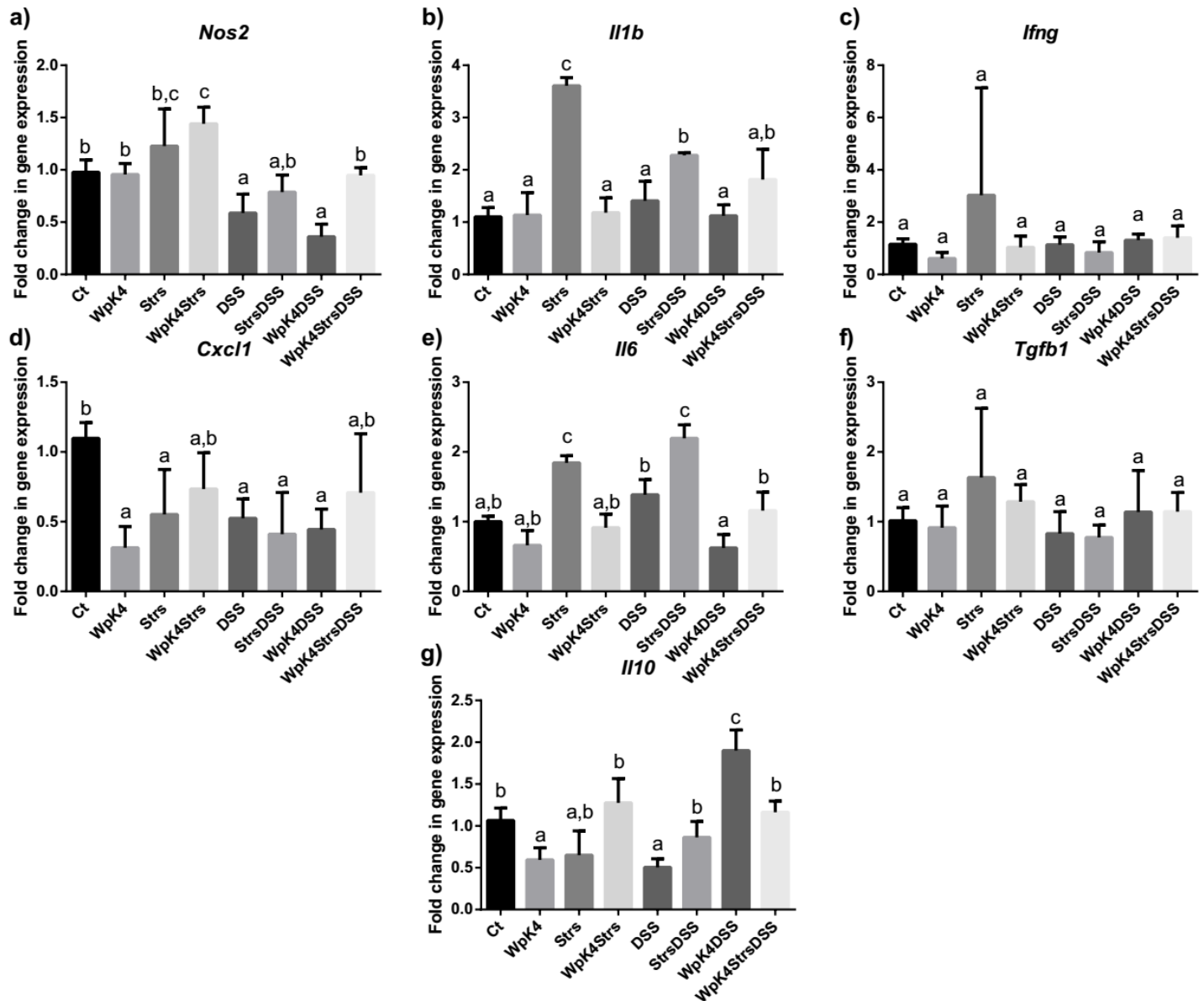


Figura 47. Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

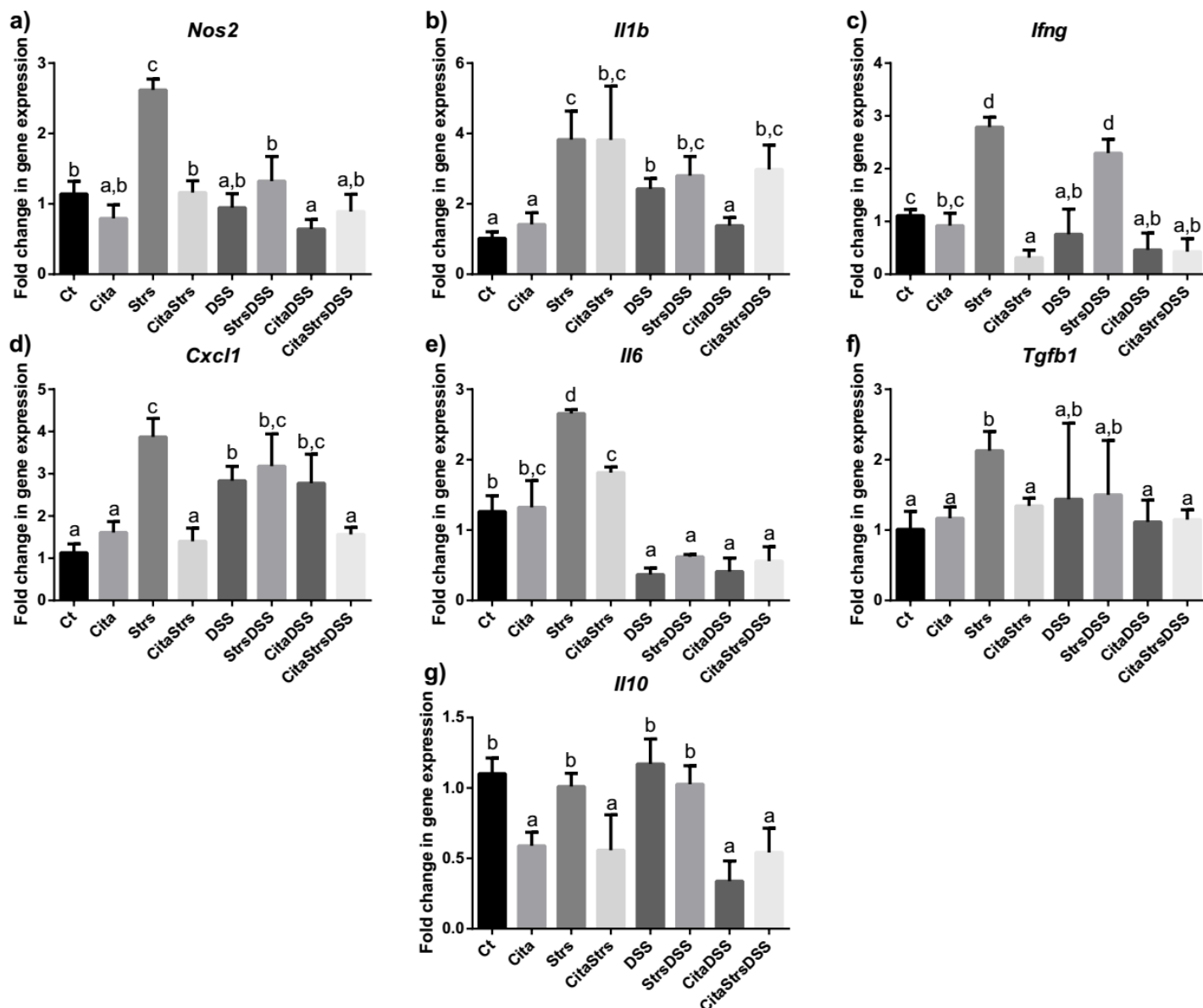


Figura 48. Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

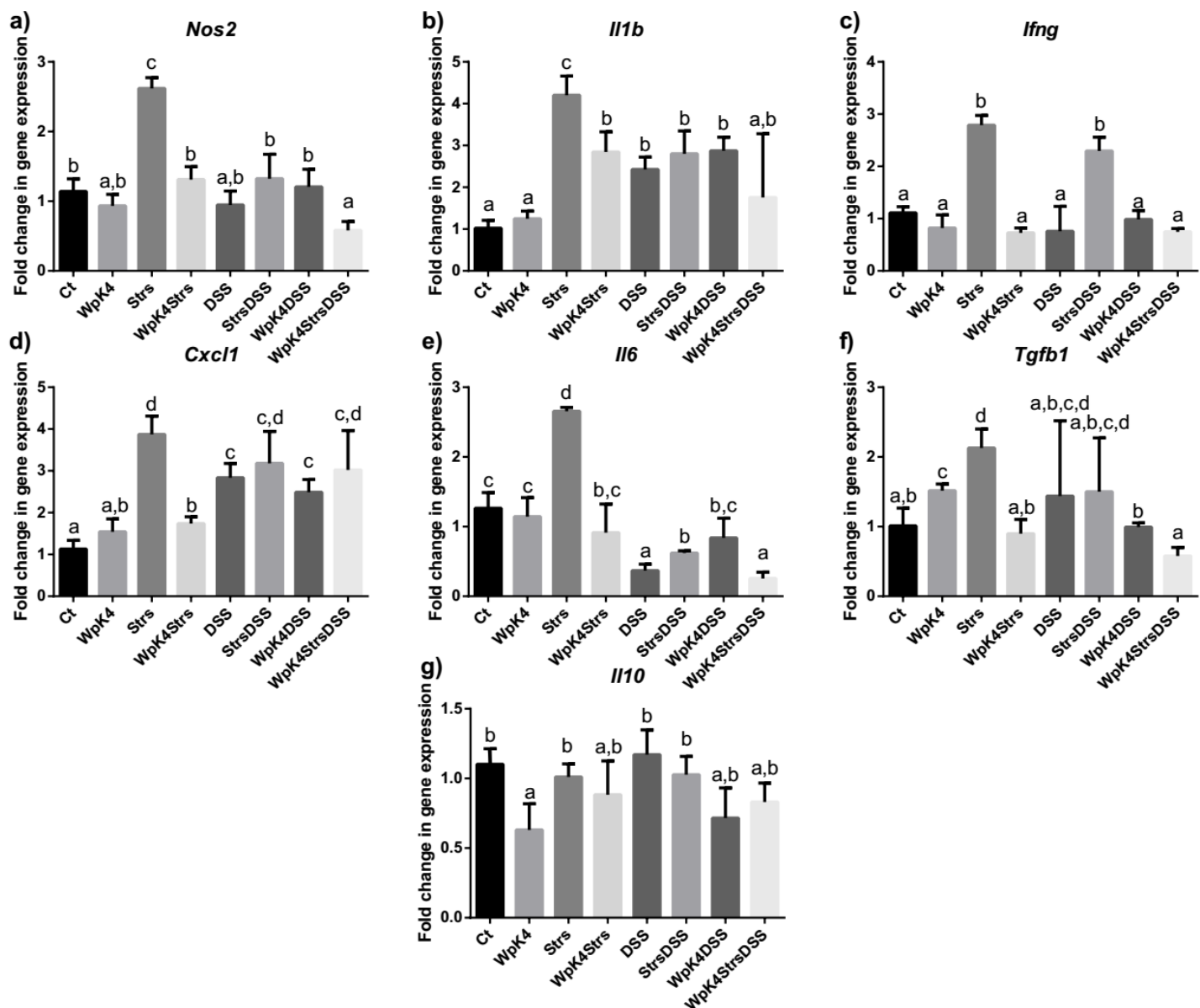


Figura 49. Expressão gênica de moléculas imunes no hipocampo dos camundongos machos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

V.4.3 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS METABOLIZADORAS E TRANSPORTADORAS DAS MONOAMINAS NO HIPOCAMPO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE

Em relação às moléculas associadas ao metabolismo e transporte das monoaminas, foi observado que os camundongos fêmeas estressados (CtStrs) tiveram a expressão de *Tph1*, *Ido1*, *Tdo2*, *Grin2a* e *Grin2b* aumentadas e a de *Th* reduzida. O tratamento com Citalopram (CitaStrs) regulou a expressão de algumas moléculas de modo a reduzir a expressão de *Ido1*, *Tdo2* e *Grin2b* e a aumentar a expressão de *Th* (**Figuras 50 e 51**). No contexto da colite (DSS), os camundongos fêmeas tratados com Citalopram (CitaDSS) aumentaram a expressão de *Tdo2*, *Sert* e *Dat*, enquanto que no contexto do estresse com colite (StrsDSS) o tratamento (CitaStrsDSS) reduziu a expressão de *Ido1* e aumentou a de *Tdo2*, *Sert* e *Grin2a* (**Figuras 50 e 51**).

Ao analisar os camundongos fêmeas estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Ido1*, *Tdo2* e de *Grin2b* e o aumento de *Th* comparativamente aos camundongos estressados (CtStrs). No contexto da colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) reduziu a expressão de *Grin2b* (**Figuras 52 e 53**). Em relação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS), o tratamento (WpK4StrsDSS) reduziu a expressão de *Ido1* e de *Grin2a* e aumentou a de *Sert* (**Figuras 52 e 53**).

Em relação aos camundongos machos, o estresse crônico (CtStrs) aumentou a expressão de *Ddc*, *Ido1*, *Tdo2*, *Sert*, *Slc18a2*, *Grin1*, *Grin2a* e de *Grin2b*. Em contrapartida, o tratamento com Citalopram (CitaStrs) reduziu a expressão de *Ddc*, *Ido1*, *Tdo2*, *Grin1* e de *Grin2b* (**Figuras 54 e 55**). No grupo dos camundongos com colite (DSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS) reduziu a expressão de *Th*, *Sert* e *Dat* e aumentou a de *Ddc*. Já nos camundongos estressados com colite (StrsDSS), quando tratados (CitaStrsDSS), reduziram a expressão de *Sert* (**Figuras 54 e 55**).

Nos ensaios de tratamento com a bactéria, ao analisar os camundongos machos estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Ido1* e de *Grin2b* comparativamente aos camundongos apenas estressados (CtStrs). Nos camundongos com colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) reduziu a expressão de *Dat* e de *Grin2a*. No contexto do estresse crônico com colite (StrsDSS), o tratamento com a WpK4 (WpK4StrsDSS) aumentou a expressão de *Sert*, *Dat* e de *Slc18a2* (**Figuras 56 e 57**).

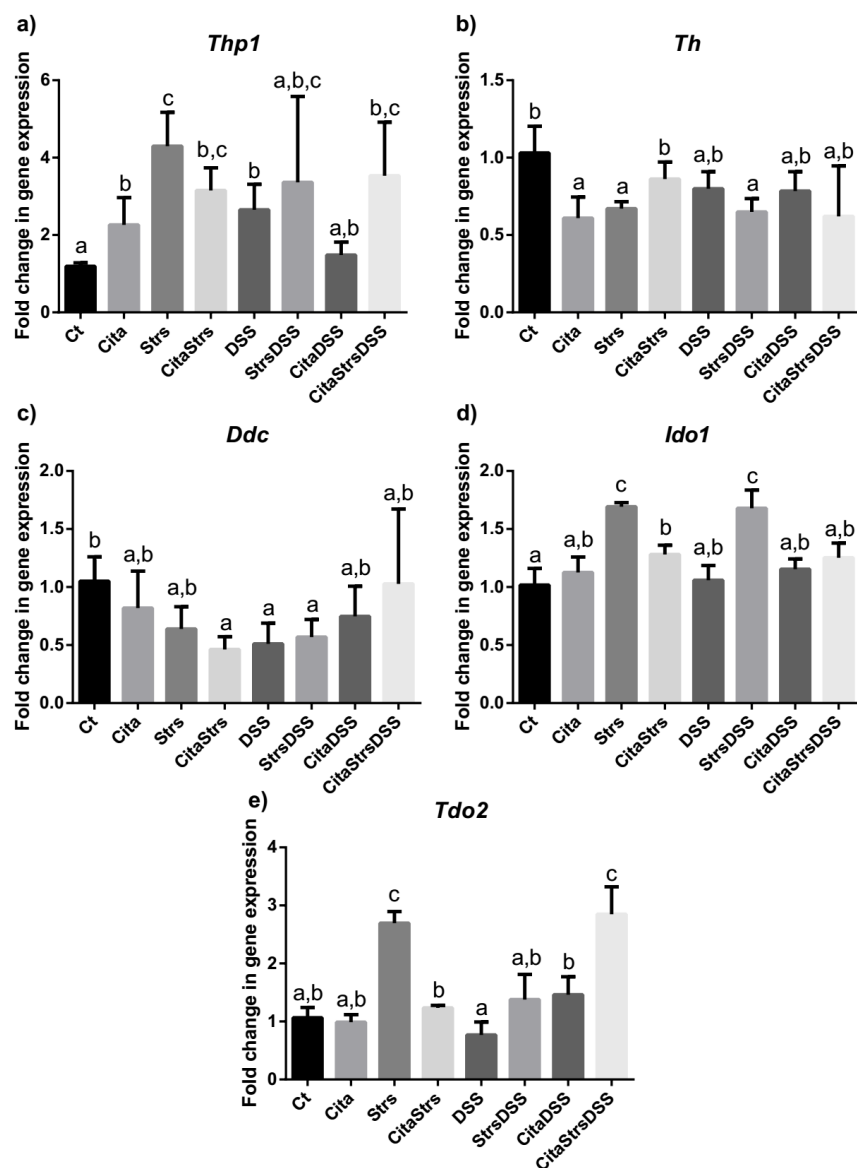


Figura 50. Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

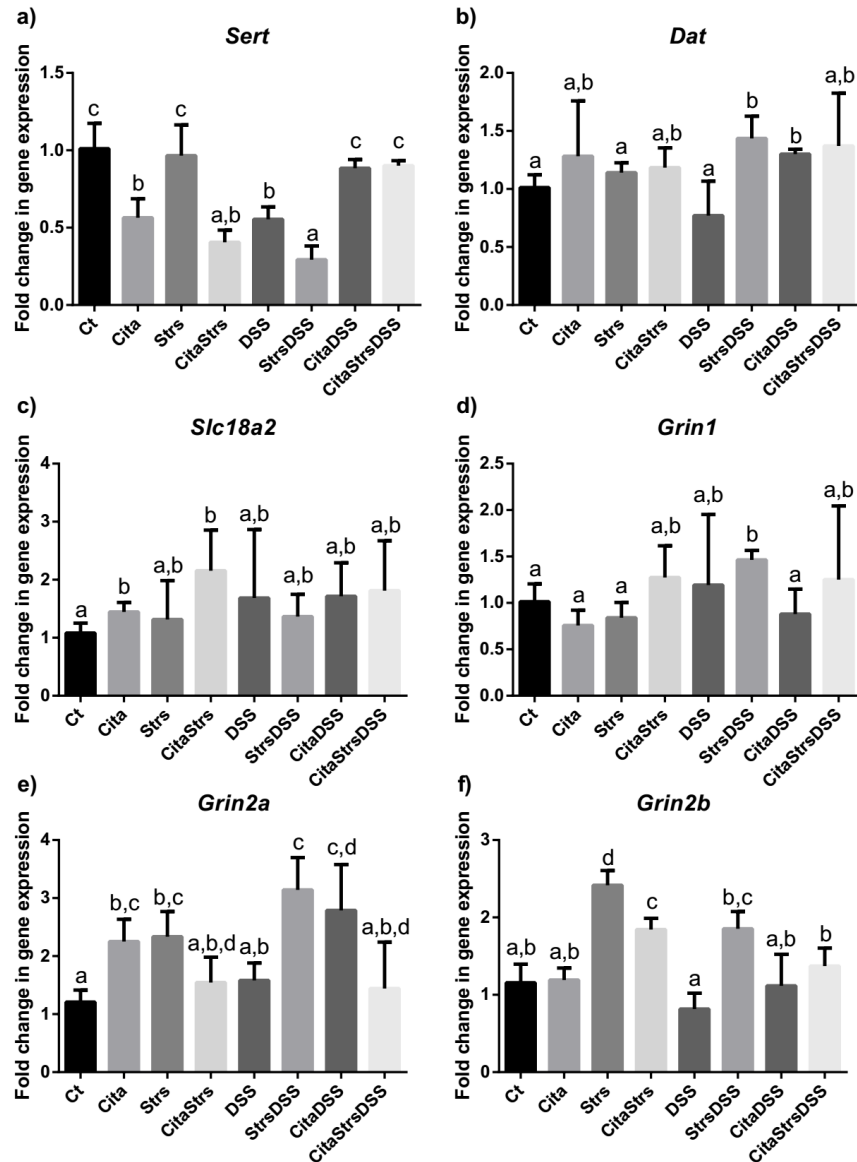


Figura 51. Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

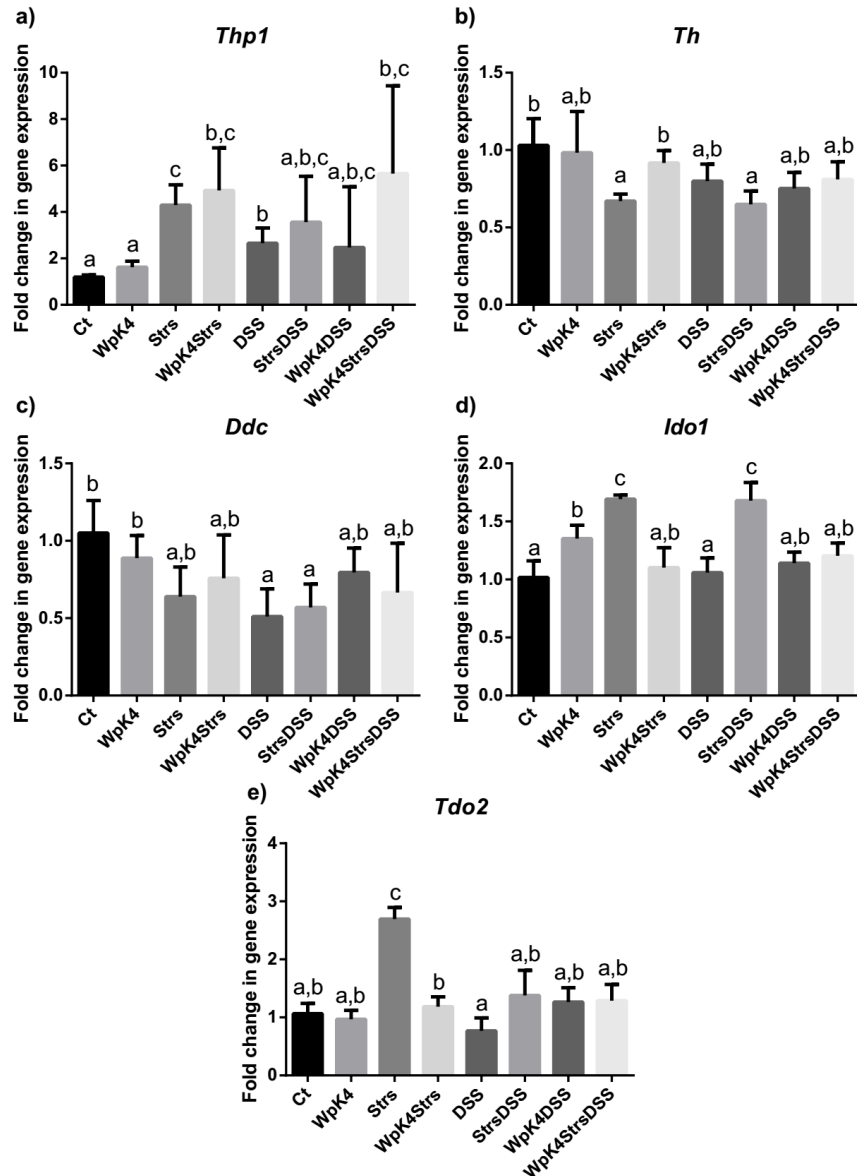


Figura 52. Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

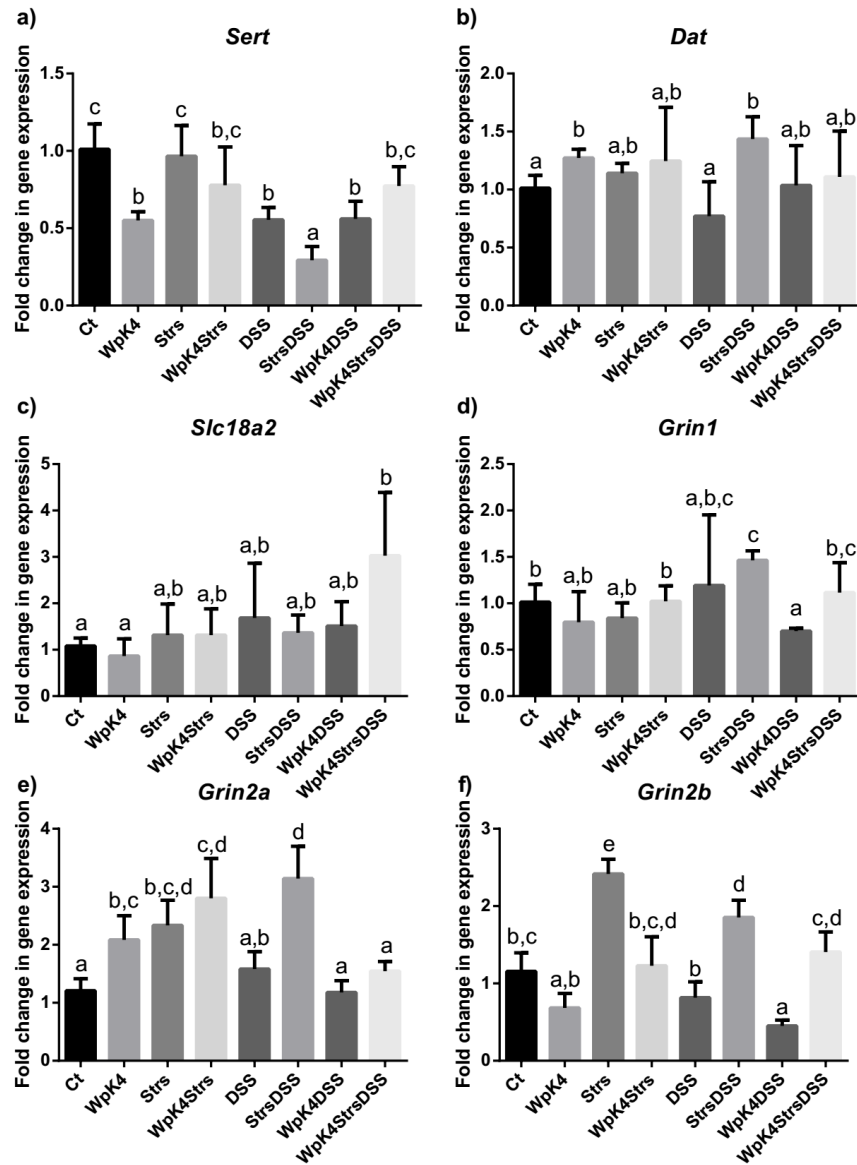


Figura 53. Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

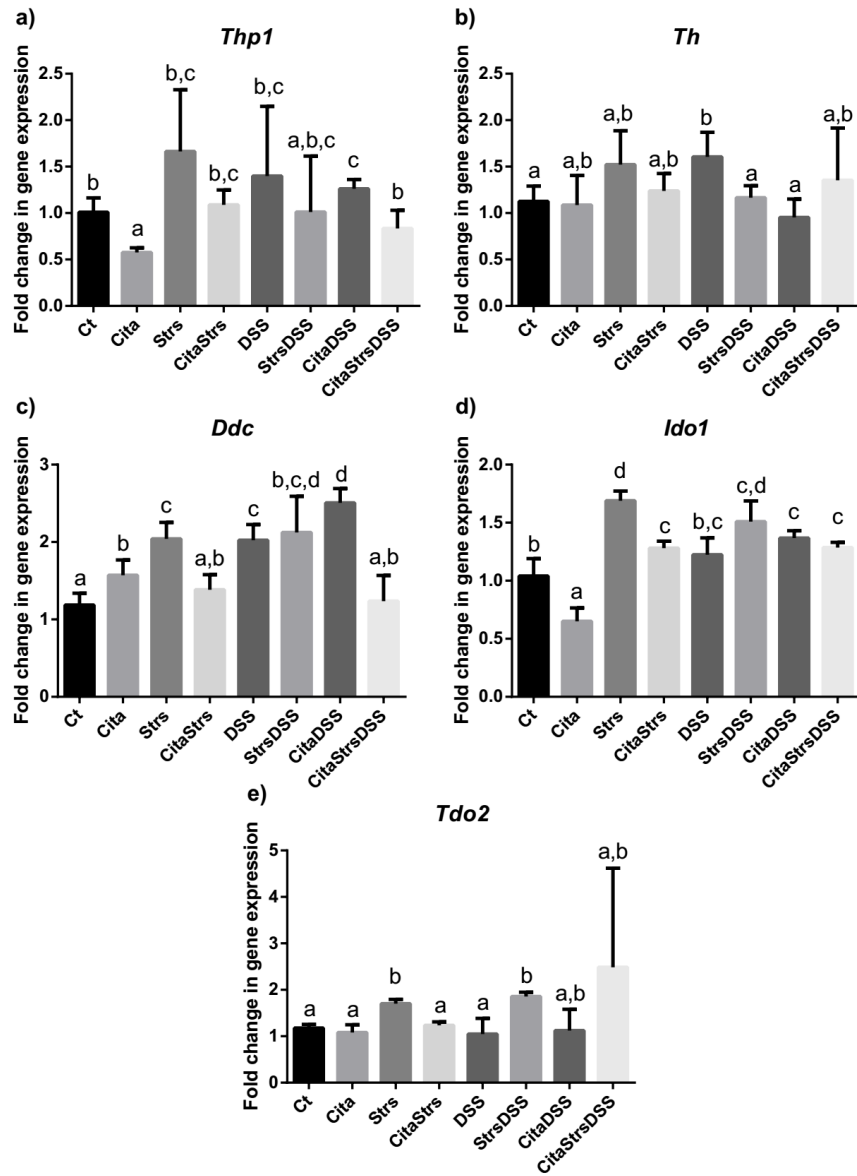


Figura 54. Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

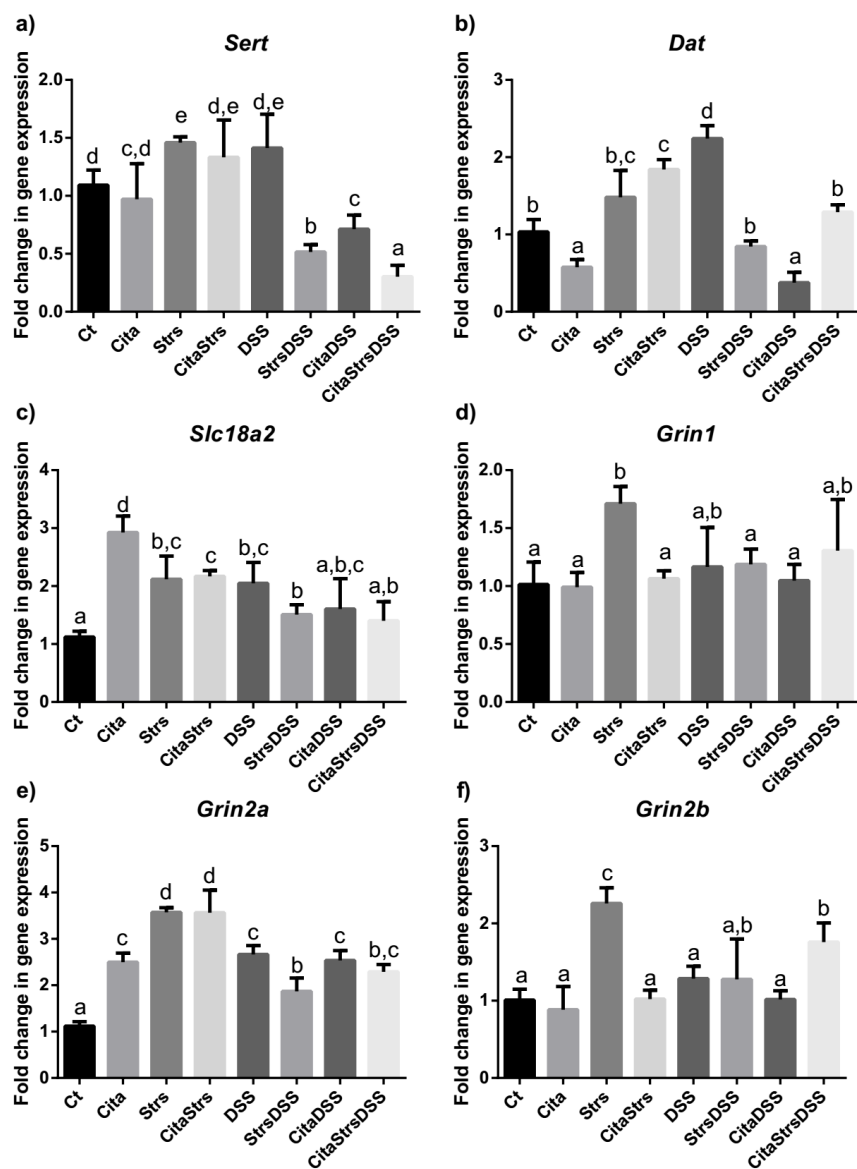


Figura 55. Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

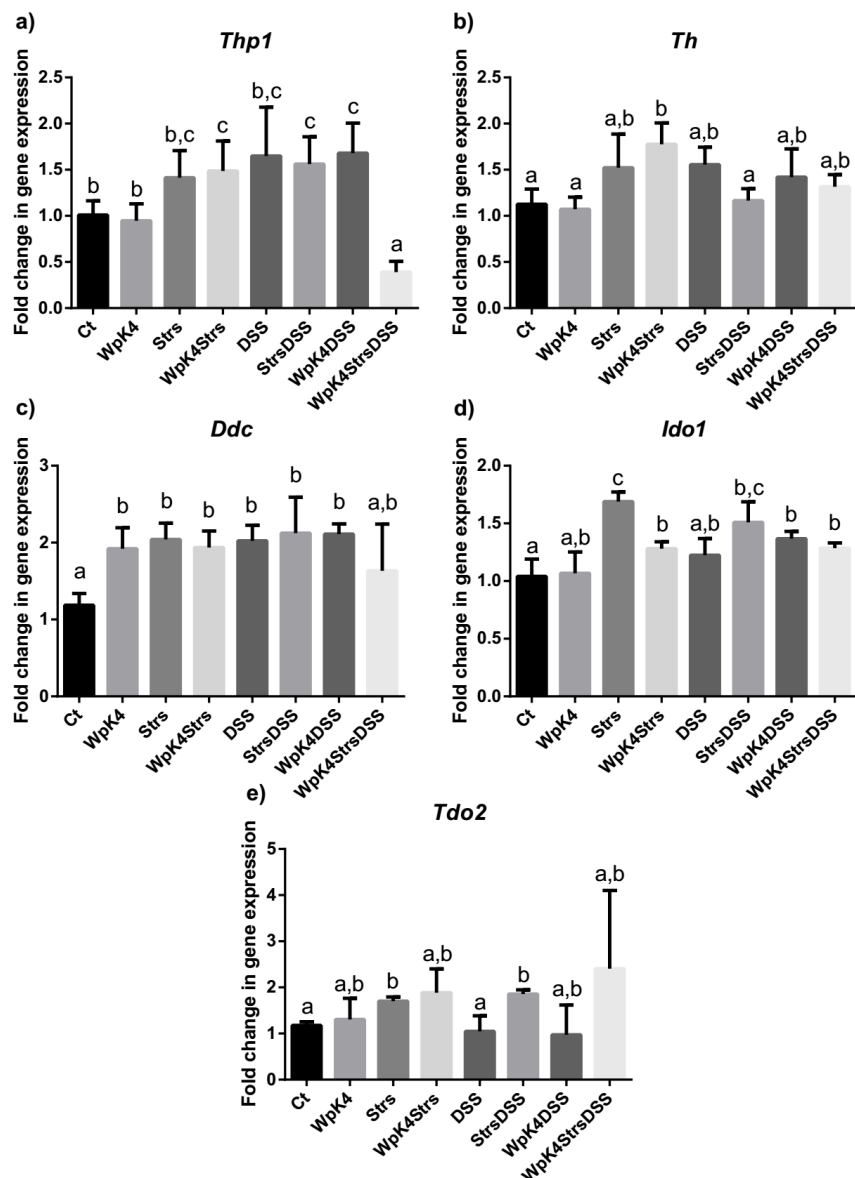


Figura 56. Expressão gênica de moléculas associadas ao metabolismo de monoaminas no hipocampo dos camundongos machos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

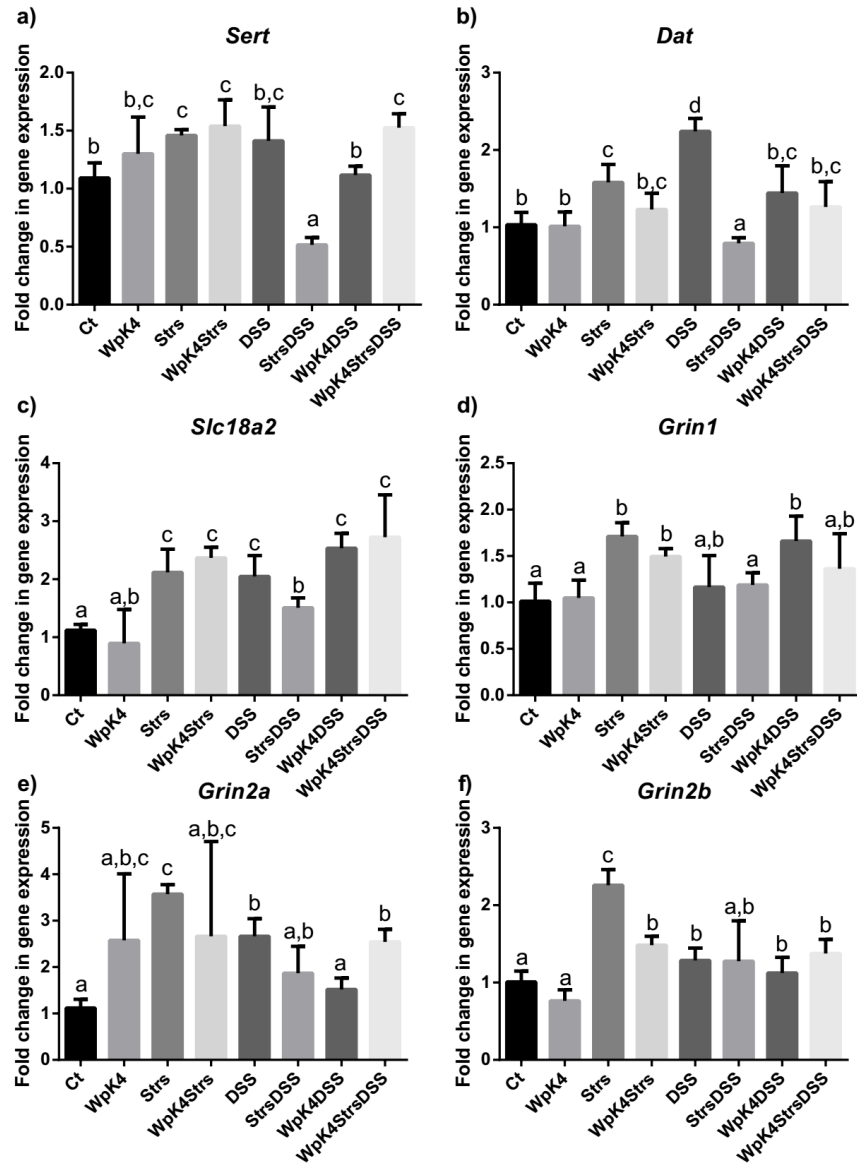


Figura 57. Expressão gênica de transportadores de neurotransmissores no hipocampo dos camundongos machos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

V.4.4 OS TRATAMENTOS COM CITALOPRAM OU *W. paramesenteroides* WpK4 MODULARAM MOLÉCULAS ASSOCIADAS À PLASTICIDADE NEURONAL E À PERMEABILIDADE HEMATOENCEFÁLICA NO HIPOCAMPO DOS CAMUNDONGOS ESTRESSADOS OU COM COLITE

Ao analisar as moléculas associadas à plasticidade neuronal e à permeabilidade hematoencefálica foi observado que os camundongos fêmeas estressados (CtStrs) tiveram a expressão de *Crybb1* aumentada e a de *p11* e de *Miat* reduzidas. Quando os camundongos foram tratados com Citalopram (CitaStrs), a expressão de *p11* e de *Miat* foi aumentada (**Figuras 58 e 59**). No contexto da colite (DSS), os camundongos fêmeas tratados com Citalopram (CitaDSS) aumentaram a expressão de *Miat*, *Crybb1* e de *Ocln*, enquanto que no contexto do estresse com colite (StrsDSS) não foram observadas diferenças significativas relativas ao tratamento (CitaStrsDSS - **Figuras 58 e 59**).

Ao analisar os camundongos fêmeas estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observado o aumento de *p11* e de *Miat* comparativamente aos camundongos somente estressados (CtStrs). No contexto da colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) reduziu a expressão de *p11* e aumentou a de *Miat* (**Figuras 60 e 61**). Em relação aos camundongos estressados com colite (StrsDSS), o tratamento (WpK4StrsDSS) aumentou a expressão de *Ocln* e de *Crybb1* (**Figuras 60 e 61**).

Em relação aos camundongos machos, o estresse crônico (CtStrs) aumentou a expressão de *Miat*, *Crybb1*, *Mpb*, *Plp1* e *Cldn5* e a redução na expressão de *Bdnf* e de *p11*. Em contrapartida, o tratamento com Citalopram (CitaStrs) aumentou a expressão de *Ocln*, *Bdnf* e de *p11* e reduziu a de *Cldn5* (**Figuras 62 e 63**). No grupo dos camundongos com colite (DSS), o tratamento com Citalopram (CitaDSS) reduziu a expressão de *Crybb1*, *Mpb* e *Cldn5*. Já nos camundongos estressados com colite (StrsDSS), quando tratados (CitaStrsDSS), reduziram a expressão *Plp1* e aumentaram a de *p11* (**Figuras 62 e 63**).

Nos ensaios de tratamento com a bactéria, ao analisar os camundongos machos estressados e tratados com a WpK4 (WpK4Strs), foi observada a redução da expressão de *Cldn5* e o aumento de *Bdnf*, *p11*, *Crybb1*, *Mpb*, *Plp1* e *Ocln* comparativamente aos camundongos apenas estressados (CtStrs). Nos camundongos com colite (DSS), o tratamento com a bactéria (WpK4DSS) aumentou a expressão de *Bdnf* e de *p11*. No contexto do estresse crônico com colite (StrsDSS), o tratamento

com a WpK4 (WpK4StrsDSS) reduziu a expressão de *Plp1* e aumentou a de *Bdnf*, *Miat* e *Mpb* (Figuras 64 e 65).

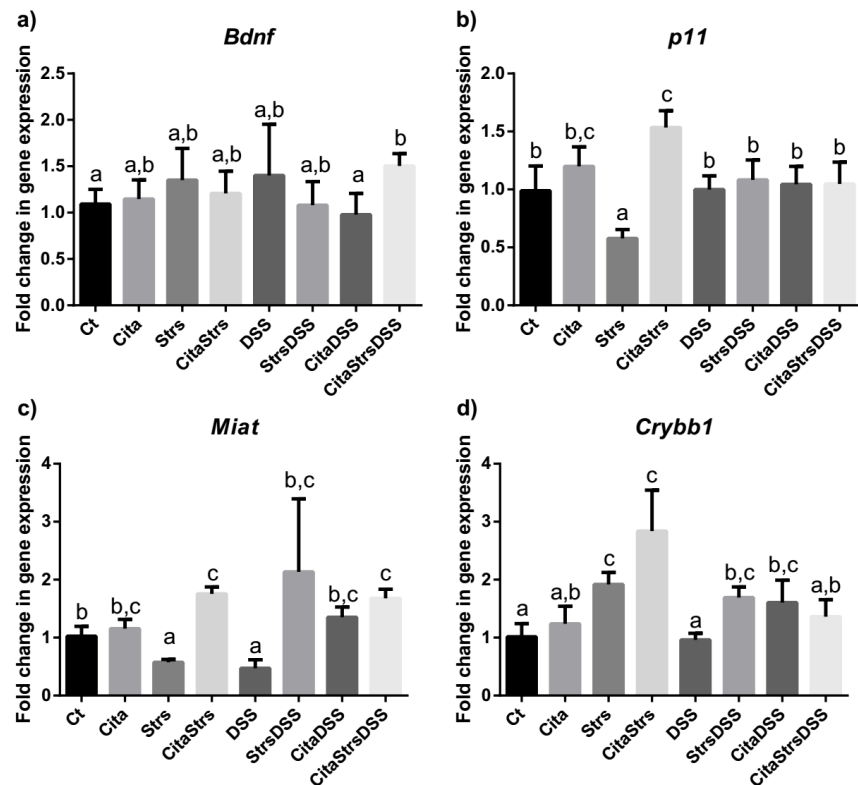


Figura 58. Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

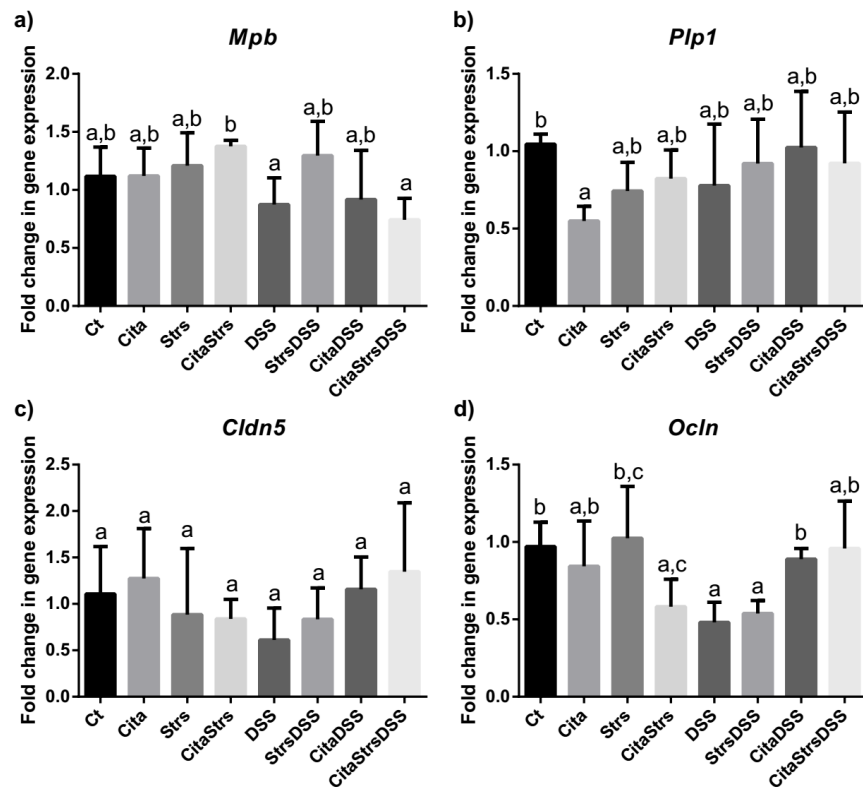


Figura 59. Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

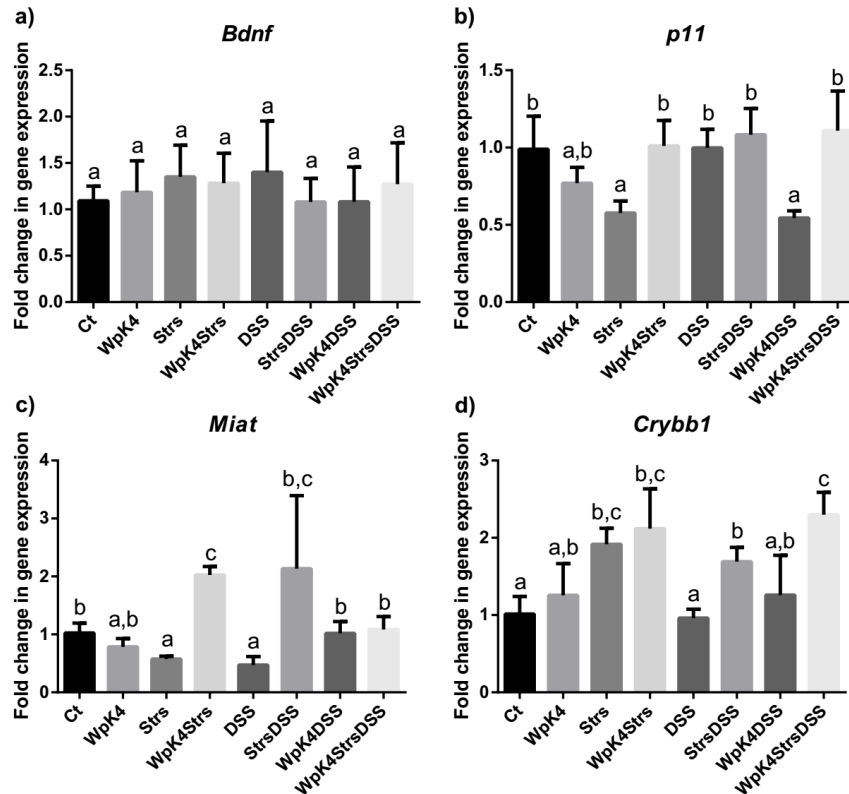


Figura 60. Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

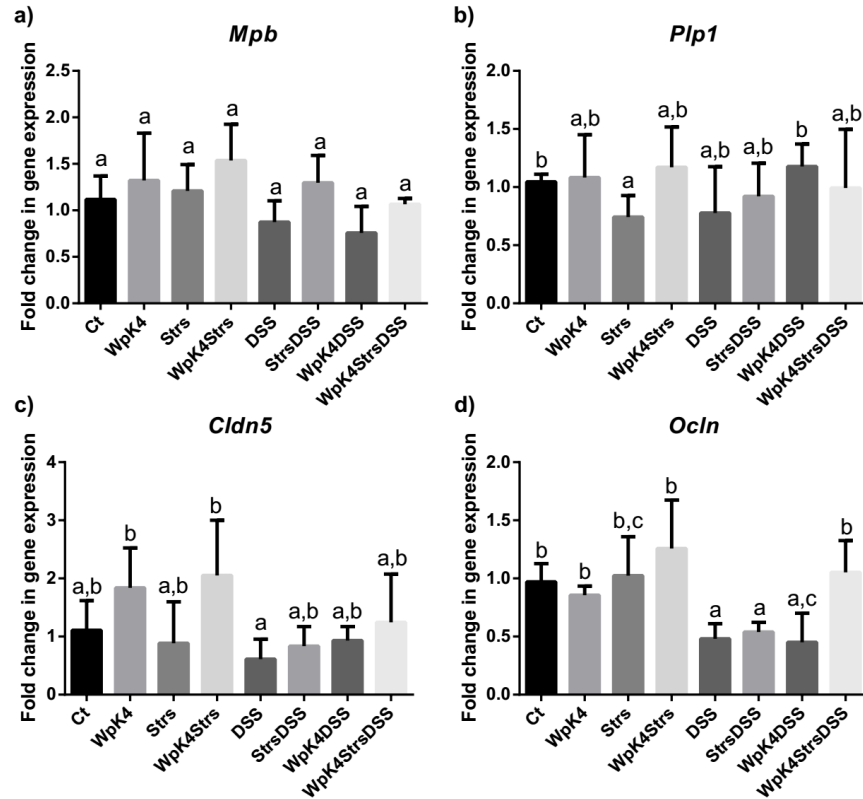


Figura 61. Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos fêmeas tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

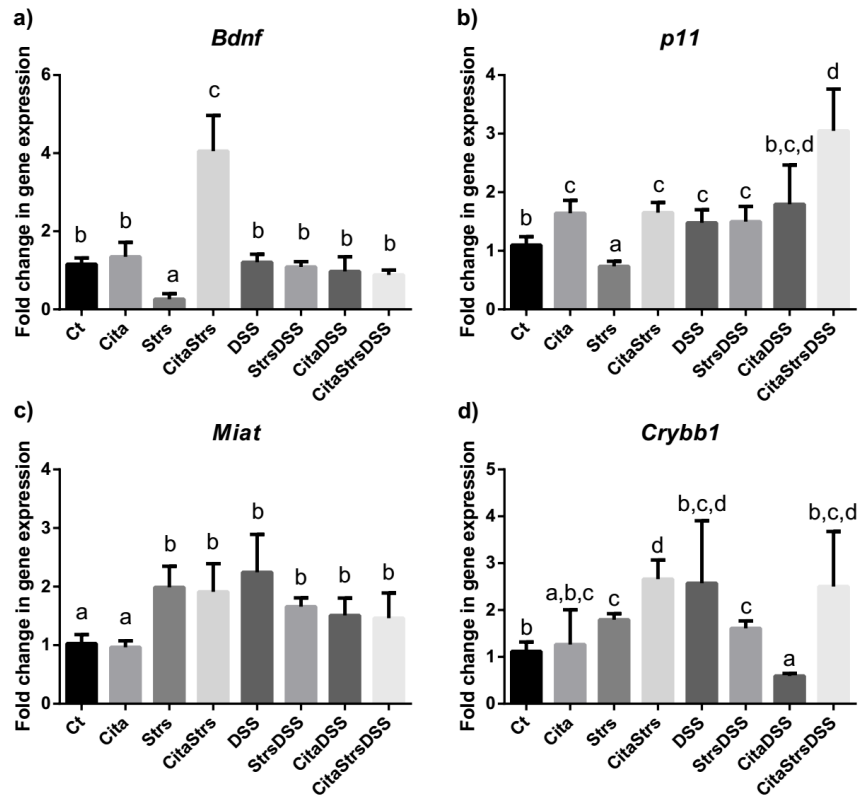


Figura 62. Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

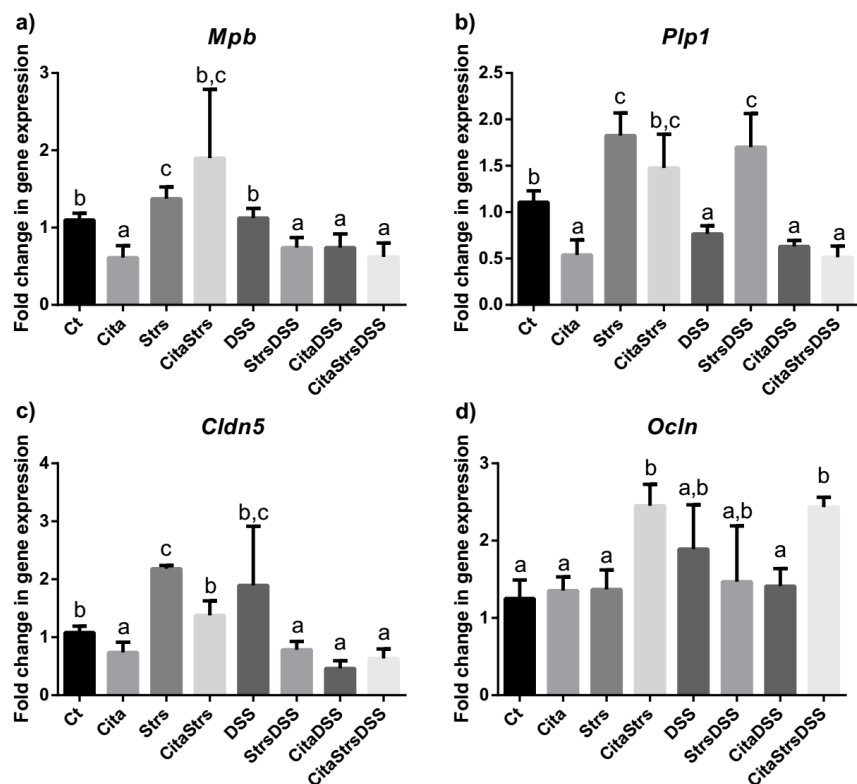


Figura 63. Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos machos tratados com Citalopram. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, Cita – camundongos tratados com Citalopram, CtStrs – camundongos estressados, CitaStrs – camundongos estressados tratados com Citalopram, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, CitaDSS – camundongos com colite e tratados com Citalopram, CitaStrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com Citalopram.

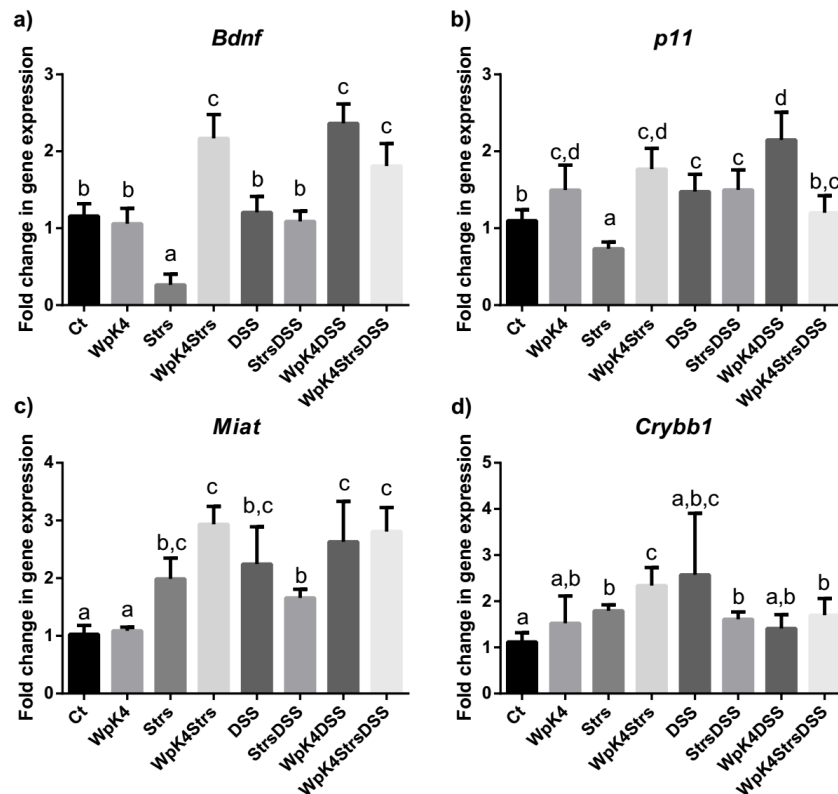


Figura 64. Expressão gênica de moléculas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo dos camundongos machos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

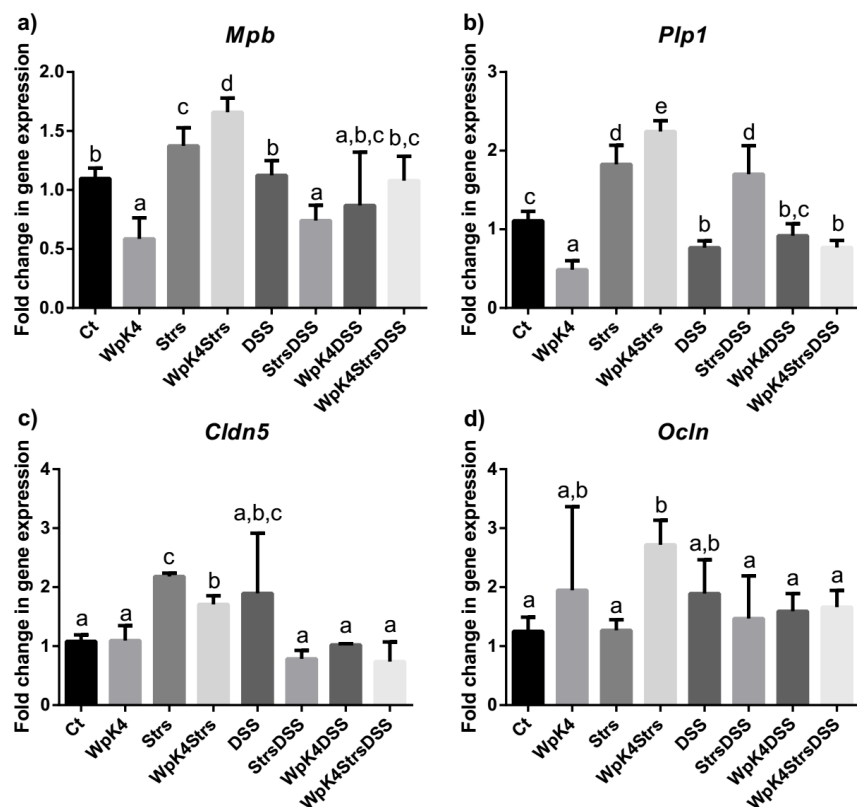


Figura 65. Expressão gênica de moléculas associadas à bainha de mielina e à barreira hematoencefálica no hipocampo dos camundongos machos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4. Letras diferentes indicam que as comparações entre os grupos foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ct – camundongos não receberam tratamentos específicos, WpK4 – camundongos tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, CtStrs – camundongos estressados, WpK4Strs – camundongos estressados tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, DSS – camundongos com colite, StrsDSS – camundongos estressados com colite, WpK4DSS – camundongos com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4, WpK4StrsDSS – camundongos estressados com colite e tratados com *W. paramesenteroides* WpK4.

O resumo dos resultados deste capítulo pode ser observado nas Tabelas 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

Tabela 17. Resumo dos resultados: Citalopram – Ensaio de suspensão pela cauda e nado forçado e moléculas imunes.

	Grupos	Imobilidade S	Imobilidade N	<i>Nos2</i>	<i>Il1b</i>	<i>Ifng</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Il6</i>	<i>Tgfb1b</i>	<i>Il10</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	↑	↑	n.s.	↑	n.s.	↓	↑	n.s.	n.s.
	Ct X DSS	n.s.	↑	↓	n.s.	n.s.	↓	↑	n.s.	↓
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	↓	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	DSS X CitaDSS	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	StrsDSS x CitaStrsDSS	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Grupos	Imobilidade S	Imobilidade N	<i>Nos2</i>	<i>Il1b</i>	<i>Ifng</i>	<i>Cxcl1</i>	<i>Il6</i>	<i>Tgfb1b</i>	<i>Il10</i>
Machos	Ct X CtStrs	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	n.s.
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	↑	↓	↑	↓	n.s.	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	↓	↓	↓	n.s.	↓	↓	↓	n.s.	↓
	DSS X CitaDSS	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓
	StrsDSS x CitaStrsDSS	↓	↓	n.s.	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	↓

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo). Imobilidade S (Ensaio de suspensão pela cauda). Imobilidade N (Ensaio do nado forçado).

Tabela 18. Resumo dos resultados: WpK4 – Ensaio de suspensão pela cauda e nado forçado e moléculas imunes.

Grupos		Imobilidade S	Imobilidade N	Nos2	Il1b	Ifng	Cxcl1	Il6	Tgfb1b	Il10
Fêmeas	Ct X CtStrs	↑	↑	n.s.	↑	n.s.	↓	↑	n.s.	n.s.
	Ct X DSS	n.s.	↑	↓	n.s.	n.s.	↓	↑	n.s.	↓
	CtStrs X WpK4Strs	↓	↓	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	DSS X WpK4DSS	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.
Grupos		Imobilidade S	Imobilidade N	Nos2	Il1b	Ifng	Cxcl1	Il6	Tgfb1b	Il10
Machos	Ct X CtStrs	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	n.s.
	Ct X DSS	↑	↑	n.s.	↑	↓	↑	↓	n.s.	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	n.s.
	DSS X WpK4DSS	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	↓	↓	n.s.	↓	n.s.	↓	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo). Imobilidade S (Ensaio de suspensão pela cauda). Imobilidade N (Ensaio do nado forçado).

Tabela 19. Resumo dos resultados: Cita – Moléculas metabolizadoras e transportadoras de monoaminas.

Grupos		<i>Tph1</i>	<i>Th</i>	<i>Ddc</i>	<i>Ido1</i>	<i>Tdo2</i>	<i>Sert1</i>	<i>Dat1</i>	<i>Slc18a2</i>	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	<i>Bdnf</i>	<i>p11</i>	<i>Miat</i>	<i>Crybb1</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	↑	↓	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↓	↓	↑
	Ct X DSS	↑	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	↑	n.s.	↓	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑	↑	n.s.
	DSS X CitaDSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Grupos		<i>Tph1</i>	<i>Th</i>	<i>Ddc</i>	<i>Ido1</i>	<i>Tdo2</i>	<i>Sert1</i>	<i>Dat1</i>	<i>Slc18a2</i>	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	<i>Bdnf</i>	<i>p11</i>	<i>Miat</i>	<i>Crybb1</i>
Machos	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	↑	n.s.	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑
	Ct X DSS	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	↓	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↓	↑	↑	n.s.	↑
	DSS X CitaDSS	n.s.	↓	↑	n.s.	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 20. Resumo dos resultados: WpK4 – Moléculas metabolizadoras e transportadoras de monoaminas.

Grupos		<i>Tph1</i>	<i>Th</i>	<i>Ddc</i>	<i>Ido1</i>	<i>Tdo2</i>	<i>Sert1</i>	<i>Dat1</i>	<i>Slc18a2</i>	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	<i>Bdnf</i>	<i>p11</i>	<i>Miat</i>	<i>Crybb1</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	↑	↓	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↓	↓	↑
	Ct X DSS	↑	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	n.s.	↑	n.s.	↓	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↓	↑	n.s.
	DSS X WpK4DSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↓	↑	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑
Grupos		<i>Tph1</i>	<i>Th</i>	<i>Ddc</i>	<i>Ido1</i>	<i>Tdo2</i>	<i>Sert1</i>	<i>Dat1</i>	<i>Slc18a2</i>	<i>Grin1</i>	<i>Grin2a</i>	<i>Grin2b</i>	<i>Bdnf</i>	<i>p11</i>	<i>Miat</i>	<i>Crybb1</i>
Machos	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	↑	n.s.	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑
	Ct X DSS	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↑	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	↑	↑	n.s.	↑
	DSS X WpK4DSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓	n.s.	n.s.	↓	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↑	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 21. Resumo dos resultados: Cita – Moléculas estruturais.

Grupos		<i>Mpb</i>	<i>Plp1</i>	<i>Cldn5</i>	<i>Ocln</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ct X DSS	n.s.	n.s.	n.s.	↓
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	DSS X CitaDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↑
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Grupos		<i>Mpb</i>	<i>Plp1</i>	<i>Cldn5</i>	<i>Ocln</i>
Machos	Ct X CtStrs	↑	↑	↑	n.s.
	Ct X DSS	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	CtStrs X CitaStrs	n.s.	n.s.	↓	↑
	DSS X CitaDSS	↓	n.s.	↓	n.s.
	StrsDSS x CitaStrsDSS	n.s.	↓	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

Tabela 22. Resumo dos resultados: WpK4 – Moléculas estruturais.

Grupos		<i>Mpb</i>	<i>Plp1</i>	<i>Cldn5</i>	<i>Ocln</i>
Fêmeas	Ct X CtStrs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ct X DSS	n.s.	n.s.	n.s.	↓
	CtStrs X WpK4Strs	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	DSS X WpK4DSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	n.s.	n.s.	n.s.	↑
Grupos		<i>Mpb</i>	<i>Plp1</i>	<i>Cldn5</i>	<i>Ocln</i>
Machos	Ct X CtStrs	↑	↑	↑	n.s.
	Ct X DSS	n.s.	↓	n.s.	n.s.
	CtStrs X WpK4Strs	↑	↑	↓	↑
	DSS X WpK4DSS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	StrsDSS x WpK4StrsDSS	↑	↓	n.s.	n.s.

Setas para cima (↑), indicam que, comparativamente, a expressão de uma determinada molécula foi estatisticamente aumentada. Setas para baixo (↓), indicam que a expressão foi reduzida. n.s. (não significativo).

V.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., and Gould, T. D. (2011). The Tail Suspension Test. *J. Vis. Exp.*, 3–7. doi:10.3791/3769.
- Di Pardo, A., Amico, E., Scalabri, F., Pepe, G., Castaldo, S., Elifani, F., *et al.* (2017). Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington Disease. *Sci. Rep.* 7, 41316. doi:10.1038/srep41316.
- Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., *et al.* (2013). Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella* Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host Microbe* 14, 26–37. doi:10.1016/j.chom.2013.06.007.
- Donley, D. W., Olson, A. R., Raisbeck, M. F., Fox, J. H., and Gigley, J. P. (2016). Huntingtons Disease Mice Infected with *Toxoplasma gondii* Demonstrate Early Kynurenine Pathway Activation, Altered CD8+ T-Cell Responses, and Premature Mortality. *PLoS One* 11, e0162404. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162404>.
- Frolkis, A. D., Vallerand, I. A., Shaheen, A.-A., Lowerison, M. W., Swain, M. G., Barnabe, C., *et al.* (2018). Depression increases the risk of inflammatory bowel disease, which may be mitigated by the use of antidepressants in the treatment of depression. *Gut*, gutjnl-2018-317182. doi:10.1136/gutjnl-2018-317182.
- Fukuchi, M., Izumi, H., Mori, H., Kiyama, M., Otsuka, S., Maki, S., *et al.* (2017). Visualizing changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression using bioluminescence imaging in living mice. *Sci. Rep.* 7, 4949. doi:10.1038/s41598-017-05297-x.
- Giulietti, a, Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386–401. doi:10.1006/meth.2001.1261.
- Gracie, D. J., Guthrie, E. A., Hamlin, P. J., and Ford, A. C. (2018). Bi-directionality of Brain-Gut Interactions in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 154, 1635–1646.e3. doi:10.1053/j.gastro.2018.01.027.
- Green, A. L., Zhan, L., Eid, A., Zarbl, H., Guo, G. L., and Richardson, J. R. (2017). Valproate increases dopamine transporter expression through histone acetylation and enhanced promoter binding of Nurr1. *Neuropharmacology* 125, 189–196. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.07.020.
- Hall, B. J., Hamlin, P. J., Gracie, D. J., and Ford, A. C. (2018). The Effect of Antidepressants on the Course of Inflammatory Bowel Disease. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2018, 2047242. doi:10.1155/2018/2047242.

- Hata, T., Asano, Y., Yoshihara, K., Kimura-Todani, T., Miyata, N., Zhang, X.-T., *et al.* (2017). Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice. *PLoS One* 12, e0180745. doi:10.1371/journal.pone.0180745.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Hu, G.-Q., Song, P.-X., Li, N., Chen, W., Lei, Q.-Q., Yu, S.-X., *et al.* (2016). AIM2 contributes to the maintenance of intestinal integrity via Akt and protects against *Salmonella* mucosal infection. *Mucosal Immunol.* 9, 1330. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2015.142>.
- Jeong, J. H., Woo, Y. J., Chua Jr., S., and Jo, Y.-H. (2016). Single-Cell Gene Expression Analysis of Cholinergic Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus. *PLoS One* 11, e0162839. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162839>.
- Kochar, B., Barnes, E. L., Long, M. D., Cushing, K. C., Galanko, J., Martin, C. F., *et al.* (2018). Depression Is Associated With More Aggressive Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterol.* 113, 80–85. doi:10.1038/ajg.2017.423.
- Liu, Q., Xu, T.-Y., Zhang, Z.-B., Leung, C.-K., You, D.-Y., Wang, S.-W., *et al.* (2017). Effects of co-administration of ketamine and ethanol on the dopamine system via the cortex-striatum circuitry. *Life Sci.* 179, 1–8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.04.018>.
- Nyuyki, K. D., Cluny, N. L., Swain, M. G., Sharkey, K. A., and Pittman, Q. J. (2018). Altered Brain Excitability and Increased Anxiety in Mice With Experimental Colitis: Consideration of Hyperalgesia and Sex Differences. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 58. doi:10.3389/fnbeh.2018.00058.
- Neuendorf, R., Harding, A., Stello, N., Hanes, D., and Wahbeh, H. (2016). Depression and anxiety in patients with Inflammatory Bowel Disease: A systematic review. *J. Psychosom. Res.* 87, 70–80. doi:10.1016/j.jpsychores.2016.06.001.
- Patial, S., Curtis, A. D., Lai, W. S., Stumpo, D. J., Hill, G. D., Flake, G. P., *et al.* (2016). Enhanced stability of tristetraproline mRNA protects mice against immune-mediated inflammatory pathologies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 1865–1870. doi:10.1073/pnas.1519906113.
- Pereira, G. B., Meng, F., Kockara, N. T., Yang, B., and Wight, P. A. (2013). Targeted deletion of the antisilencer/enhancer (ASE) element from intron 1 of the myelin proteolipid protein gene (Plp1) in mouse reveals that the element is dispensable for Plp1 expression in brain during development and remyelination. *J. Neurochem.* 124, 454–465. doi:10.1111/jnc.12092.
- Pristerà, A., Lin, W., Kaufmann, A.-K., Brimblecombe, K. R., Threlfell, S., Dodson, P. D., *et al.* (2015). Transcription factors FOXA1 and FOXA2 maintain dopaminergic neuronal properties and control feeding behavior in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E4929 LP-E4938. Available at: <http://www.pnas.org/content/112/35/E4929.abstract>.

- Qu, X., Du, Y., Shu, Y., Gao, M., Sun, F., Luo, S., *et al.* (2017). MIAT Is a Pro-fibrotic Long Non-coding RNA Governing Cardiac Fibrosis in Post-infarct Myocardium. *Sci. Rep.* 7, 42657. doi:10.1038/srep42657.
- Reichmann, F., Hassan, A. M., Farzi, A., Jain, P., and Schuligoi, R. (2015). Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala- hippocampus network of mice. *Nat. Publ. Gr.*, 1–13. doi:10.1038/srep09970.
- Spijker, S. (2011). “Dissection of Rodent Brain Regions BT - Neuroproteomics” in, ed. K. W. Li (Totowa, NJ: Humana Press), 13–26. doi:10.1007/978-1-61779-111-6_2.
- Thakurela, S., Garding, A., Jung, R. B., Müller, C., Goebbels, S., White, R., *et al.* (2016). The transcriptome of mouse central nervous system myelin. *Sci. Rep.* 6, 25828. doi:10.1038/srep25828.
- Wei, B., Li, L., He, A., Zhang, Y., Sun, M., and Xu, Z. (2016). Hippocampal NMDAR-Wnt-Catenin signaling disrupted with cognitive deficits in adolescent offspring exposed to prenatal hypoxia. *Brain Res.* 1631, 157–164. doi:https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.11.041.

CAPÍTULO VI

Discussões

VI.1. DISCUSSÕES

VI.1.1 OS PAPÉIS IMUNOBÍÓTICO E PSICOBÍÓTICO DA *Weissella paramesenteroides* WpK4 NOS CONTEXTOS DA RETOCOLITE ULCERATIVA E DO ESTRESSE CRÔNICO

As bactérias lácticas são constituintes da microbiota normal dos mamíferos, sendo, na maioria das vezes, consideradas seguras (Papadimitriou *et al.*, 2015). Muitas linhagens favorecem a homeostase intestinal, promovendo a saúde de seus hospedeiros e, por esse motivo, são categorizadas como probióticos. Vários mecanismos humorais e não-humorais estão associados aos efeitos benéficos, como modular a resposta imune local e sistêmica além de promover as funções da barreira epitelial (Acurcio *et al.*, 2017; Sandes *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). No caso da *W. paramesenteroides* WpK4, por meio de estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, foi demonstrado que essa linhagem possuía uma ampla capacidade antagonista, interferindo no crescimento de bactérias patogênicas, tanto Gram positivas quanto Gram negativas. Além disso, foi observado que o tratamento com esse microrganismo foi capaz de atenuar a perda de peso e a mortalidade de camundongos em um modelo de febre tifoide. Nesse contexto, a *W. paramesenteroides* WpK4 foi capaz de proteger a mucosa intestinal, promovendo a função da barreira epitelial, reduzindo a translocação da *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium ao fígado, além de regular as respostas imunes locais, reduzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Alvim *et al.*, 2016).

A retocolite ulcerativa induzida pelo DSS é caracterizada por deformações do epitélio intestinal causadas por erosões das células epiteliais, incluindo as células caliciformes (Jiminez *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2015). Neste contexto, a arquitetura e a função normal do órgão são comprometidas devido à redução das criptas intestinais, da camada de muco e pelo aumento da permeabilidade da mucosa colônica (Randhawa *et al.*, 2014), permitindo o acesso da microbiota e de outros antígenos luminais à *lamina propria*, os quais estimulam o sistema imune e desencadeiam processos inflamatórios exacerbados pelos linfócitos e células dendríticas locais (Honda e Littman, 2016). Vários trabalhos abordaram e tentaram elucidar os papéis pelos quais certas linhagens de bactérias lácticas probióticas são capazes de exercer, reduzindo os efeitos patológicos da colite ulcerativa. Ahl *et al.* (2016), por exemplo, verificaram que o efeito protetor do probiótico *Lactobacillus reuteri* R2LC no modelo de colite ulcerativa induzida por DSS estava

associado ao estímulo da produção de MUC2 pelas células caliciformes do cólon e à redução da síntese local de IL-1 β . Kanda *et al.* (2016) também observaram a redução do nível de expressão das citocinas pró-inflamatórias *Il6*, *Il17a* e *Ifng* em camundongos desafiados com DSS e tratados com *Enterococcus durans* TN-3. Esta regulação de citocinas pró-inflamatórias geralmente está associada ao desenvolvimento de uma resposta T auxiliar regulatória, caracterizada pela síntese de IL-10 e TGF- β como foi observado por Jo *et al.* (2016) ao administrar o *L. curvatus* WiKim38 a camundongos com a colite ulcerativa.

No ensaio realizado no estudo piloto do capítulo II, a ingestão da *W. paramesenteroides* WpK4 reduziu o índice de desenvolvimento da doença, promoveu a barreira epitelial, além de ter melhorado os aspectos histopatológicos dos camundongos com colite. Ademais, foi observado que o tratamento foi capaz de modular as respostas inflamatórias desencadeada pela ingestão do DSS. Quando a barreira epitelial é comprometida, os macrófagos e células dendríticas locais fagocitam os antígenos provenientes do lúmen e são estimulados a produzirem substâncias antimicrobianas, como o óxido nítrico. Além disso, o contato com os corpos estranhos estimulam seus TLRs (receptores do tipo toll – do inglês *toll-like receptors*), desencadeando cascatas de ativação mediadas por MyD88 (do inglês - *myeloid differentiation primary response 88*) e por TRIF (do inglês - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) que determinam a produção de NF κ B e de IRF (do inglês - *interferon-regulatory factor*) que, por sua vez, estimulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o *Il1*, o *Tnf* e o *Ifn* (Abbas *et al.*, 2015). Aliás, não somente os TLRs são estimulados, os receptores do tipo NODs (NLR – do inglês *NOD-like receptors*) também participam do processo inflamatório, desencadeando vias inflamassomas mediadas por NLRP3 (do inglês - *NLR family, pyrin domain containing 3*), por exemplo, que promovem a síntese de IL-1 β e de IL-18 (Broz e Dixit, 2016). Neste contexto, o tecido epitelial sofre uma inflamação aguda que, quando prolongada, trazem consequências na estrutura e na função normal do órgão (Honda e Littman, 2016; Broz e Dixit, 2016; Powel *et al.*, 2016).

Neste estudo, o papel imunomodulador da WpK4 foi evidenciado, uma vez que os camundongos com colite e tratados com a bactéria apresentaram menor expressão de *Nos2*, *Il1b*, *Tnfa*, além de *Cxcl1*, uma quimiocina cujo papel é atrair neutrófilos para o sítio de inflamação. É interessante observar que o tratamento com a bactéria, aparentemente, não estimulou uma resposta do tipo T regulatória, uma vez que a expressão concomitante de *Tgfb1* e de *Il10* não foi observada. Apesar disso, os camundongos tratados apresentaram uma expressão aumentada de *Il22* cujo o

papel é fundamental na manutenção da barreira epitelial, uma vez que ela é capaz de estimular a síntese de peptídeos antimicrobianos pelas células de Paneth e de estimular a proliferação das células epiteliais indiferenciadas para repararem eventuais danos na mucosa (Gao e Xiang, 2018). Baseado nestas observações, é possível afirmar que a *W. paramesenteroides* WpK4 melhorou a saúde dos camundongos através da promoção da barreira epitelial, impedindo o extravasamento dos antígenos luminais para a *lamina propria*, de tal forma a determinar respostas inflamatórias mais amenas e de estimular a expressão de *Il22*.

Além das suas funções locais, a microbiota intestinal possui papéis sistêmicos importantes, como na modulação do eixo cérebro-intestino, podendo alterar aspectos cognitivos de seus hospedeiros (Dinan *et al.*, 2013; Pusceddu *et al.*, 2018). Em 2004, comparações comportamentais entre camundongos isentos de germes e convencionais em contextos de estresse demonstraram o papel da microbiota na cognição (Sudo *et al.*, 2004). Nestes ensaios, a ligação entre a microbiota e a reatividade do HPA foi estabelecido, demonstrando que camundongos isentos de germes apresentam uma resposta exagerada de corticosterona e adrenocorticotrofina em modelos de contenção forçada (Sudo *et al.*, 2004). A partir disso, comparações comportamentais em vários contextos psicopatológicos foram realizadas, evidenciando o papel da microbiota no comportamento animal. Hsiao *et al.* (2013), por exemplo, usaram camundongos autistas oriundo de um modelo da ativação humoral materna de camundongos fêmeas prenhes. Neste ensaio, a prole apresentou alterações da permeabilidade e da composição da microbiota intestinal, além de comportamentos associados ao espectro autista, os quais foram parcialmente revertidos quando os camundongos ingeriram o probiótico *Bacteroides fragilis* NCTC 9343. Desbonet *et al.* (2010) verificaram que o consumo de *Bifidobacterium infantis* 35624 foi capaz de amenizar o comportamento tipo-depressivo em ratos que sofreram separação materna, esse quadro foi explicado pela redução de respostas inflamatórias, aumento de noradrenalina no cérebro, e redução do fator de liberação de corticotrofina (CRF – do inglês *corticotropin-releasing factor*) na amígdala. Já Liang *et al.* (2015) observaram em um modelo de contenção forçada que a ingestão de *L. helveticus* NS8 foi capaz de reduzir o comportamento tipo-ansioso de ratos através da redução de corticosterona e do aumento dos níveis de 5-HT e de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10, no hipocampo.

No ensaio realizado no estudo piloto do capítulo III, a *W. paramesenteroides* WpK4 reduziu os comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo dos camundongos estressados. Os

mecanismos pelos quais os desordens do humor, como a depressão e a ansiedade, são desencadeadas envolvem respostas imunes, as quais são caracterizadas pela produção de citocinas inflamatórias (Miller e Raison, 2016). Recentemente, os papéis que estas moléculas exercem na dinâmica dos diversos neurotransmissores nos neurocircuitos cerebrais vêm sendo elucidados e serão discutidos aprofundadamente nos próximos itens deste capítulo, levando em consideração, principalmente, os modelos de depressão maior, os quais são os mais bem caracterizados até o momento (Miller e Raison, 2016; Michopoulos *et al.*, 2017). Neste sentido, é possível afirmar que, neste momento, a *W. paramesenteroides* WpK4 melhorou os aspectos cognitivos dos camundongos estressados através da modulação da expressão de citocinas inflamatórias no hipocampo.

VI.1.2 OS TRATAMENTOS COM A *W. paramesenteroides* WpK4 OU COM O CITALOPRAM REGULARAM A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS IMUNES, NEUROENDÓCRINAS E DA BARREIRA EPITELIAL, REDUZINDO A PERMEABILIDADE INTESTINAL NOS CONTEXTOS DO ESTRESSE, DA COLITE E DO ESTRESSE COM COLITE

A barreira epitelial intestinal exerce o seu papel através de cinco mecanismos principais: (1) pela produção de IgA pelas células B locais, (2) pela produção de defensinas e peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais e de Paneth, (3) pela produção de muco pelas células caliciformes, (4) pela tolerância oral e (5) pela adesão entre as células epiteliais (Buckley e Turner, 2017). Estes mecanismos são intrinsecamente relacionados, de tal forma que a modulação de um é capaz de regular os outros (Natividad e Verdu, 2013). Nos estudos realizados no Capítulo IV, foram abordados os papéis da *W. paramesenteroides* WpK4 e do Citalopram nos contextos do estresse, da colite e do estresse combinado com a colite, onde foi levado em consideração a integridade da barreira epitelial e a expressão de algumas moléculas associadas à adesão paracelular, às respostas imunes e aos mecanismos enteroendócrinos. Estruturalmente, a adesão entre as células epiteliais é realizada pelas zonas de oclusão, pelas junções aderentes e pelos desmossomos, os quais são formados por um conjunto proteico complexo associado ao citoesqueleto (Sharma *et al.*, 2010; Natividad e Verdu, 2013; Buckley e Turner, 2017). As zonas de oclusão, foco deste trabalho, são constituídas, fundamentalmente, pelas Claudinas (Cldn), pelas

Ocludinas (Ocln) e pelas Zona-Ocludinas (Zo ou TJP – do inglês *tight junction proteins*), as quais formam uma estrutura molecular complexa capaz de promover a adesão lateral entre as células e de modular o transporte paracelular, sendo estas funções reguladas por vários fatores nutricionais, fisiológicos e microbiológicos (de Santis *et al.*, 2015). Ding *et al.*, (2003), por exemplo, observaram que a β -caseína era capaz de estimular a síntese de Ocludina em um modelo de cultivo celular de Caco-2. Já Li *et al.*, (2004) observaram que a vitamina D era capaz de reduzir a permeabilidade através do estímulo da produção de Claudina 1 (Cldn-1) e de Zona-occludina 1 (ZO-1 ou TJP-1 – do inglês *tight-junction protein 1*). No contexto da disbiose intestinal, como no IBD, a composição modificada da microbiota intestinal pode promover a permeabilidade (Michielan e D'Incà, 2015). Estudos recentes, por exemplo, demonstraram que camundongos com retocolite ulcerativa apresentavam redução significativa da expressão e redistribuição das moléculas constituintes das zonas de oclusão, incluindo as Ocludinas e as Claudinas, permitindo o extravasamento dos antígenos luminais para a *lamina propria* (Krug *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2015). Além disso, o papel do estresse psicológico sobre a integridade da barreira intestinal também vem sendo elucidado. Zong *et al.*, (2019) estudaram o efeito do estresse psicológico crônico e observaram que ratos estressados apresentavam permeabilidade intestinal aumentada, a qual foi associada à redução da expressão de Ocludina e de Claudina 1. Quando estes animais eram tratados com Lubiprostone, um medicamento para o manejo da constipação intestinal, a expressão destas moléculas aumentava e a permeabilidade intestinal destes animais retornava para um estado próximo da normalidade (Zong *et al.*, (2019).

O sistema imune também parece ter um papel importante na regulação da permeabilidade intestinal. Trabalhos com camundongos e cultivos celulares vêm elucidando os papéis das citocinas na modulação estrutural das zonas de oclusão, sendo descritas as funções das respostas inatas sobre a síntese e a localização das suas moléculas constituintes. Por exemplo, foi observado que o TNF- α possui a capacidade de reduzir a expressão de *Tjp1*, além de estimular a síntese de MYLK cuja uma das funções é contrair o citoesqueleto nas zonas de oclusão de forma a promover a internalização das Claudinas e das Ocludinas (Buckley e Turner, 2018). Também foi descrito o papel do IFN- γ , onde Bruewer *et al.*, (2003) observaram que esta molécula era capaz de promover a internalização celular e redistribuição da Ocludina e da Claudina 1. Além disso, Ma *et al.*, (2018), em suas revisões bibliográficas destacaram o papel regulatório do IL-1 β na promoção da permeabilidade intestinal via NF- κ B e MYLK.

Neste estudo, os desafios impostos aos camundongos machos e fêmeas impactaram na barreira epitelial e o tratamento com o Citalopram melhorou os aspectos fisiológicos da mucosa, reduzindo a permeabilidade intestinal. Em todos os desafios, o estresse, a colite e o estresse com colite, estimularam a expressão de *Nos2*, *Tnfa*, *Ifng* ou de *Ilb*, as quais são moléculas típicas das respostas inatas cujos papéis estão associados à atividade fagocítica dos macrófagos e à apoptose celular. Dependendo da intensidade da síntese e da duração da resposta, estas moléculas podem impactar na estrutura da mucosa intestinal de forma a promover a permeabilidade intestinal (Ma *et al.*, 2018). Entretanto, é interessante observar que neste estudo não foram observadas lesões e alterações estruturais das criptas nos cólons dos camundongos desafiados, podendo indicar um outro papel destas moléculas inflamatórias nos processos de permeabilização epitelial. Neste sentido, como citado anteriormente, tem sido observado que o TNF- α e o IL-1 β podem estar associados à regulação das estruturas das zonas de oclusão que, pelo estímulo da expressão de *Mylk*, promovem modificações no citoesqueleto local, determinando a internalização das suas moléculas constituintes de tal forma a favorecer a permeabilidade paracelular sem, entretanto, desencadear a apoptose das células epiteliais (Bruewer *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2017; Buckley e Turner, 2018). Assim, é relevante observar, principalmente nos camundongos machos, que os desafios estimularam a expressão de *Mylk* e que este aumento estava associado a maiores níveis de *Tnfa* e *Ilb*. Em contrapartida, o tratamento com Citalopram reduziu, em certas situações, a expressão destas citocinas inflamatórias, determinando menores níveis de *Mylk*, indicando que estas moléculas possam estar agindo em conjunto, modificando a estrutura das zonas de oclusão. Além disso, tem sido descrito alguns fatores transcricionais associados à regulação da expressão de *Mylk*, sendo evidenciado os seus papéis nas respostas ao IL- β e ao TNF- α . Um destes fatores é o NF κ - β que em resposta a estas citocinas é capaz de estimular a expressão de *Mylk* (Al-Sadi *et al.*, 2013). Neste trabalho, os desafios impostos aos camundongos fêmeas foram capazes de estimular a expressão deste conjunto de moléculas, indicando que, nos contextos da colite e do estresse, a modulação de *Mylk* via IL-1 β ou TNF- α deva passar pela regulação transcricional do NF κ - β . Nos camundongos machos, entretanto, esta situação não foi observada. Aliás, em nenhum dos grupos estudados, sejam eles desafiados ou tratados, foi observada alteração na expressão de NF κ - β . Apesar disso, mais recentemente, outros fatores transcricionais associados à regulação de *Mylk* foram descritos, como o ATF-2 (ativador do fator de transcrição 2 – do inglês *activation of the transcription factor 2*) e o ELK-1 (*ETS Transcription Factor*), os quais não foram avaliados

neste estudo (Al-Sadi *et al.*, 2013; Buckley e Turner, 2018). Neste sentido, a existência de um papel regulatório do IL-1 β e do TNF- α na modulação de *Mylk* nos camundongos machos não pode ser descartado. Uma outra observação deste estudo foi que o Citalopram parece ter a capacidade de modular a expressão de *Cldn1*, *Ocln*, *Tjp1* e *Tjp2* em diferentes contextos de desafio, o que também poderia contribuir para a redução da permeabilidade. Entretanto, esta regulação foi percebida apenas nos camundongos fêmeas, indicando que o mecanismo de ação deste fármaco sobre estas moléculas possa ser dependente do sexo.

Nos camundongos tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 a suposta relação entre IL-1 β ou TNF- α com MYLK também foi observada, principalmente nos camundongos machos. Além disso, foi observado que a ingestão da bactéria foi capaz de modular, de forma mais abrangente e em ambos os sexos, as moléculas constituintes das zonas de oclusão. De um modo geral, o tratamento com a WpK4 tendeu a aumentar a expressão de *Cldn1*, *Ocln*, *Tjp1* e de *Tjp2* nos diferentes grupos de camundongos desafiados, sendo esta modulação variável, dependendo do tipo de desafio e do sexo dos animais. Estudos em camundongos convencionais e isentos de germes vêm demonstrando o papel de linhagens probióticas na manutenção e na promoção da barreira epitelial. Ukena *et al.*, (2007), por exemplo, observaram que a colonização intestinal pela *Escherichia coli* Nisle 1917 em camundongos isentos de germes era capaz regular positivamente a expressão de *Tjp1*. Recentemente, Briskey *et al.*, (2016) observaram que a permeabilidade intestinal aumentada em camundongos convencionais submetidos a uma dieta rica em lipídeos era revertida quando eram tratados com um coquetel probiótico constituído por linhagens pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Esta redução da permeabilidade foi acompanhada pelo aumento da expressão de *Tjp1* e *Tjp2* (Briskey *et al.*, (2016). Já Zhang *et al.*, (2018) também observaram algo semelhante quando administraram o Bifco, uma mistura de probióticos contendo linhagens bacterianas pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*, a camundongos com colite, sendo o aumento da expressão da Ocludina associada à manutenção da barreira epitelial. Além destas observações, os mecanismos moleculares pelos quais os probióticos são capazes de promover a barreira epitelial também estão sendo elucidados. Hsieh *et al.*, (2015), por exemplo, demonstraram que o acetato produzido por bifidobactérias probióticas era capaz de reduzir a permeabilidade intestinal em um modelo de cultivo celular. É interessante observar que as bactérias pertencentes à espécie *W. paramesenteroides* possuem um metabolismo energético heterofermentativo, onde a glicose é

fermentada pelas vias hexose-monofosfato e fosfoquetolase, produzindo ácido láctico, dióxido de carbono, etanol e acetato (Fessard e Remize, 2017). Neste contexto, é possível levantar a hipótese de que a provável produção de acetato pela WpK4 no intestino também possa estar envolvida nos processos que envolvam a permeabilidade intestinal, entretanto este mecanismo precisa ser melhor elucidado.

O tratamento com a bactéria também regulou a expressão de moléculas sinalizadoras dos complexos inflamassomais, como o *Nlrp3*, o *Nlrp6* e o *Aim2*. Como discutido anteriormente no item VI.I.I as moléculas destes complexos estão associadas à ativação de respostas inflamatórias quando os receptores NLRs ou ALRs (do inglês - *AIM2-like receptor*) são ativados por fatores bacterianos (Ratsimandresy *et al.*, 2016; Seregin *et al.*, 2017). Através da ativação da Caspase-1, por exemplo, o NLRP3 e outras moléculas, induzem a conversão do pró-IL-1 β para sua forma funcional para atuar nos processos de resposta inata. Apesar disto, vários estudos associaram a expressão de *Nlrp3*, o *Nlrp6* e o *Aim2* à regulação de processos inflamatórios (Elinav *et al.*, 2012; Bergstrom *et al.*, 2012; Aguilera *et al.*, 2014; Ratsimandresy *et al.*, 2016; Seregin *et al.*, 2017). Zaki *et al.*, (2010) e Hirota *et al.*, (2011), por exemplo, observaram que camundongos NLRP3^{-/-} e CASP1^{-/-} são super susceptíveis à colite induzida pelo DSS. Neste contexto, a perda do NLRP3 e, consequentemente a de IL-1 β e IL-18, permitiu o extravasamento da microbiota intestinal para a *lamina propria*, promovendo a infiltração de leucócitos e a elevada produção de quimiocinas no cólon dos animais, determinando maior dano histológico (Zaki *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2011). Também tem sido observado que camundongos NLRP3^{-/-} desenvolvem disbiose e produzem menores quantidades de β -defensinas, IL-10 e TGF- β (Hirota *et al.*, 2011). O NLRP6 também parece influenciar a homeostase fisiológica e microbiológica do cólon. Estudos com camundongos NLRP6^{-/-}, por exemplo, demonstraram que esta molécula é essencial para reduzir a susceptibilidade ao DSS (Chen *et al.*, 2011; Elinav *et al.*, 2012; Ratsimandresy *et al.*, 2016). Já Seregin *et al.*, (2017) ao estudarem o efeito desta molécula em um modelo de colite espontânea em camundongos IL-10^{-/-}, observaram que o NLRP6 tinha um papel importante na regulação da inflamação intestinal e que a sua deleção desencadeava a disbiose intestinal, resultando no aumento populacional de *Akkermansia muciniphila* a qual agia como patobionte, promovendo a colite. Em relação ao AIM2, tem sido demonstrado que a deleção deste gene em camundongos saudáveis resulta na redução da secreção de IL-18, menor atividade de IL-22 e, consequentemente menor produção de peptídeos antimicrobianos, como o REG3 β e o REG3 γ , criando um ambiente

propício para o desenvolvimento da disbiose intestinal (Ratsimandresy *et al.*, 2016). Neste sentido, no contexto da colite induzida pelo DSS, Ratsimandresy *et al.*, (2016) observaram que a ativação do AIM2 desencadeava um mecanismo protetor, prevenindo a disbiose e a colite através do reparo dos danos ao epitélio intestinal o qual era mediado pela síntese de IL-22 e REG3. Portanto, baseado nestas observações e levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar que a homeostase intestinal promovida pela *W. paramesenteroides* WpK4 possa estar associada à modulação de moléculas inflamassomais.

Um outro resultado observado foi efeito dos desafios e dos tratamentos sobre a expressão de *Ido1* (indoleamina 2,3-dioxigenase 1). Esta molécula, expressa ubiquamente em diferentes tecidos e órgãos, como no cólon, no intestino delgado, no cérebro, no baço e nos pulmões, além de ser classicamente reconhecida pela sua atividade oxidativa sobre o triptofano, vem ganhando interesse dos pesquisadores por conta das suas funções imunomodulatórias (Matteoli *et al.*, 2010; Shon *et al.*, 2015). Recentemente, Shon *et al.*, (2015) observaram que camundongos IDO-1^{-/-} eram menos susceptíveis ao desenvolvimento da inflamação intestinal em um modelo de colite induzido pelo DSS. Além disso, foi observado que a inibição farmacológica desta molécula também atenuava a severidade da doença (Shon *et al.*, 2015). Nestes contextos, foi descrito que a inatividade do IDO-1 estava associada à redução do número de células inflamatórias no cólon e no sangue periférico, além de menor expressão de várias citocinas e quimiocinas inflamatórias, indicando que esta molécula possa ter um papel importante no desenvolvimento da inflamação intestinal. Neste estudo, os desafios impostos aos camundongos, principalmente nos machos, foram capazes de aumentar a expressão de *Ido1*. Em contrapartida, os tratamentos com Citalopram ou com a *W. paramesenteroides* WpK4 reduziram a expressão desta molécula, indicando que estes agentes possam regular a inflamação intestinal pela modulação da síntese de IDO-1.

Portanto, como conclusão geral deste tópico, é possível afirmar que o estresse e a colite aumentaram a permeabilidade intestinal dos camundongos através indução da expressão de *Mylk* que, provavelmente, modificou a estrutura das zonas de oclusão, promovendo a permeabilidade paracelular. Também é possível sugerir que a modulação de *Mylk* via IL-1 β ou TNF- α deve passar pela regulação transcricional do NF κ B nos camundongos fêmeas e por outros fatores transcricionais nos camundongos machos. Neste contexto, também é possível sugerir que os tratamentos com o Citalopram ou com a bactéria devem ter melhorado os aspectos fisiológicos, imunológicos e patológicos dos camundongos desafiados através da modulação negativa de *Mylk*

que, provavelmente, foi determinada pela redução da expressão de *Il1b* ou de *Tnfa*. Além disso, parece que o Citalopram é capaz de exercer o seu papel nas zonas de oclusão dos camundongos fêmeas, promovendo a barreira epitelial pelo estímulo da expressão *Cldn1*, *Ocln*, *Tjp1* e/ou *Tjp2* em diferentes contextos de desafio. Nos grupos tratados com a *W. paramesenteroides* WpK4 e, independentemente do sexo, é possível sugerir que esta bactéria deve ter promovido a homeostase intestinal nos camundongos desafiados pela redução da expressão de moléculas inflamatórias, pela modulação negativa da via do MYLK, pelo estímulo à síntese das moléculas constituintes das zonas de oclusão e pela modulação dos complexos inflamassomais. Além de todos os prováveis mecanismos mencionados, também é possível sugerir que os tratamentos com Citalopram ou com a bactéria devem ter auxiliado na melhora da colite pela regulação negativa de *Ido1*. Deste modo, e levando em consideração o conjunto de evidências discutidos neste item, pode-se afirmar que o Citalopram e a WpK4 exercem papéis benéficos no cólon dos camundongos com colite, estressados e estressados com colite.

VI.1.3 OS TRATAMENTOS COM A *Weissella paramesenteroides* WpK4 OU COM O CITALOPRAM IMUNOMODULARAM E ALTERARAM A EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES E DE METABOLIZADORES DAS MONOAMINAS NO HIPOCAMPO, IMPACTANDO POSITIVAMENTE NA COGNIÇÃO NOS CONTEXTOS DO ESTRESSE, DA COLITE E DO ESTRESSE COM COLITE

O sistema límbico compreende regiões cerebrais envolvidas nas respostas comportamentais associadas a situações de sobrevivência, como a obtenção de alimentos, a reprodução, o cuidado parental, o medo, etc. (Reichmann *et al.*, 2015; Miller e Raison, 2016; Michopoulos *et al.*, 2017). Este sistema também está associado aos processos de aprendizado e memória, agregando um conteúdo afetivo às informações sensitivas (ou conscientes) e sensoriais (ou inconscientes), determinando respostas emocionais conscientes ou vegetativas (Miller e Raison, 2016; Michopoulos *et al.*, 2017; Nyuyki *et al.*, 2018). De uma forma simplificada, o sistema límbico é estruturalmente formado pelo tálamo e pelo hipotálamo, os quais estão associados à regulação da sede, da fome e do humor, além dos gânglios basais, os quais estão associados aos processos de recompensa, à formação de hábitos e ao aprendizado. Ele também é

formado pelas amígdalas cerebelosas que estão associadas às respostas ao medo e ao discernimento de situações perigosas e pelo hipocampo o qual é associado à memória, principalmente aquelas de longo prazo (Tovote *et al.*, 2015; Miller e Raison, 2016; Craske *et al.*, 2017). Mais especificamente, estudos em modelos animais demonstraram que a região dorsal do hipocampo está associada à cognição e à memória espacial, enquanto que a região ventral é relacionada aos comportamentos emocionais, às interações sociais e à resiliência ao estresse (Anacker e Hen, 2017). Além disso, tem sido observado que o hipocampo, foco deste estudo, é uma região importante para a neurogênese na fase adulta, promovendo a diferenciação de novos neurônios funcionais e integrando-os aos neurocircuitos já existentes (Anacker e Hen, 2017).

Como mencionado anteriormente, a depressão maior é caracterizada por um desbalanço no eixo HPA que determina respostas inflamatórias no cérebro capazes de afetar a neurogênese e a dinâmica dos neurotransmissores nas fendas sinápticas (Miller e Raison, 2016). Estudos em modelos animais de estresse, por exemplo, demonstraram que a depressão induzida era capaz de promover alterações imunomodulatórias no sistema límbico, impactando significativamente na atividade neurogênica do hipocampo (Miller e Raison, 2016). Aliás, tem sido observado que esta estrutura é amplamente afetada neste cenário, apresentando menor volume, além de atividades sinápticas e capacidades de neurotransmissão reduzidas (Miller e Raison, 2016; Michopoulos *et al.*, 2017). Portanto, vários trabalhos tiveram como objetivo elucidar as vias nas quais as citocinas inflamatórias são capazes modular, determinando o fenótipo equivalente ao depressivo. Goshen *et al.*, (2008), por exemplo, demonstraram que o mecanismo pelo qual o BDNF, uma molécula relacionada à neuroplasticidade, era reduzido no hipocampo de camundongos estressados estava associado à expressão aumentada de *Il1b* e de *Tnfa*. De uma forma geral, estas citocinas são capazes de modular as sinalizações executadas pelas micróglia e pelos astrócitos sobre os neurônios, modificando o metabolismo das monoaminas, incluindo o da serotonina, o da dopamina e o da norepinefrina, pela redução da disponibilidade de Tetraidrobiopterina (BH4), um co-fator importante para atividade enzimática da Tirosina Hidrolase (TH), cujo papel está associado à produção destes neurotransmissores (Shajib e Khan, 2015; Tavote *et al.*, 2015; Mechawar e Savitz, 2016; Miller e Raison, 2016; Anacker e Hen, 2017). Além disso, tem sido observado que o IL-1 β , o TNF- α e o IFN- γ são capazes de promover a expressão e a síntese de receptores recaptadores das monoaminas, reduzindo a disponibilidade de vários neurotransmissores na fenda sináptica, impactando, ainda mais, nos processos cognitivos (Shajib e Khan, 2015).

Outro processo no qual as citocinas inflamatórias são capazes de interferir é o metabolismo do glutamato. Neste contexto, o IL-1 β , o TNF- α , o IFN- γ e o IL-6 exercem seus papéis estimulando a síntese de IDO1 pelas micróglias, promovendo a conversão dos precursores das monoaminas, como o triptofano e a tirosina, em quinurenina, reduzindo a disponibilidade destes aminoácidos para a produção de 5-HT (ou serotonina), dopamina e noradrenalina pelo TH ou pelo TPH1 (Triptofano hidroxilase – Ng, *et al.*, 2015; Shajib e Khan, 2015; Miller e Raison, 2016). Além disso, estas citocinas estimulam a produção do ácido quinolínico a partir da quinurenina e a de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio que, em conjunto, modulam as respostas dos astrócitos ao glutamato de modo a interferir nos processos de reciclagem deste neurotransmissor, promovendo a sua liberação e inibindo a sua recaptação na fenda sináptica. Neste cenário, o acúmulo de ácido quinolínico e de glutamato causam uma excitotoxicidade sináptica e são capazes de agonizar os receptores extrasinápticos N-metil-D-aspartato (NMDAR - do inglês *N-methyl-D-aspartate receptor*) cuja ativação é associada à redução significativa do BDNF e, conseqüentemente, da neurogênese e da neuroplasticidade que, em última análise, comprometem os processos de aprendizado e de memória emocionais, determinando deficiências cognitivas (Shajib e Khan, 2015; Miller e Raison, 2016).

No trabalho realizado no Capítulo V, foram abordados os papéis da *W. paramesenteroides* WpK4 e do Citalopram nos contextos do estresse, da colite e do estresse combinado com a colite, onde foi levado em consideração a manifestação de comportamentos tipo-depressivos, além da expressão de moléculas imunológicas, de transportadores e de metabolizadores das monoaminas no hipocampo dos animais. Neste estudo, os desafios impostos aos camundongos machos e fêmeas prejudicaram os aspectos cognitivos, promovendo comportamentos equivalentes ao depressivo. Em contrapartida, os tratamentos com a bactéria ou com o Citalopram foram capazes de amenizar este quadro. Como mencionado anteriormente, o BDNF é uma molécula central na modulação da neurogênese e na redução do estresse psicológico, entretanto, a sua expressão não foi regulada nos camundongos fêmeas, inclusive naqueles estressados e tratados com o Citalopram, onde vários trabalhos já documentaram o papel deste fármaco na regulação positiva do BDNF (Svenningsson *et al.*, 2013; Ng, *et al.*, 2015; Michopoulos *et al.*, 2017). Neste sentido, as discussões a respeito dos resultados obtidos no Capítulo V serão limitadas às observações realizadas nos grupos de camundongos machos.

Como referido no último parágrafo, os desafios impostos aos camundongos prejudicaram a cognição, promovendo comportamentos tipo-depressivos. Nos animais estressados foram observados níveis aumentados de *Nos2*, *Il1b*, *Ifng*, *Cxcl* e de *Il6*. Além disso, estas mesmas citocinas tiveram seus níveis de expressão aumentadas nos camundongos com colite, indicando que a inflamação intestinal provocada pelo DSS adquiriu um caráter sistêmico, promovendo a neuroinflamação. Nestes contextos, o tratamento com a WpK4 ou com o Citalopram tenderam a reduzir a síntese destas citocinas, principalmente no contexto do estresse. Recentemente, o papel da microbiota intestinal e dos psicobióticos nos processos cognitivos vêm sendo elucidados, incluindo as funções das moléculas e dos fatores moduladores produzidos por estes microrganismos, os quais não foram abordados neste trabalho. Apesar disto, o papel imunomodulatório da *W. paramesenteroides* WpK4, não apenas local, mas também sistêmico, foi demonstrado no trabalho de Alvim *et al.*, e nos resultados obtidos nos Capítulos II, III, IV e V, onde a redução da expressão de citocinas inflamatórias suportaram o efeito benéfico da bactéria em vários contextos, incluindo no hipocampo dos camundongos desafiados. Já as vias metabólicas que o Citalopram é capaz de modular, promovendo a melhorar da sintomatologia da depressão são mais esclarecidas. Este fármaco, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, promove maior permanência do 5-HT nas fendas sinápticas (Svenningsson *et al.*, 2013), além de possuir a capacidade de imunomodular respostas inflamatórias, regulando a atividade e a viabilidade de linfócitos (Gobina *et al.*, 2014). Shenoy *et al.*, (2013), por exemplo, demonstraram em modelos animais que o Citalopram possuía a capacidade de reduzir a síntese de citocinas inflamatórias nos leucócitos circulantes e nos timócitos. Na fenda sináptica, o papel imunomodulatório deste fármaco vem sendo relacionado à inibição da capacidade recaptadora do SERT, determinando maiores níveis do 5-HT, os quais passam a ativar os receptores de 5-HT dos linfócitos, desencadeando processos que determinavam a redução da capacidade proliferativa destas células (Gobina *et al.*, 2014). Mais que inibir a proliferação dos linfócitos, o Citalopram também vem sendo associado à indução da apoptose destas células, como foi observado por Xia *et al.* (1996 e 1997), ao realizarem estudos em modelos de cultivos celulares. Nestes trabalhos, os autores associaram a promoção da apoptose à redução da expressão de genes anti-apoptóticos como o *Cmyc* e *Bcl2*.

Uma das consequências do estresse no hipocampo dos camundongos foi o aumento da expressão de IDO1 e/ou de TDO2, cujas atividades monoamina oxidases são capazes de

metabolizar os aminoácidos triptofano e tirosina em quinurenina, reduzindo a disponibilidade dos precursores de certos neurotransmissores (Miller e Raison, 2016). Neste trabalho, os tratamentos com a WpK4 ou com o Citalopram realizados nos camundongos estressados foram capazes de reduzir a expressão de *Ido1*, indicando os que um dos efeitos benéficos destes agentes possa estar associado à modulação da via do glutamato. Além disso, não foram observadas diferenças significativas e consistentes em relação à expressão de *Tph1*, *Th* e *Ddc*, entre os diferentes grupos de camundongos, podendo indicar que as vias metabólicas associadas à síntese de neurotransmissores não foram influenciadas pelos desafios e pelos tratamentos realizados, reforçando a ideia de que o estresse e a sua modulação pela WpK4 e pelo Citalopram tenham passado pela regulação da expressão de *Ido1*. Neste contexto, é possível inferir que o estresse, provavelmente, promoveu a síntese de quinurenina e que esta molécula poderia estar participando da ativação dos receptores NMDAR e, em última análise, reduzindo síntese de BDNF. De fato, foi observado o aumento da expressão de *Grin1*, de *Grin2a* e de *Grin2b*, as subunidades constituintes do NMDAR, nos camundongos estressados e que este aumento estava associado à redução da expressão de *Bdnf*. É interessante observar que o tratamento com a bactéria foi capaz de reduzir a expressão de *Grin2b*, enquanto que o tratamento com o Citalopram reduziu a expressão de *Grin1* e de *Grin2b*, indicando a participação destes agentes na modulação dos receptores NMDAR. Em contrapartida, os desafios e tratamentos nos contextos da colite e do estresse com a colite não foram capazes de modular as moléculas acima mencionadas, exceto o BDNF cuja expressão foi aumentada no grupo de camundongos tratados com a WpK4, podendo indicar a existência de uma via regulatória não explorada neste trabalho.

Outra conclusão que pode ser retirada a partir dos resultados obtidos, é que o estresse reduziu a expressão de *p11* e que os tratamentos realizados nos camundongos tenderam reverter esta situação. Recentemente, tem sido observado que esta molécula, de forma semelhante a alguns antidepressivos, é capaz de promover a expressão, a síntese e o transporte dos receptores de 5-HT para superfície dos botões pós-sinápticos, potencializando a neurotransmissão da serotonina (Svenningsson *et al.*, 2013). Além disso, já foi observado que a expressão de *p11* no hipocampo e na amígdala em vítimas de suicídio é menor, sugerindo a importância desta molécula na patofisiologia da depressão (Anisman *et al.*, 2008). Apesar destas observações, as vias pelas quais esta molécula é capaz de modular ainda precisa ser elucidada. O mais evidente até agora é que o *p11* deve exercer seu papel benéfico regulando positivamente a expressão de *Bdnf* (Svenningsson

et al., 2013). Neste contexto, é interessante observar que nos estudos realizados neste trabalho, foi observado que, na maioria das vezes e principalmente nos grupos de camundongos tratados com a WpK4, a expressão de *p11* estava acoplada à expressão de *Bdnf*, podendo indicar que estas moléculas possam estar agindo conjuntamente, promovendo a neuroplasticidade, mas isso é algo que ainda precisa ser avaliado do ponto de vista celular.

Em relação às outras moléculas estudadas, como aquelas associadas à permeabilidade da barreira hematoencefálica (*Cldn5* e *Ocln*) e à neurotransmissão (*Mpb* e *Plp1*), não foi possível estabelecer, de forma clara, os papéis modulatórios que os desafios e os tratamentos foram capazes desencadear nos camundongos estudados. Aliás, neste contexto, foram observados resultados controversos como o aumento da expressão de *Miat* e de *Crybb1* ao mesmo tempo, sendo que já é bem caracterizado o efeito inibitório da primeira molécula sobre a segunda.

Portanto, como conclusão geral deste tópico, é possível afirmar que o estresse, a colite e o estresse combinado com a colite promoveram comportamentos tipo-depressivos nos camundongos desafiados. Aparentemente, este fenótipo foi desencadeado pelo aumento de citocinas inflamatórias que podem ter promovido a via do glutamato, determinada pela expressão aumentada de *Ido1* e de *Tdo2*, em detrimento ao metabolismo das monoaminas nos hipocampus dos animais estressados. Neste contexto, a provável síntese de quinurenina e do ácido quinolínico deve ter promovido a liberação e a inibição da recaptação do glutamato pelos astrócitos nas fendas sinápticas, causando o seu acúmulo e consequente excitotoxicidade. Além disso, parece que esta situação deve ter estimulado a atividade dos receptores NMDAR, uma vez que foi observado aumento da expressão das suas subunidades constituintes (*Grin1*, *Grin2a* e *Grin2b*) o que pode ter determinado, em última análise, a redução da síntese de BDNF, impactando significativamente a cognição dos animais. Apesar disso, a *W. paramesenteroides* WpK4 e o Citalopram exerceram seus papéis benéficos, imunomodulando as respostas imunes no hipocampo, reduzido a expressão de citocinas inflamatórias e, em certas situações, a de *Ido1*. Como consequências disso, a via metabólica do glutamato pode ter sido prejudicada, permitindo a expressão de *Bdnf* e de *p11* de tal forma a promover a cognição dos animais.

VI.2. CONCLUSÕES

A partir das discussões dos resultados obtido podemos destacar, de forma resumida, as seguintes conclusões:

- No ensaio piloto do Capítulo II a *W. paramesenteroides* WpK4 melhorou a saúde dos camundongos com colite, promovendo a barreira epitelial através da redução da atividade apoptóticas de algumas citocinas inflamatórias e do aumento da síntese de IL-22;

- No Capítulo III a bactéria promoveu a cognição, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias no hipocampo dos camundongos estressados;

- No Capítulo IV os papéis benéficos da WpK4 e do Citalopram nos contextos da colite, do estresse e do estresse com a colite no cólon dos camundongos podem estar associados à imunomodulação de MYLK, reduzindo a sua atividade de forma a promover a adesão entre as células epiteliais e pela regulação negativa de *Ido1*. Além destes mecanismos, o tratamento com a bactéria modulou as moléculas constituintes das zonas de oclusão e dos complexos inflamassomais o que pode ter melhorado ainda mais a barreira epitelial;

- No Capítulo V os papéis benéficos da WpK4 e do Citalopram nos processos cognitivos dos camundongos desafiados podem estar associados à imunomodulação das respostas imunes no hipocampo, reduzido a expressão de citocinas inflamatórias e, em certas situações, a de *Ido1*. Como consequências disso, a expressão de *Bdnf* e de *p11* foi estimulada de tal forma a promover a cognição dos animais com consequências comportamentais.

VI.3. PERSPECTIVAS

Vários trabalhos reportaram o efeito da microbiota intestinal, principalmente no contexto da disbiose, nos processos de inflamação intestinal e suas consequências no desenvolvimento de doenças crônicas, como é o caso do IBD (Manichanh *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2017). Mais recentemente, novos estudos levam em consideração a composição da microbiota e seus metabólitos nos processos cognitivos, evidenciando seu papel na manutenção de desordens psiquiátricas (Baganz e Blakely, 2013; Foster e Neufeld, 2013; Rea *et al.*, 2016; Fung *et al.*, 2017). Neste trabalho foi observado que os tratamentos com a *W. paramesenteroides* WpK4 ou com o Citalopram impactaram positivamente vários aspectos fisiológicos, imunológicos e moleculares nos contextos da colite, do estresse e do estresse combinado com a colite. Se estes efeitos benéficos foram determinados pela ação direta destes agentes ou se foram determinados pela modulação da microbiota intestinal, isto é algo que ainda precisa ser esclarecido. Portanto, ainda se tem como objetivo avaliar a composição da microbiota intestinal entre os diferentes grupos de camundongos, de forma a buscar a esclarecer se os efeitos benéficos exercidos pela *W. paramesenteroides* WpK4 ou pelo Citalopram foram devidos a ações diretas ou indiretas no hospedeiro.

VI.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology*.
- Acurcio, L. B., Bastos, R. W., Sandes, S. H. de C., Guimarães, A. C. de C., Alves, C. G., Reis, D. C. dos, et al. (2017). Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in BALB/c mice. *J. Funct. Foods* 33, 436–445. doi:10.1016/j.jff.2017.04.010.
- Aguilera, M., Darby, T., and Melgar, S. (2014). The complex role of inflammasomes in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases – Lessons learned from experimental models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 715–730. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.04.003.
- Ahl, D., Liu, H., Schreiber, O., Roos, S., Phillipson, M., and Holm, L. (2016). *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiol.* 217, 300–310. doi:10.1111/apha.12695.
- Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., Dokladny, K., Alhmoud, T., Ereifej, L., et al. (2013). Mechanism of IL-1 β Modulation of Intestinal Epithelial Barrier Involves p38 Kinase and Activating Transcription Factor-2 Activation. *J. Immunol.* 190, 6596 LP-6606. doi:10.4049/jimmunol.1201876.
- Alvim LB, Sandes SHC, Silva BC, Steinberg RS, Campos MHA, Acurcio LB, et al. (2016). *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. *Benef. Microbes* 7, 61–73. doi:10.3920/BM2015.0093.
- Anacker, C., and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 335–346. doi:10.1038/nrn.2017.45.
- Anisman, H., Du, L., Palkovits, M., Faludi, G., Kovacs, G. G., Szontagh-Kishazi, P., et al. (2008). Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects. *J. Psychiatry Neurosci.* 33, 131–141. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18330459>.
- Baganz, N. L., and Blakely, R. D. (2012). A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 48–63. doi:10.1021/cn300186b.
- Bergstrom, K. S., Sham, H. P., Zarepour, M., and Vallance, B. A. (2012). Innate host responses to enteric bacterial pathogens: a balancing act between resistance and tolerance. *Cell. Microbiol.* 14, 475–484. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01750.x.
- Briskey, D., Heritage, M., Jaskowski, L.-A., Peake, J., Gobe, G., Subramaniam, V. N., et al. (2016). Probiotics modify tight-junction proteins in an animal model of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 9, 463–472. doi:10.1177/1756283X16645055.

- Broz, P., and Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 407. doi:10.1038/nri.2016.58.
- Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M., *et al.* (2003). Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J. Immunol.* 171, 6164 LP-6172. doi:10.4049/jimmunol.171.11.6164.
- Buckley, A., and Turner, J. R. (2018). Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a029314. doi:10.1101/cshperspect.a029314.
- Chen, G. Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Núñez, G. (2011). A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *J. Immunol.* 186, 7187 LP-7194. doi:10.4049/jimmunol.1100412.
- Craske, M. G., Stein, M. B., Eley, T. C., Milad, M. R., Holmes, A., Rapee, R. M., *et al.* (2017). Anxiety disorders. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17024. doi:10.1038/nrdp.2017.24.
- De Santis, S., Cavalcanti, E., Mastronardi, M., Jirillo, E., and Chieppa, M. (2015). Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. *Front. Immunol.* 6, 612. doi:10.3389/fimmu.2015.00612.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., and Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 170, 1179–1188. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.005.
- Dinan, T. G., Stanton, C., and Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol. Psychiatry* 74, 720–726. doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.001.
- Elinav, E., Henao-Mejia, J., and Flavell, R. A. (2012). Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* 6, 4. doi:10.1038/mi.2012.115.
- Fessard, A., and Remize, F. (2017). Why Are *Weissella* spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation? *Fermentation* 3. doi:10.3390/fermentation3030038.
- Foster, J. A., and McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36, 305–312. doi:10.1016/j.tins.2013.01.005.
- Fung, T. C., Olson, C. A., and Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Publ. Gr.* 20. doi:10.1038/nn.4476.
- Gao, B., and Xiang, X. (2018). Interleukin-22 from bench to bedside: a promising drug for epithelial repair. *Cell. Mol. Immunol.* doi:10.1038/s41423-018-0055-6.

- Gobin, V., Van Steendam, K., Denys, D., and Deforce, D. (2014). Selective serotonin reuptake inhibitors as a novel class of immunosuppressants. *Int. Immunopharmacol.* 20, 148–156. doi:10.1016/j.intimp.2014.02.030.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ben-Menachem-Zidon, O., Licht, T., Weidenfeld, J., Ben-Hur, T., *et al.* (2007). Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol. Psychiatry* 13, 717. doi:10.1038/sj.mp.4002055.
- Hirota, S. A., Ng, J., Lueng, A., Khajah, M., Parhar, K., Li, Y., *et al.* (2011). NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1359–1372. doi:10.1002/ibd.21478.
- Honda, K., and Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535, 75. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature18848>.
- Hsieh, C. Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., and Tsuneda, S. (2015). Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol. Rep.* 3, e12327. doi:10.14814/phy2.12327.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., *et al.* (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451–1463. doi:10.1016/j.cell.2013.11.024.
- Jimenez, J. A., Uwiera, T. C., Douglas Inglis, G., and Uwiera, R. R. E. (2015). Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog.* 7, 29. doi:10.1186/s13099-015-0076-y.
- Jo, S. G., Noh, E. J., Lee, J. Y., Kim, G., Choi, J. H., Lee, M. E., *et al.* (2016). *Lactobacillus curvatus* WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice. *J. Microbiol.* 54, 503–509. doi:10.1007/s12275-016-6160-2.
- Kanda, T., Nishida, A., Ohno, M., Imaeda, H., Shimada, T., Inatomi, O., *et al.* (2016). *Enterococcus durans* TN-3 induces regulatory T cells and suppresses the development of dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis. *PLoS One* 11, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0159705.
- Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G., and Hyland, N. P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 392. doi:10.3389/fncel.2015.00392.
- Krug, S. M., Schulzke, J. D., and Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 166–176. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.002>.

- Li, N., Lewis, P., Samuelson, D., Liboni, K., and Neu, J. (2004). Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 287, G726–G733. doi:10.1152/ajpgi.00012.2004.
- Liang, S., Wang, T., Hu, X., Luo, J., Li, W., Wu, X., *et al.* (2015). Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* 310, 561–577. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.09.033.
- Ma, T. Y., Nighot, P., and Al-Sadi, R. (2018). “Chapter 25 - Tight Junctions and the Intestinal Barrier,” in, ed. H. M. B. T.-P. of the G. T. (Sixth E. Said (Academic Press), 587–639. doi:10.1016/B978-0-12-809954-4.00025-6.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 599–608. doi:10.1038/nrgastro.2012.152.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I. D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., *et al.* (2010). Gut CD103⁺ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59, 595 LP-604. doi:10.1136/gut.2009.185108.
- Mechawar, N., and Savitz, J. (2016). Neuropathology of mood disorders: do we see the stigmata of inflammation? *Transl. Psychiatry* 6, e946–e946. doi:10.1038/tp.2016.212.
- Michielan, A., and D’Inca, R. (2015). Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm.* 2015, 628157. doi:10.1155/2015/628157.
- Michopoulos, V., Powers, A., Gillespie, C. F., Ressler, K. J., and Jovanovic, T. (2017). Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology* 42, 254–270. doi:10.1038/npp.2016.146.
- Miller, A. H., and Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 22–34. doi:10.1038/nri.2015.5.
- Natividad, J. M. M., and Verdu, E. F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42–51. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.007.
- Ng, J., Papandreou, A., Heales, S. J., and Kurian, M. A. (2015). Monoamine neurotransmitter disorders—clinical advances and future perspectives. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 567. doi:10.1038/nrneurol.2015.172.
- Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., and Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 14, 573. doi:10.1038/nrgastro.2017.88.

- Nyuyki, K. D., Cluny, N. L., Swain, M. G., Sharkey, K. A., and Pittman, Q. J. (2018). Altered Brain Excitability and Increased Anxiety in Mice With Experimental Colitis: Consideration of Hyperalgesia and Sex Differences. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 58. doi:10.3389/fnbeh.2018.00058.
- Oliveira, J. S., Costa, K., Acurcio, L. B., Sandes, S. H. C., Cassali, G. D., Uetanabaro, A. P. T., *et al.* (2018). *In vitro* and *in vivo* evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation (*Theobroma cacao* L.). *J. Funct. Foods* 47, 184–191. doi:10.1016/j.jff.2018.05.055.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., *et al.* (2015). Discovering probiotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Front. Microbiol.* 6, 1–28. doi:10.3389/fmicb.2015.00058.
- Pusceddu, M. M., Murray, K., and Gareau, M. G. (2018). Targeting the Microbiota, From Irritable Bowel Syndrome to Mood Disorders: Focus on Probiotics and Prebiotics. *Curr. Pathobiol. Rep.* 6, 1–13. doi:10.1007/s40139-018-0160-3.
- Powell, N., Walker, M. M., and Talley, N. J. (2017). The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut–brain communications. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol.* 14, 143. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.191>.
- Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., and Jaggi, A. S. (2014). A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 18, 279–288. doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.279.
- Ratsimandresy, R. A., Indramohan, M., Dorfleutner, A., and Stehlik, C. (2016). The AIM2 inflammasome is a central regulator of intestinal homeostasis through the IL-18/IL-22/STAT3 pathway. *Cell. Mol. Immunol.*, 1–16. doi:10.1038/cmi.2016.35.
- Rea, K., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2016). The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol. Stress* 4, 23–33. doi:10.1016/j.ynstr.2016.03.001.
- Reichmann, F., Hassan, A. M., Farzi, A., Jain, P., Schuligoi, R., and Holzer, P. (2015). Dextran sulfate sodium-induced colitis alters stress-associated behaviour and neuropeptide gene expression in the amygdala-hippocampus network of mice. *Sci. Rep.* 5, 9970. doi:10.1038/srep09970.
- Sandes, S., Alvim, L., Silva, B., Acurcio, L., Santos, C., Campos, M., *et al.* (2017). Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. *Microbiol. Res.* 200, 1–13. doi:10.1016/j.micres.2017.03.008.

- Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N. A., Mitchell, J., *et al.* (2017). NLRP6 Protects *Il10*^{-/-} Mice from Colitis by Limiting Colonization of *Akkermansia muciniphila*. *Cell Rep.* 19, 733–745. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.080.
- Shajib, M. S., and Khan, W. I. (2015). The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. 561–574. doi:10.1111/apha.12430.
- Sharma, R., Young, C., and Neu, J. (2010). Molecular Modulation of Intestinal Epithelial Barrier: Contribution of Microbiota. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 1–16. doi:10.1155/2010/305879.
- Shenoy, A. R., Dehmel, T., Stettner, M., Kremer, D., Kieseier, B. C., Hartung, H. P., *et al.* (2013). Citalopram suppresses thymocyte cytokine production. *J. Neuroimmunol.* 262, 46–52. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.06.006.
- Shon, W. J., Lee, Y. K., Shin, J. H., Choi, E. Y., and Shin, D. M. (2015). Severity of DSS-induced colitis is reduced in *Ido1*-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF- κ B transcriptional networks. *Sci. Rep.* 5, 17305. doi:10.1038/srep17305.
- Souza, H. S. P. De, and Fiocchi, C. (2015). Immunopathogenesis of IBD: *Nat. Publ. Gr.* 13, 13–27. doi:10.1038/nrgastro.2016.186.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N. X., *et al.* (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263–75. doi:10.1113/jphysiol.2004.063388.
- Svenningsson, P., Kim, Y., Warner-Schmidt, J., Oh, Y.-S., and Greengard, P. (2013). p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 673–680. doi:10.1038/nrn3564.
- Tovote, P., Fadok, J. P., and Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 317. doi:10.1038/nrn3945.
- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., *et al.* (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* 2, e1308–e1308. doi:10.1371/journal.pone.0001308.
- Xia, Z., Depierre, J. W., and Nässberger, L. (1996). Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 β and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells. *Immunopharmacology* 34, 27–37. doi:10.1016/0162-3109(96)00111-7.
- Zaki, M. H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32, 379–391. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.003.

- Zhang, Y., Zhao, X., Zhu, Y., Ma, J., Ma, H., and Zhang, H. (2018). Probiotic Mixture Protects Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Altering Tight Junction Protein Expressions and Increasing Tregs. *Mediators Inflamm.* 2018, 9416391. doi:10.1155/2018/9416391.
- Zong, Y., Zhu, S., Zhang, S., Zheng, G., Wiley, J. W., and Hong, S. (2019). Chronic stress and intestinal permeability: Lubiprostone regulates glucocorticoid receptor-mediated changes in colon epithelial tight junction proteins, barrier function, and visceral pain in the rodent and human. *Neurogastroenterol. Motil.* 31, e13477. doi:10.1111/nmo.13477.

