

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Natsumi Mizogami Santana

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PSICOBÍÓTICO DE *Bifidobacterium longum*  
subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> E *Lactiseibacillus rhamnosus* (64) EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Belo Horizonte  
2025

Natsumi Mizogami Santana

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PSICOBÍÓTICO DE *Bifidobacterium longum*  
subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> E *Lactocaseibacillus rhamnosus* (64) EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciene Bruno Vieira

Belo Horizonte

2025

043

Santana, Natsumi Mizogami.

Avaliação do potencial psicobiótico de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> e *Lactiseibacillus rhamnosus* (64) em modelo experimental de depressão induzida por lipopolissacarídeo [manuscrito] / Natsumi Mizogami Santana. – 2025.

117 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciene Bruno Vieira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Depressão. 3. Ansiedade. 4. Microbioma Gastrointestinal. 5. Probióticos. 6. Lipopolissacarídeos. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Vieira, Luciene Bruno. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE NATSUMI MIZOGAMI SANTANA

Nº REGISTRO: 2023665773

Às 14:00 horas do dia **26 de março de 2025**, reuniu-se remotamente, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Ana Lucia Brunialti Godard (Departamento de Genética/ICB/UFMG), Ramon de Oliveira Souza (FUNED - Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Divisão de Ciência e Inovação, Serviço de Toxinologia Molecular), o Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins (Orientador) e a Dra. Profa. Luciene Bruno Vieira (Coorientadora), para julgar o trabalho final "**Avaliação do potencial psicobiótico de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> e *Lactocaseibacillus rhamnosus* (64) em modelo experimental de depressão induzida por lipopolissacarídeo**" da aluna **Natsumi Mizogami Santana**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - Orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 26 de março de 2025

Membros da banca:

Profa. Dra. Ana Lucia Brunialti Godard

Dr. Ramon de Oliveira Souza

De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Dra. Profa. Luciene Bruno Vieira

(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Coordenador do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/03/2025, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lucia Brunialti Godard, Professora do Magistério Superior**, em 27/03/2025, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ramon de Oliveira Souza, Usuário Externo**, em 30/04/2025, às 08:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4059179** e o código CRC **9E6C6C4A**.

À todas as pessoas com depressão, que  
(sobre)vivem apesar de.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, por ter me dado a vida. Por não ter matado a bióloga que já habitava em mim desde cedo. Pelo seu riso fácil, o qual eu herdei. Adoro sua leveza de uma garota de 16 anos. Obrigada por me ter feito sua filha.

Ao meu pai, porque sei que você não teve nem a metade das oportunidades que você me possibilitou ter. Porque você não só abriu caminhos, mas me ensinou que por cima do medo, coragem. Obrigada por isso.

Aos meus irmãos, por tudo e por tanto. Desde fofocas bobas a conversas um tanto filosóficas em uma quarta-feira às nove e meia da noite. Pela confiança inabalável, pelo apoio incondicional e pelos longos anos que vivemos juntos sob o mesmo teto. Gosto do fato de sermos quatro, um número perfeito para jogar uno (convenhamos, mainha arrasou muito nesse quesito). Eu sou eu por vocês serem vocês e não posso deixar de registrar a minha gratidão por isso.

Ao meu avô Teizō. Queria que você estivesse aqui, mesmo que fosse só para você poder rir da minha cara enquanto tento explicar as coisas que fiz no mestrado. Queria que a vida (ou seria a morte?) tivesse lhe dado mais tempo. Já fazem 18 anos que te vi pela última vez. Já não me lembro da tua voz, porque o tempo não foi gentil com nenhum de nós. Mas nunca vou esquecer do gostinho das comidas que você fazia para mim e dos momentos que jogamos hanafuda (inclusive, lembro de ficar indignada perdendo tanto nesse jogo para você). Eu não queria parar de escrever esse agradecimento para você. Porque você sabe, nunca fui boa em despedidas. Mas sua neta está finalmente pronta. Ojiichan, obrigada por ter cuidado tanto de mim.

Ao meu orientador Dr. Flaviano Martins, por ter me dado a oportunidade de desenvolver o projeto em seu laboratório como parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança no meu trabalho e por ser sempre solícito.

À minha coorientadora Dra. Luciene Vieira, pela disponibilidade em tirar dúvidas e fazer sugestões, e por sempre me acalmar dizendo que daria certo no final.

À professora Dra. Daniele Aguiar, por ter me acolhido em seu laboratório e pelas sugestões e auxílio nos experimentos comportamentais.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, porque sem o trabalho em equipe, nada teria sido possível. Obrigada pelas infinitas horas de

ajuda e por tantas risadas. Agradeço especialmente à Amanda, à Clara, ao Bruno, à Fernanda, à Lara, à Pamella e à Samantha (minha quase dupla de laboratório) por toda a paciência que tiveram para me ensinarem.

Aos integrantes do laboratório de Neurofarmacologia, especialmente à Anna Luiza, Gabi, Lidinha, João, Ana Luísa e Roberta pela ajuda na eutanásia dos animais e por sempre animarem o ambiente.

Ao pessoal do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, especialmente à Anna e Rayssa, pela ajuda nos experimentos comportamentais e por sempre serem gentis e pacientes comigo.

À professora Dra. Aline Miranda e aos integrantes do Laboratório de Neurobiologia, pelas sugestões nos testes comportamentais e ajuda nas dosagens.

Aos técnicos de laboratório, pelo trabalho essencial.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Biotecnologia de Bactérias, pela ótima companhia.

À Larissa Queiroz, minha dupla de comportamento, por compartilhar momentos de tristeza e alegria, e por acreditar que uma hora iríamos conseguir.

Aos animais de experimentação.

Aos órgãos de fomento, que permitiu a minha permanência na universidade.

Aos profissionais da saúde que cuidaram de mim durante a minha estadia em Belo Horizonte.

Aos servidores da UFMG, em especial ao pessoal que trabalha nos restaurantes universitários pelas refeições maravilhosas que me mantiveram de pé durante todo o mestrado; ao pessoal da limpeza, por sempre manterem o ambiente limpo e agradável; além de serem os meus primeiros “bom dia” de todos os dias.

Aos colegas da turma de 2021, por mesmo que pouco tempo, termos compartilhado medos, expectativas e momentos incríveis. Agradeço especialmente à Alessandra, ao Gabriel e à Noêmia, que estiveram por perto em todo o processo de mestrado, seja no bandeirão ou no laboratório, em momentos de pequenos surtos diários ou para um cafezinho. Muito obrigada pelo apoio e pela amizade.

Aos meus amigos de Feira de Santana, por serem o endereço para qual sempre posso voltar, e claro, por serem um pedaço de mal caminho.

À Alice, por toda a paciência e compreensão mesmo nos dias mais difíceis. Por acreditar em mim quando nem eu conseguia acreditar. Por ter acompanhado

cada passo que dei ao longo desse mestrado. Pela sinceridade. Por todas as horas que passamos juntas mesmo estando a mais de 1400 Km de distância. Obrigada por ser a minha melhor companhia e por despertar em mim a minha melhor versão.

À Mitski, por cantar o impronunciável. Por celebrar a angústia de existir. Por causa de você, sou menos sozinha nesse não-lugar que o meu corpo ocupa. Obrigada por agraciar o mundo com sua arte.

E, por último, a todos que vieram antes de mim nesse caminho tortuoso da ciência, com ética, dos quais não conheço o rosto, e, muitas vezes, nem sequer o nome.

*“Cada nova descoberta é apenas um lembrete de que somos  
todos pequenos e estúpidos”*  
(Tudo em todo lugar ao mesmo tempo)

## RESUMO

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns no mundo. Apesar de diversos estudos, há lacunas no conhecimento da sua fisiopatologia. O tratamento farmacológico enfrenta desafios, como a demora no aparecimento dos efeitos terapêuticos, acompanhado pelo rápido aparecimento de efeitos adversos. Além disso, uma parcela dos pacientes não responde aos fármacos disponíveis no mercado. No Brasil, a estimativa de prevalência da depressão ao longo da vida na população é de 15,5%, chegando até a 20% entre as mulheres. Levando em consideração a alta prevalência e as dificuldades no tratamento, há necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Alterações na microbiota intestinal têm sido apontadas como um possível fator associado à depressão, com destaque para a modulação da microbiota como possibilidade para o desenvolvimento de novas terapias. Neste cenário, os psicobióticos, que podem ser definidos como probióticos capazes de trazer benefícios à saúde mental, podem contribuir para um tratamento mais seguro e eficaz. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> (B5<sup>1A</sup>) e *Lactobacillus rhamnosus* (64) (L64) são bactérias isoladas de fezes e leite materno, respectivamente, ambas com observação de efeitos positivos sobre a cognição em ensaios pré-clínicos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> e L64 em camundongos C57BL/6 com comportamento tipo depressivo induzido pela administração intraperitoneal (i.p.) de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4. Além de testes comportamentais para avaliação da locomoção, cognição, comportamento tipo depressivo e tipo ansioso, realizou-se dosagem de parâmetros imunológicos no baço, fígado, intestino delgado e cólon, dosagem do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no soro e no hipocampo, quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) no conteúdo do ceco e níveis de IgA secretora no fluido intestinal. Além disso, realizamos acompanhamento da massa corporal, consumo alimentar e escore clínico. Camundongos fêmeas manifestaram comportamento tipo depressivo após sete dias da administração de 1,5 mg/Kg de LPS em dose única, sem alteração na distância total percorrida no teste de campo aberto. Entretanto, administração de B5<sup>1A</sup> ou L64 não foi eficaz em reduzir estatisticamente o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Isso indica que embora o modelo experimental tenha sido bem-sucedido em induzir o comportamento tipo depressivo, estas linhagens não apresentaram efeitos terapêuticos esperados neste ensaio específico. Apesar disso, ambas as linhagens aumentaram os níveis de BDNF hipocampal, o que sugere efeito neuroprotetor. Além disso, a administração de L64 acelerou a recuperação dos animais expostos ao LPS. Esses achados indicam a necessidade de mais investigações sobre o potencial terapêutico destas linhagens, possivelmente em diferentes modelos experimentais ou protocolos de administração.

Palavras-chaves: C57BL/6; LPS; eixo microbiota-intestino-cérebro; depressão; ansiedade; probiótico.

## ABSTRACT

Depression is one of the most prevalent psychiatric disorders in the world. Despite numerous studies, there are still gaps in the knowledge of its pathophysiology. The pharmacological treatment faces challenges such as the delay in therapeutic effect accompanied by the rapid manifestation of side effects. Furthermore, a significant portion of patients does not respond to currently available drugs. In Brazil, it is estimated that the prevalence of depression is about 15.5%, reaching 20% among women. Considering the high prevalence and difficulties in treatment, there is a need for new therapeutic approaches. Changes in the microbiota have been suggested as a possible factor associated with depression, with an emphasis on microbiota modulation as a potential strategy for the development of new therapies. From this perspective, psychobiotics, which can be defined as probiotic capable of providing benefits to mental health, may contribute to safer and more effective treatments. *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> (B5<sup>1A</sup>) and *Lactobacillus rhamnosus* (64) (L64) are bacteria isolated from feces and breast milk, respectively, both having positive effects on cognition in preclinical trials. Considering this, the aim of this study was to evaluate the psychobiotic potential of B5<sup>1A</sup> and L64 using C57BL/6 mice with depressive-like behavior induced by intraperitoneal (i.p.) administration of *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide (LPS). In addition to behavioral tests to evaluate locomotion, cognition, depressive-like behavior, and anxiety-like behavior, immunological parameters in the spleen, liver, small intestine, and colon, measurement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level in serum and brain, quantification of short-chain fatty acids (SCFAs) in cecal content, and secretory IgA in small intestine fluid were conducted. Moreover, the body weight, food intake, and clinical score were monitored. Female mice exhibited depressive-like behavior seven days after a single dose of 1.5 mg/Kg of LPS, without changes in the total distance traveled in the open field test. However, administration of either B5<sup>1A</sup> or L64 was not effective in reducing immobility time in the forced swim test. This indicates that, despite the experimental model successfully induced depressive-like behavior, these strains did not show the expected therapeutic effects in this specific assay. Nevertheless, both strains increased hippocampal BDNF levels, suggesting a neuroprotective effect. In addition, the administration of L64 accelerated the recovery of animals exposed to LPS. These results indicate the need for further investigation into the therapeutic potential of these strains, possibly in different experimental models or with alternative administration protocols.

Key-words: C57BL/6, LPS, microbiota-gut-brain axis; depression; anxiety; probiotic.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-HK – 3 hidroxiquinurenina

5-HT – Serotonina

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês *Adrenocorticotropic hormone*)

ADT – Antidepressivo tricíclico

AGCC – Ácido(s) Graxo(s) de Cadeia Curta

ANOVA – Análise de variância (do inglês *analysis of variance*)

APA – Associação Americana de Psiquiatria (do inglês *American Psychiatric Association*)

ATCC – Coleção de Cultura Tipo Americana (do inglês *American Type Culture Collection*)

B5<sup>1A</sup> – *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup>.

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COVID-19 – Doença por corona vírus 19 (do inglês *coronavirus disease 2019*)

CTL – Controle

DA – Dopamina

DALY – Esperança de vida corrigida pela incapacidade (do inglês *Disability-adjusted life year*)

DSM – Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês *European Food Safety Authority*)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *enzyme linked immuno sorbent assay*)

EPM – Teste de labirinto em cruz elevado (do inglês *elevated plus maze test*)

EPO – Peroxidase eosinofílica (do inglês *eosinophil peroxidase*)

EPS – Exopolissacarídeos

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization*)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)

FMT – Transplante de microbiota fecal (do inglês *fecal microbiota transplantation*)

FST – Teste de nado forçado (do inglês *forced swim test*)

GABA – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

Glu – Glutamato

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

i.g. – Intragástrico

i.p. – Intraperitoneal

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulina do tipo A

IHME – Instituto de Métricas e Avaliação em Saúde (do inglês *Institute of Health Metrics and Evaluation*)

IL – Interleucina

IMAO – Inibidor de monoamina oxidase

ISRS – Inibidor seletivo de recaptção de serotonina

ISRSN – Inibidor de recaptção de serotonina e noradrenalina

KYN – Quinurenina

KYNA – Ácido quinurênico

L64 – *Lactocaseibacillus rhamnosus* (64)

LABio – Laboratório de Agentes Bioterapêuticos

LNP – Laboratório de Neuropsicofarmacologia

LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF – Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de voo (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight*).

MAO – Monoamina oxidase

MHV- 3 – Vírus da hepatite murina 3 (do inglês *murine hepatitis virus 3*)

MPO – Mieloperoxidase

MRS – Ágar de *Mann, Rogosa e Sharp*

NAG – N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase

NB2 – Nível de Biossegurança 2

NE – Norepinefrina

NMDA – N-metil D-Aspartato

NMDAR – Receptor N-metil D-Aspartato

OFT – Teste de campo aberto (do inglês *open field test*)

OMV – Vesículas da membrana externa bacteriana (do inglês *outer membrane vesicles*)

OPD – O-fenilenodiamina

PBS – tampão fosfato-salino do (inglês *phosphate buffered saline*)

pH – Potencial hidrogeniônico

QA – Ácido quinolínico

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécie reativa de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

RPM – Rotação por minuto

rRNA – RNA ribossomal

SEM – Erro padrão da média (do inglês *standard error of the mean*)

slgA – Imunoglobulina A secretora

SNC – Sistema nervoso central

SPF – Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos (do inglês *Specific Pathogen Free*)

SPT – Teste de preferência pela sacarose (do inglês *sucrose preference test*)

TGI – Trato gastrointestinal

TLR – Receptores do tipo *Toll* (do inglês *Toll-like receptors*)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF – Fator de necrose tumoral

TrkB – Receptor de tirosina quinase B

Trp – Triptofano

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VMAT – Transportador vesicular de monoaminas (do inglês *vesicular monoamine transporter*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

YLD – Anos vividos com incapacidade (do inglês *Years lived with disability*)

YLL – Anos potenciais de vida perdido (do inglês *Years of potential life lost*)

YMT – Teste de labirinto em Y (do inglês *Y-maze test*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcento

°C – Graus Célsius

cm – Centímetro(s)

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

g – Grama(s)

h – Hora(s)

H<sub>2</sub> – Hidrogênio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

Kg – Quilograma(s)

KIU/mL – Unidade inibidora de caliceína (do inglês *kallikrein inhibitor unit*)

L – Litro(s)

M – Molar

mg – Miligrama(s)

mL – Mililitro(s)

mM – Milimolar

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

Na<sub>2</sub>-EDTA – EDTA dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O – Fosfato de sódio monobásico monohidratado

NO – Óxido nítrico

nm – Nanômetro(s)

p/v – Peso por volume

v/v – Volume por volume

µg – Micrograma(s)

µL – Microlitro(s)

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Depressão.....	20
1.2	Fisiopatologia da depressão: hipótese das monoaminas.....	21
1.3	Inflamação: papel dos mediadores pró-inflamatórios e a neuroinflamação na depressão .....	23
1.4	Plasticidade neural e depressão: papel das neurotrofinas.....	24
1.5	Eixo microbiota-intestino-cérebro.....	25
1.6	Microbiota e saúde: psicobióticos .....	26
1.7	<i>Bifidobacterium longum</i> .....	28
1.8	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> 5 <sup>1A</sup> .....	29
1.9	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (64) (L64).....	30
1.10	Modelo murino de comportamento tipo depressivo induzido por administração de lipopolissacarídeo (LPS) .....	31
1.10.1	Estrutura do LPS.....	31
1.10.2	Resposta da imunidade inata à exposição de LPS.....	32
1.10.2	Comportamento tipo depressivo induzido pela administração de LPS	33
1.11	Testes comportamentais em modelos murinos de comportamento tipo depressivo.....	35
1.11.1	<i>Despair-like behavior</i> .....	35
1.11.2	Comportamento tipo anedonia.....	36
1.11.3	Comportamento tipo ansioso .....	37
1.11.4	Locomoção e atividade exploratória .....	38
1.11.5	Cognição.....	39
2.	JUSTIFICATIVA .....	41
3.	OBJETIVOS .....	42
3.1	Objetivo geral .....	42
3.2	Objetivos específicos .....	42
4.1	Microrganismos.....	43
4.2	Animais .....	43
4.3	Administração da bactéria.....	44
4.4	Desafio com LPS .....	44
4.5	Avaliação do escore clínico.....	44
4.6	Delineamento experimental.....	45
4.6.1	Experimento 1: Padronização da dose de LPS.....	45

4.6.2 Experimento 2: Avaliação do potencial psicobiótico de B5 <sup>1A</sup> em machos..	46
4.6.3 Experimento 3: Avaliação do potencial psicobiótico de B5 <sup>1A</sup> e L64 em fêmeas .....	47
4.7 Massa corporal e consumo de alimentar .....	48
4.8 Testes comportamentais .....	48
4.8.1 Campo aberto (OFT).....	48
4.8.2. Nado forçado (FST) .....	49
4.8.2 Labirinto em cruz elevado (EPM) .....	49
4.8.3 Teste de preferência por sacarose (SPF).....	49
4.8.4 Teste de labirinto em Y (YMT).....	50
4.9 Dosagem de imunoglobulina A secretora (sIgA) no conteúdo intestinal .....	50
4.9.1 Coleta .....	50
4.9.2 ELISA .....	51
4.10 Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO).....	51
4.10.1 Processamento das amostras.....	52
4.10.2 Ensaio colorimétrico.....	52
4.11 Ensaio de mieloperoxidase (MPO).....	52
4.11.1 Processamento das amostras.....	52
4.11.2 Ensaio colorimétrico.....	53
4.12 Dosagem de N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG).....	53
4.12.1 Processamento das amostras.....	53
4.12.2 Ensaio colorimétrico.....	54
4.13 Dosagem de neurotrofina derivada do cérebro (BDNF) no hipocampo e soro .....	54
4.13.1 Processamento do hipocampo:.....	54
4.13.2 ELISA.....	54
4.14 Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo cecal... 55	
4.14.1 Processamento das amostras.....	55
4.14.2 HPLC .....	55
4.15 Análise estatística .....	55
5. RESULTADOS .....	57
5.1 Experimento 1: Padronização da dose de LPS em animais C57BL/6 machos	57
5.1.1 Avaliação do consumo alimentar, massa corporal, escore clínico e peso relativo do baço .....	57
5.1.2 Dosagem de sIgA .....	61

5.1.3	Testes comportamentais: OFT, EPM, YMT e FST .....	62
5.2	Experimento 2: Avaliação do potencial psicobiótico de B5 <sup>1A</sup> e L64 em machos e fêmeas desafiados com LPS na dose de 1,5 mg/Kg .....	67
5.2.1	Massa corporal .....	67
5.2.2	Consumo alimentar .....	69
5.2.3	Escore clínico .....	70
5.2.4	Peso relativo do baço .....	72
5.2.5	Parâmetros imunológicos do baço .....	73
5.2.6	Caracterização do impacto na atividade de MPO e EPO no fígado, duodeno, jejuno, íleo e cólon em fêmeas .....	75
5.2.7	Dosagem de sIgA em fêmeas .....	77
5.2.8	Testes comportamentais .....	77
5.2.9	Medida de AGCC e lactato .....	81
5.2.10	Dosagem de BDNF .....	82
6.	DISCUSSÃO .....	85
6.1	Análise do consumo alimentar, massa corporal e escore clínico .....	85
6.2	Impactos no órgão imune secundário: baço .....	86
6.3	Caracterização da atividade de MPO e EPO no fígado e regiões do intestino delgado e cólon .....	87
6.4	Dosagem de sIgA .....	88
6.5	Dosagem de AGCC .....	89
6.6	Dosagem de BDNF .....	89
6.7	Experimentos comportamentais: .....	90
6.7.1	Atividade locomotora e exploratória .....	90
6.7.2	Cognição .....	91
6.7.3	Comportamento tipo depressivo e ansioso .....	91
7.	CONCLUSÕES .....	93
	REFERÊNCIAS .....	94
	APÊNDICE A .....	108
	ANEXO A .....	116

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Depressão

A depressão é um transtorno mental caracterizado por alterações no humor, apetite, sono, cognição e comportamento, que afeta cerca de 280 milhões de pessoas mundialmente (IHME, 2019). É um transtorno comum e altamente recorrente, que impacta não apenas a qualidade de vida do indivíduo, mas também o seu desempenho acadêmico e profissional, acarretando prejuízos tanto no âmbito social, quanto no econômico (Wu; Yin; Du, 2021).

Em 2019, entre as doenças mentais, o transtorno depressivo (incluindo a depressão unipolar e a distímia) foi responsável pela maior proporção de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY). Este indicador epidemiológico leva em consideração tanto os anos perdidos devido à morte precoce causada pela doença (YLL) quanto os anos vividos com incapacidade (YLD), o que evidencia a natureza altamente debilitante dessa condição (Ferrari, 2022).

Os sintomas centrais da depressão consistem em humor deprimido e/ou perda de capacidade de sentir prazer, com diferentes combinações de outros sintomas (tabela 1), resultando em um transtorno com apresentação clínica heterogênea entre os indivíduos (Montano *et al.*, 2023).

**Tabela 1** – Sintomas que caracterizam o transtorno depressivo

<b>Sintomas centrais (pelo menos 1)</b>	<b>Outros sintomas</b>
Humor deprimido	Alteração no apetite ou no peso
Perda de interesse ou prazer	Insônia ou hipersonia
	Agitação ou retardo psicomotor
	Fadiga
	Sentimentos de inutilidade ou culpa
	Desesperança
	Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão
	Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida e/ou tentativa de suicídio

\* Os sintomas devem estar presentes por pelo menos 2 semanas, na maior parte dos dias.

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) (APA, 2014).

Devido a essa característica, uma abordagem terapêutica multidisciplinar é recomendada, incluindo a psicoterapia, que pode ocorrer em combinação com a farmacoterapia, ou, em alguns casos, procedimentos como eletroconvulsoterapia e estimulação magnética transcraniana podem ser realizados (Montano *et al.*, 2023).

Apesar disso, a literatura indica que aproximadamente um terço dos pacientes não respondem de forma satisfatória ao tratamento farmacológico. Além disso, a adesão ao tratamento é um desafio, pois os efeitos terapêuticos levam semanas para se manifestar, enquanto os efeitos adversos ocorrem rapidamente (Demin *et al.*, 2019). Outro fator complicador é a alta prevalência de comorbidades psiquiátricas como transtornos de ansiedade em pacientes com depressão, o que torna o manejo clínico ainda mais complexo (Demin *et al.*, 2019).

Os medicamentos mais comumente prescritos para o tratamento da depressão são os chamados antidepressivos de segunda geração, que atuam sobre os mecanismos de neurotransmissão monoaminérgica (Jiang *et al.*, 2022). Estes foram desenvolvidos com base em observações que remontam a década de 1950, quando surgiu a hipótese das monoaminas.

## 1.2 Fisiopatologia da depressão: hipótese das monoaminas

Em 1954, um médico observou que alguns pacientes com hipertensão arterial tratados a longo prazo com reserpina manifestavam sintomas depressivos (Freis, 1954). Este fármaco inibe a atividade do transportador de monoaminas vesicular (VMAT), responsável pela captação de neurotransmissores como serotonina (5-HT), norepinefrina (NE), dopamina (DA) e epinefrina para as vesículas sinápticas (Yadav; Gati, 2024). Assim, o bloqueio do VMAT tem como consequência a depleção de monoaminas (Alwindi; Bizanti, 2023). Ainda, outros fármacos que atuam sobre o sistema monoaminérgico demonstraram ação sobre o humor.

Assim, a hipótese das monoaminas atribui o transtorno depressivo à deficiência de 5-HT, NE e em menor proporção a DA no sistema nervoso central (SNC), sendo de suma importância para o desenvolvimento de fármacos de diversas classes (tabela 2).

**Tabela 2 – Principais classes de antidepressivos.** Na tabela, encontra-se os mecanismos de ação, uso e possíveis efeitos colaterais dos antidepressivos de primeira e segunda geração.

Classe	Mecanismo de ação e uso	Possíveis efeitos colaterais
<b>Inibidor de monoamina oxidase (IMAO)</b>	A inibição da MAO impede a degradação de monoaminas no citoplasma neuronal, aumentando sua captação em vesículas e sua liberação na fenda sináptica. Seu uso é limitado pelo risco de crise hipertensiva e síndrome serotoninérgica, e pela interação	Disfunção erétil; ansiedade; náusea; cefaleia; tontura; insônia; edema; boca seca e toxicidade sistêmica da tiramina.

	com alimentos	
<b>Tricíclico (ADT)</b>	Aumentam a disponibilidade de 5-HT e NE na fenda sináptica, com menor impacto sobre a DA. São agrupados pela estrutura química semelhante. Devido ao alto risco de toxicidade em overdose e efeitos cardiovasculares, não são a primeira escolha terapêutica.	Constipação; retenção urinária; visão turva; boca seca; taquicardia; náusea; tontura; sedação; hipotensão ortostática e ganho de peso.
<b>Inibidor seletivo de recaptção de serotonina (ISRS)</b>	Inibe o transportador de recaptção de serotonina, responsável por retirar o neurotransmissor da sinapse, o que resulta no aumento da disponibilidade de serotonina na fenda sináptica. Medicamento de primeira escolha pela segurança e tolerabilidade.	Ansiedade; insônia; disfunção sexual; náusea; cefaleia; problemas gastrointestinais, embotamento emocional;
<b>Inibidor de recaptção de serotonina e norepinefrina (ISRSN)</b>	Inibe o transportador de recaptção de serotonina e norepinefrina, o que resulta no aumento da disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica. Medicamento de primeira escolha pela segurança e tolerabilidade.	Insônia, disfunção sexual; náusea; boca seca; cefaleia; constipação; ansiedade; tontura; embotamento emocional;
<b>Moduladores de serotonina</b>	Interação com receptores de serotonina.	Náusea; diarreia; dor de cabeça e tontura.
<b>Atípicos</b>	Interação com múltiplos alvos, com mecanismo de ação diferentes entre si. Classificados como atípicos por não se encaixarem em outras classes.	Efeito adverso dependente do fármaco. Exemplo: mirtazapina pode causar sedação, ganho de peso e boca seca, enquanto bupropiona está relacionado a perda de peso, cefaleia e hipertensão arterial.

Fontes: Chamberlain e Baldwin (2021); Chang *et al.* (2022); Edinoff *et al.* (2021); Montano *et al.* (2023)

No entanto, apesar dos fármacos antidepressivos exercerem suas ações sobre seu alvo de forma rápida, a melhora nos sintomas é observada somente após algumas semanas em tratamento contínuo, deixando lacunas ainda no conhecimento sobre o transtorno (Fries *et al.*, 2023).

É importante salientar que, atualmente, a depressão é entendida como um transtorno multifatorial, resultante da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Ainda, ao longo de décadas, desde o surgimento dos primeiros antidepressivos, diversas investigações são realizadas a fim de melhor entender a sua fisiopatologia, assim como esforços para o desenvolvimento de tratamento farmacológico com maior eficácia e tolerabilidade, uma vez que uma parcela considerável dos pacientes não responde ao tratamento convencional (Wu; Yin; Du, 2021).

Entre as hipóteses vigentes, além da monoaminérgica apresentada acima, há estudos que investigam a relação do transtorno depressivo com fenômenos

inflamatórios, neuroendócrinos, neurotróficos, e, mais recentemente, estudos sobre o eixo microbiota-intestino-cérebro tem ganhado visibilidade.

### 1.3 Inflamação: papel dos mediadores pró-inflamatórios e a neuroinflamação na depressão

Um quadro inflamatório crônico de grau leve é frequentemente observado em pacientes com distúrbios de humor. Evidências sugerem que o aumento de mediadores pró-inflamatórios circulantes pode influenciar o comportamento e a cognição, interferindo na neurotransmissão e mecanismos neuroendócrinos (Bauer; Teixeira, 2021). Por exemplo, pacientes tratados com a citocina pró-inflamatória interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) podem manifestar distúrbios de ordem psíquica, incluindo sintomas depressivos (Sarkar *et al.*, 2021).

Além disso, a literatura apresenta inúmeros registros de alterações nos níveis de citocinas séricas entre os pacientes depressivos, quando comparados a controles saudáveis. No entanto, há discrepâncias nesses achados, seja em relação as moléculas analisadas ou aos resultados obtidos. Por exemplo, no trabalho conduzido por Oglodek (2022) foram observados níveis séricos aumentados de interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), IL4 e IL8, e redução de IL10 entre pacientes depressivos sem tratamento medicamentoso em comparação com o grupo saudável, bem como foi estabelecida uma correlação entre a gravidade do quadro depressivo e o nível de alteração dessas citocinas. Já em estudo desenvolvido por Obermanns *et al.* (2021), observou-se níveis séricos aumentados de IL6 e IFN $\gamma$  entre os pacientes depressivos, mas sem diferença para fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e IL10. Enquanto isso, Nayem *et al.* (2023) indicaram níveis aumentados de TNF $\alpha$  no sangue de pacientes depressivos.

Além desses achados, tem sido reportado uma redução significativa de citocinas pró-inflamatórias entre alguns indivíduos após o uso de antidepressivos (Dionisie *et al.*, 2021). Somado a isso, níveis de algumas citocinas foram correlacionadas com responsividade ao fármaco antidepressivo (Benedetti *et al.*, 2021).

No entanto, é importante ressaltar que, em diversos estudos, o quadro inflamatório é detectado apenas em um subgrupo de pacientes depressivos; assim, não deve ser interpretado como um marcador biológico da doença (Bauer; Teixeira,

2021). Além disso, estudos utilizando anti-inflamatórios como adjuvantes no tratamento farmacológico da depressão tem apresentado resultados divergentes. Alguns indicam efeito não significativo, como o estudo conduzido por Hellmann-Regen *et al.* (2022), enquanto outros estudos relataram resposta significativa  
5 somente quando se considera o subgrupo de pacientes com inflamação aumentada detectada antes do tratamento (Nettis *et al.*, 2021).

Outro fator a ser pontuado é que o estudo da correlação entre os marcadores da inflamação periférica e o estado funcional e estrutural do SNC ainda é incipiente, tendo poucos dados sobre o perfil imunológico do SNC em pacientes com  
10 depressão (Han; Ham, 2021). Da mesma forma, as vias pelas quais as citocinas periféricas poderiam atingir o SNC são ainda pouco compreendidas, uma vez que o SNC foi considerado um sítio imuno privilegiado durante décadas (Dionisie *et al.*, 2021; Rustenhoven; Kipnis, 2022).

Nesse cenário, estudos pré-clínicos em modelos animais são fundamentais  
15 para realizar inferências sobre a associação da inflamação periférica, SNC e o comportamento.

A indução da inflamação periférica pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em murinos resulta em aumento de citocinas pró-inflamatórias tanto no soro quanto no hipocampo, assim como aumento da produção  
20 de espécies reativas no tecido cerebral. Esse processo também ativa a micróglia e os astrócitos, altera a expressão de proteínas envolvidas na neurotransmissão e neuroplasticidade e está associado a comportamentos do tipo depressivo nos animais (Li *et al.*, 2021). Respostas inflamatórias semelhantes no SNC são observadas em modelos de depressão que utilizam indução por estresse (Zuo *et al.*,  
25 2022) ou por administração de corticosterona (Zhang *et al.*, 2023), corroborando, assim, a possível participação da inflamação na fisiopatologia do transtorno depressivo.

Dessa maneira, a neuroinflamação – caracterizada pela ativação da micróglia e dos astrócitos, com liberação de quimiocinas, citocinas e espécies reativas – pode  
30 desempenhar um papel central no entendimento da depressão (Skrzypczak-Wiercioch; Saiat, 2022).

#### 1.4 Plasticidade neural e depressão: papel das neurotrofinas

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma das neurotrofinas mais estudadas e desempenha um papel central na regulação da plasticidade sináptica, neurogênese e sobrevivência neuronal. Assim, a hipótese das neurotrofinas sugere que a redução do BDNF e de outros fatores de crescimento está associada à atrofia de regiões como o hipocampo, um fenômeno observado em pacientes depressivos, embora não seja exclusivo desse transtorno (Tartt *et al.*, 2022).

O BDNF é uma proteína de sinalização extracelular que se liga com alta afinidade ao receptor proteína-tirosina quinase 2 (TrkB), encontrado tanto na membrana plasmática do neurônio pré-sináptico quanto do neurônio pós-sináptico (Cavaleri *et al.*, 2023). A interação entre o BDNF e seu receptor é crucial para a manutenção da função neuronal, pois está envolvida no crescimento, diferenciação e manutenção dos neurônios, assim como na plasticidade neural e modulação da neurotransmissão. Dessa forma, baixos níveis de BDNF podem afetar a memória, o aprendizado e a regulação do humor, bem como o funcionamento de vias de neuroproteção no SNC (Correia; Cardoso; Vale, 2023). Além disso, existem alguns achados, embora conflitantes, indicando que alguns antidepressivos aumentam os níveis de BDNF após uso crônico, sugerindo que este poderia ser um dos mecanismos de ação no tratamento dos sintomas depressivos (Mosioiek *et al.*, 2021).

### 1.5 Eixo microbiota-intestino-cérebro

Além dos mecanismos descritos acima, e considerando a natureza multifatorial da depressão, a disbiose intestinal surge como um possível fator contribuidor para sua fisiopatologia. Estudos em modelos murinos têm indicado a influência da microbiota intestinal sobre o comportamento tipo depressivo.

No estudo conduzido por Zheng *et al.* (2016), o transplante de microbiota fecal (FMT) em camundongos isentos de germes (*germ-free*), a partir de amostras de fezes de pacientes com depressão maior não tratada, induziu comportamento tipo depressivo nos animais receptores. Essa alteração comportamental foi acompanhada por distúrbios na metabolização de aminoácidos e carboidratos na região do hipocampo (Zheng *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram relatados em um estudo mais recente, conduzido por Liu *et al.* (2021), que também identificou

alterações na expressão de proteínas no ceco, fígado, bulbo olfatório e córtex pré-frontal.

Ainda, o estudo de Siopi *et al.* (2023) demonstrou que camundongos saudáveis transplantados com fezes de animais expostos ao regime de estresse crônico manifestaram comportamento tipo depressivo, que foi acompanhado de neuroinflamação, deficiência na neurogênese e desregulação dos neurotransmissores no hipocampo. De forma semelhante, ratos submetidos ao modelo de estresse moderado crônico imprevisível que receberam fezes de ratos saudáveis apresentaram melhora significativa na manifestação do comportamento tipo depressivo, além de redução de marcadores inflamatórios no soro, no córtex pré-frontal e no hipocampo (Rao *et al.*, 2021).

Além disso, a administração de certas linhagens de bactérias tem demonstrado efeitos benéficos em modelos animais de comportamento tipo depressivo: camundongos tratados com *Akkermansia muciniphila* ATCC® BAA-835™ apresentaram melhor desempenho em testes comportamentais (Ding *et al.*, 2022). O tratamento com essa bactéria também atenuou a diminuição da expressão de BDNF no hipocampo, sugerindo um potencial efeito neuroprotetor (Ding *et al.*, 2022).

Em relação a estudos clínicos, alguns trabalhos têm mostrado alterações significativas na microbiota intestinal de pacientes com depressão maior em comparação ao grupo saudável (Zhang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). Ainda, há ensaios clínicos randomizados duplo-cegos com resultados positivos no uso de probióticos em pacientes depressivos (Schaub *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2022).

Esses estudos sugerem uma relação entre a microbiota e a regulação do humor, da cognição e do comportamento, mediada pelo eixo microbiota-intestino-cérebro. Essa rede de comunicação bidirecional envolve o SNC, o intestino e a microbiota residente, sendo modulada por vias de sinalização que incluem o sistema imunológico, o sistema neuroendócrino, o nervo vago e o metabolismo microbiano (Cheng; Liu; Ling, 2021; Settanni *et al.*, 2021; Radford-Smith; Anthony, 2023).

30

## 1.6 Microbiota e saúde: psicobióticos

O termo microbiota refere-se ao conjunto de microrganismos, isto é, arqueias, bactérias, fungos, protozoários e vírus, que habitam um determinado ambiente, seja

no solo, na água, ou até mesmo na superfície ou no interior de organismos vivos (Hou *et al.*, 2022). No corpo humano, as superfícies e as cavidades expostas ao ambiente como a pele, trato gastrointestinal, respiratório e genital são colonizadas por microrganismos desde o nascimento (Michán-Doña; Vázquez-Borrego; Michán, 5 2024). Essa microbiota, majoritariamente composta por bactérias, inclui desde espécies benéficas ao hospedeiro a comensais potencialmente patogênicos em uma complexa rede de interações que se dá entre as diferentes comunidades de microrganismos, bem como entre os microrganismos e o hospedeiro (Tewari; Dey, 2024).

10 Estima-se que em um corpo adulto vivem 39 trilhões de células microbianas, que carregam 100 vezes mais genes que o próprio genoma do hospedeiro, *Homo sapiens* (Sender; Fuchs; Milo *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2017). Essa associação, estabelecida ao longo de milhares de anos de história evolutiva, proporciona ao hospedeiro um grande repertório de genes ausentes no próprio genoma, mas que 15 codificam moléculas com papéis importantes na sua fisiologia. Além disso, a microbiota residente compete com patógenos por sítio de ligação e nutrientes, protegendo o hospedeiro de possíveis infecções, e tem papel na regulação das respostas imunes do hospedeiro (Tewari; Dey, 2024).

Entre os sítios colonizados do corpo humano, o intestino é a região com a 20 maior diversidade e densidade microbiana, com presença de espécies que contribuem para a digestão, produção de vitaminas e outros compostos, neurotransmissores, assim como na regulação do sistema imunológico do hospedeiro (Mills *et al.*, 2023). Desse modo, a microbiota intestinal afeta a produção de compostos que podem estar relacionados com o processo de adoecimento, 25 assim como podem beneficiar a saúde do hospedeiro (Hou *et al.*, 2022).

Diante disso, tanto microrganismos vivos benéficos (probióticos), seus produtos e componentes (posbióticos), quanto substratos que auxiliam o crescimento destes microrganismos (prebióticos), têm sido utilizados no tratamento de diversas enfermidades, mesmo direcionados aos sítios fora do intestino (Sharma 30 *et al.*, 2021).

De acordo com Dinan, Stanton e Cryan (2013), psicobióticos são uma classe de probióticos, isto é, “microrganismos vivos que, quando administrados em

quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002), com ação contra doenças de ordem psíquica.

Assim como ocorre com probióticos, as propriedades psicobióticas são linhagem-específicas, e, como tal, os benefícios trazidos por cada linhagem devem  
5 ser estudados a fundo, a fim de garantir a eficiência e a segurança no uso destes (Sharma *et al.*, 2022).

As espécies mais estudadas para essa função são os lactobacilos e as bifidobactérias, pois são tradicionalmente consideradas fortes candidatas na  
10 prospecção de propriedades probióticas. Isso se deve à sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ao seu histórico de segurança comprovada para uso (Cheng; Liu; Ling, 2021). Ainda, exopolissacarídeos (EPS) produzidas por muitas das bifidobactérias possuem propriedades físicas e químicas que modulam as respostas imunes do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2019).

15 Apesar do mecanismo de ação dos psicobióticos não estar elucidado completamente, acredita-se que estes atuam por meio da produção de AGCC e/ ou da modulação na síntese de neurotransmissores, hormônios enteroendócrinos e citocinas anti-inflamatórias. Esses efeitos podem ter aplicações no tratamento de transtornos do humor, estresse e até mesmo em doenças neurodegenerativas  
20 (Dinan; Stanton; Cryan, 2013; Sharma *et al.*, 2021).

### 1.7 *Bifidobacterium longum*

O gênero *Bifidobacterium* reúne bactérias anaeróbicas gram-positivas, não formadora de esporos, imóveis, com morfologia bacilar (Chen; Chen; Ho, 2021).  
25 *Bifidobacterium longum* está entre as primeiras colonizadoras do trato gastrointestinal (TGI) em neonatos humanos, além de ser uma bactéria comensal abundante na microbiota intestinal dos adultos, devido a sua capacidade de metabolizar um amplo espectro de carboidratos (Zhang *et al.*, 2019). Dessa forma, esta espécie possui diversas linhagens usadas como probióticos e com certificação  
30 de segurança para o consumo pela Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) e pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) (Zhang *et al.*, 2019; Díaz *et al.*, 2021).

A sua capacidade de produção de AGCC é notável, em especial o acetato, que promove a ativação de imunoglobulina A (IgA) no intestino, regulando as respostas imunes do hospedeiro (Mills *et al.*, 2023). Ainda, o acetato é um precursor do butirato, outro AGCC, que é fonte de energia primária dos colonócitos (Mills *et al.*, 2023). Ao atingir o SNC, o acetato pode atuar na maturação das células da micróglia e manutenção da barreira hematoencefálica (Koh *et al.*, 2016). O butirato, por sua vez, pode diminuir a neuroinflamação e promover melhoria nas funções de memória (Garcez *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2023). Dessa forma, é uma espécie que apresenta característica de interesse para possível uso como psicobiótico.

*Bifidobacterium longum* pode ser dividida em 4 subespécies: *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *suis* e *B. longum* subsp. *suillum*, encontrada na microbiota intestinal de humanos e animais não-humanos (Mills *et al.*, 2023). Ainda, uma quinta subespécie foi recentemente proposta por Modesto *et al.* (2023), chamada de *B. longum* subsp. *iuvenis*.

A subespécie de interesse deste trabalho, *B. longum* subsp. *longum*, é encontrada na microbiota de uma ampla faixa etária, com arsenal genético para a degradação de carboidratos complexos, sobretudo aqueles encontrados na parede celular de vegetais (Díaz *et al.*, 2021; Mills *et al.*, 2023).

### 1.8 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup>

*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> (B5<sup>1A</sup>) é uma linhagem isolada de fezes de uma criança em Salvador, Bahia, Brasil, e pertence à coleção do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (LABio) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), coordenado pelo Prof. Flaviano dos Santos Martins.

Existe uma série de trabalhos desenvolvidos *in vitro* (em apêndice A), ensaios pré-clínicos (em apêndice A) e um ensaio clínico (em apêndice A) mostrando efeitos positivos do seu uso sobre a saúde em diversos contextos. De acordo com esses trabalhos, B5<sup>1A</sup> possui características como alta susceptibilidade à antimicrobianos, atividade antagônica contra o crescimento de algumas bactérias patogênicas *in vitro* e alta taxa de crescimento, e apesar de crescer somente em ambiente anaeróbico, possui alta tolerância à presença de oxigênio, permanecendo com células viáveis mesmo após 72h (Souza *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018).

Em estudos pré-clínicos foram observados ação protetora contra infecções bacterianas (Vieira *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2012) e protozoose (Fonseca *et al.*, 2019), bem como efeitos na atenuação de reações alérgicas (Mendes *et al.*, 2017; Fukumori *et al.*, 2019; Casaro *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021) e diminuição da inflamação em artrite gotosa (Vieira *et al.*, 2015), dermatite (Ribeiro *et al.*, 2021), colite (Abrantes *et al.*, 2020) e mucosite intestinal (Quintanilha *et al.*, 2022). Além disso, a administração de B5<sup>1A</sup> preveniu o déficit cognitivo em camundongos infectados por vírus da hepatite murina 3 (MHV-3), em modelo murino para estudo de COVID-19 (Almeida *et al.*, 2023), indicando potencial para atuação no SNC. Além desses achados, possui sua ação terapêutica corroborada em estudo clínico realizado por Guerra *et al.* (2011), em crianças com constipação intestinal.

### 1.9 *Lactocaseibacillus rhamnosus* (64) (L64)

*Lactocaseibacillus rhamnosus* é uma espécie já reconhecida por seu potencial probiótico e boa característica tecnológica, por ser resistente ao processamento para fabricação de formulações (Mathipa-Mdakane; Thantsha *et al.*, 2021). Além disso, possui diversas características consideradas ideais para linhagens probióticas, como alta resistência ao ambiente gastrointestinal, além de inibir o crescimento de diversos patógenos em teste de antagonismo (Mathipa-Mdakane; Thantsha *et al.*, 2021).

A bactéria L64, especificamente, é uma linhagem isolada do leite materno de mães com índice de massa corpórea (IMC) normal. Foi identificada por sequenciamento de rRNA16S seguida de técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de voo (MALDI-TOF) (Damaceno *et al.*, 2023). De acordo com Damaceno *et al.* (2023), não apresenta atividade de degradação de mucina ou de hemólise, sendo sensível a diversos antibióticos, como a amoxicilina/clavulanato, cefoxitina, ceftazidima, cloranfenicol, penicilina, vancomicina, ciprofloxacina, tetraciclina, ampicilina, clindamicina, eritromicina e gentamicina, características importantes para a segurança no seu uso.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a administração de L64 em camundongos C57BL/6 machos melhorou o desempenho cognitivo no modelo de obesidade, indicando atuação no SNC, motivo pela qual foi escolhido para

experimento no modelo de comportamento tipo depressivo induzido por LPS (Costa, 2024).

### 1.10 Modelo murino de comportamento tipo depressivo induzido por administração de lipopolissacarídeo (LPS)

Há diversos métodos para induzir comportamento tipo depressivo em murinos, os quais contribuem tanto para o melhor entendimento da fisiopatologia da doença, quanto para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Becker; Pinhasov; Ornoy, 2021).

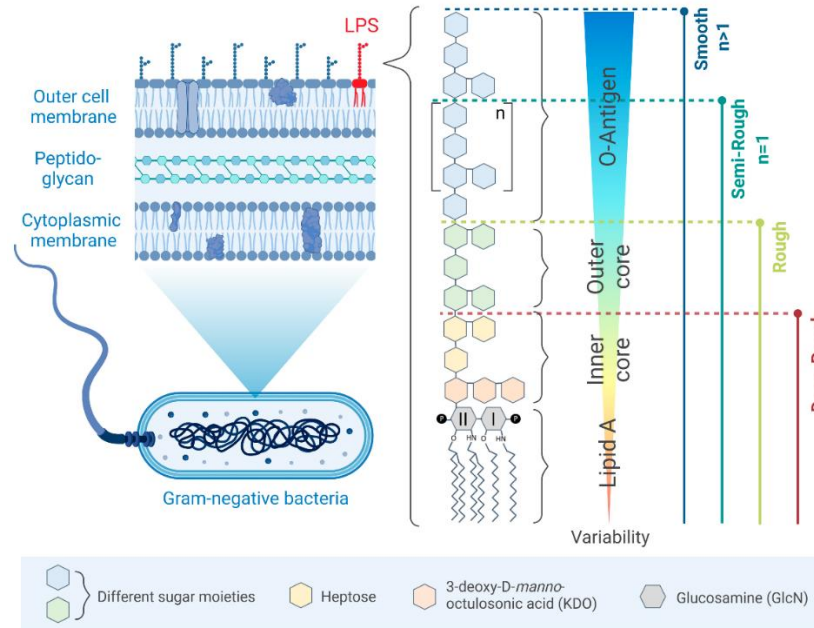
Alguns métodos se baseiam em expor o animal a situações estressantes, tais como o modelo de separação materna, isolamento social, desamparo aprendido, estresse crônico de derrota social e estresse crônico moderado e imprevisível (Kandemir, 2023). Há também alternativas cirúrgicas como a bulbectomia olfatória, ou mesmo a utilização de camundongos geneticamente modificados (Becker; Pinhasov; Ornoy, 2021). Outros métodos adotam a administração de compostos como corticosterona, reserpina ou LPS (Kandemir, 2023).

#### 1.10.1 Estrutura do LPS

O LPS é um dos componentes principais da parede celular de bactérias gram-negativas, além de ser encontrado associado a vesículas de membrana externa (OMV) que estas secretam (Furuyama; Sircili, 2021). Como componente da parede celular, é essencial para a manutenção da integridade e proteção do microrganismo (Lorenzo *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o termo LPS refere-se a um conjunto de moléculas que compartilham a mesma característica estrutural, composta por três regiões principais (figura 1): lipídeo A, porção mais interna, conservada e lipofílica, ancorada à membrana externa da bactéria; o núcleo formado por oligossacarídeos; e a porção mais externa denominado O-antígeno, que é hidrofílica e possui alta diversidade entre espécies e sorotipos (Lorenzo *et al.*, 2021). Além da sua estrutura ser diferente entre os sorotipos existentes da mesma espécie, as moléculas de LPS presente em uma única célula possui heterogeneidade que podem responder a mudanças ambientais (Fux *et al.*, 2023).

**Figura 1 – Ilustração esquemática da estrutura do lipopolissacarídeo.** A imagem mostra as três regiões principais do LPS: lipídeo A, núcleo de oligossacarídeos e O-antígeno.



Fonte: Fux *et al.* (2023)

5

O LPS, quando reconhecido pelos receptores presentes na célula hospedeira, é responsável por gerar uma cascata de reações que ativam o sistema imune do hospedeiro, o que leva à liberação de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e o acúmulo de radicais livres como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Skrzypczak-Wiercioch; Salat, 2022). E, por conta dessa característica imunogênica, também é chamado de endotoxina.

10

### 1.10.2 Resposta da imunidade inata à exposição de LPS

O principal receptor do LPS em mamíferos é uma proteína transmembrana exposta na superfície extracelular, chamada receptor *Toll-Like 4* (TLR4). O LPS, ao se ligar a esse receptor, leva a reações que ativam diversos fatores de transcrição necessários para a expressão de mediadores inflamatórios (Mazgaeen; Gurung, 2020).

15

Dessa forma, após algumas horas, o animal passa a manifestar o comportamento doentio (do inglês *sickness behavior*), caracterizado por letargia, sonolência e diminuição do apetite, presente em vertebrados em geral como sinais inespecíficos de infecção (Choe, 2019).

20

As manifestações fisiológicas da resposta ao LPS se sobrepõem a algum dos sintomas da depressão em humanos, assim, sendo considerados como

comportamento tipo-depressivo. Além disso, na literatura são reportados manifestação de sintomas semelhantes a ansiedade e problemas cognitivos, observado tanto em camundongos quanto em humanos (Lasselin *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2022).

5

### **1.10.2 Comportamento tipo depressivo induzido pela administração de LPS**

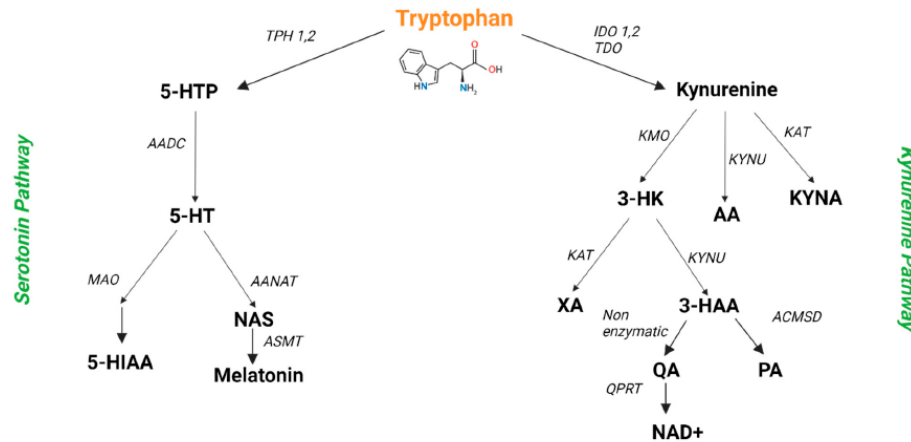
Os modelos animais para o estudo da depressão humana não possuem objetivo de simular por completo todos os aspectos do transtorno, mas de responder perguntas associados a um determinado aspecto do transtorno. Assim, o modelo de comportamento tipo depressivo induzido por LPS é usado comumente para estudo da depressão associada a inflamação, assim como modelo para entender seus mecanismos e avaliação do efeito de candidatos à antidepressivos (Nakagawasai *et al.*, 2024).

Na literatura, há diversos métodos utilizados para indução do comportamento tipo depressivo por meio do desafio com LPS, que varia desde o local de aplicação da endotoxina (intraperitoneal ou no próprio cérebro), o regime de administração (dose única ou múltipla), concentração da endotoxina, o sorotipo do microrganismo do qual o LPS é extraído, sem contar nas diversas linhagens e idade dos animais de experimentação utilizados. Além disso, o momento da avaliação do comportamento tipo depressivo também pode ter diferença: a avaliação pode ocorrer na fase aguda, geralmente no ponto de 24h a 48h; ou pode-se observar efeitos a longo prazo da administração do LPS (Nakagawasai *et al.*, 2024). Consequentemente, resultados diferentes são reportados na literatura.

A via inflamatória ativada pela exposição ao LPS é um dos processos importantes para a mudança de comportamento dos animais e acredita-se que a manifestação do comportamento tipo depressivo provocado pela administração de LPS esteja, pelo menos em parte, relacionada ao metabolismo de triptofano (Trp), um aminoácido essencial obtido por meio da dieta entre os mamíferos (Correia; Vale, 2022).

O aumento das citocinas pró-inflamatórias provocado pela resposta ao LPS causa uma maior ativação da enzima-chave da via da quinurenina (Kyn), a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), resultando no aumento da produção de quinurenina em detrimento da serotonina (Zhao *et al.*, 2019b) (Figura 2):

**Figura 2 – Vias principais de metabolização do aminoácido triptofano em mamíferos.** A imagem mostra a via da serotonina e a via da quinurenina.



Fonte: Correia e Vale, 2022.

- 5 Legenda: **TPH**: Triptofano hidroxilase; **5-HTP**: 5-hidroxitriptofano; **AADC**: enzima hidroxitriptofano descarboxilase; **5-HT**: serotonina; **MAO**: enzima monoamina oxidase; **5-HIAA**: ácido 5-hidroxi-indolacético; **AANAT**: enzima serotonina N-acetiltransferase; **NAS**: N-acetilserotonina; **ASMT**: enzima *serotonina* metiltransferase; **IDO**: indoleamina 2,3-dioxigenase; **TDO**: triptofano 2,3-dioxigenase; **KMO**: quinurenina-3-monooxigenase; **3-HK**: 3-hidroxiquinurenina; **KAT**: quinurenina amitrotransferase; **XA**: ácido xanturênico; **KYNU**: enzima quinureninase; **3-HAA**: 3-hidroxi-antranílico;
- 10 **QA**: ácido quinolínico; **QPRT**: quinolinato fosforibosil transferase; **NAD+**: dinucleotídeo de nicotinamida adenina; **ACMSD**: aminocarboximuconato; **PA**: ácido picolínico; **KAT**: enzima quinurenina aminotransferase; **KYNA**: ácido quinurênico;

15 A quinurenina, diferente da serotonina, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Assim, a quinurenina produzida periféricamente pode chegar ao SNC (Johnston *et al.*, 2023). Uma vez no SNC, a quinurenina pode ser convertida em ácido quinurênico (KYNA) pelos astrócitos, exercendo função neuroprotetora, ao passo que a micróglia possui enzimas distintas que favorecem a

20 produção de ácido quinolínico (QA) e 3-hidroxiquinurenina (3-HK), que podem causar danos por excitotoxicidade (Brown; Huang; Newell, 2021). Acredita-se que alterações nesse balanço possam causar mudanças no comportamento do animal (Mithaiwala *et al.*, 2022). É interessante ressaltar que em estudos clínicos, níveis aumentados de ácido quinolínico é observado no plasma de pacientes depressivos

25 (Paul *et al.*, 2022).

Ainda, o desafio com LPS provoca alteração em outras vias de neurotransmissão, como redução no receptor de dopamina-3, já reportado como uma das possíveis causas dos sintomas de anedonia em pacientes depressivos (Wang *et al.*, 2018). Dessa forma, essas características corroboram com a validade

30 do modelo de indução de comportamento tipo depressivo por administração de LPS.

### 1.11 Testes comportamentais em modelos murinos de comportamento tipo depressivo

Modelos animais são essenciais para o estudo translacional em diversas áreas, incluindo a neurociência, e se baseiam na validade aparente (habilidade em mimetizar os sintomas), validade de construto (capacidade de reprodução de aspectos biológicos da doença) e validade preditiva (aptidão em mostrar respostas aos agentes terapêuticos) (Demin *et al.*, 2019). Entretanto, se tratando de transtorno psiquiátrico, que envolve avaliações subjetivas e ausência de marcadores biológicos, é inegável a inviabilidade de desenvolvimento de modelos que englobam todos os aspectos biopsicossociais associados a doenças humanas (Nunes; Hallak, 2014). Assim, não é possível avaliar determinados sintomas da depressão humana em modelos animais, como a ideação suicida, tentativas de suicídio e o sentimento de culpa ou inutilidade (Becker; Pinhasov; Ornoy, 2021). Contudo, outras alterações podem ser observadas e mensuradas, como anedonia, desesperança, alterações na motivação, na atividade exploratória e nos padrões de sono. Assim, os estudos pré-clínicos utilizam a combinação de diversos testes comportamentais para avaliação do potencial antidepressivo de um determinado composto.

#### 1.11.1 *Despair-like behavior*

Um dos aspectos comportamentais avaliados nos animais no campo da pesquisa sobre a depressão é chamado de comportamento do tipo desesperança, do inglês *despair-like behavior*. Os testes com tal finalidade consistem geralmente em submeter o animal a uma situação aversiva e sem possibilidade de fuga, a fim de avaliar o tempo gasto pelo animal em tentativa de escapar daquela condição (Gencturk; Unal, 2024).

O teste de nado forçado (FST) foi desenvolvido como método para testar medicamentos candidatos a antidepressivos por Porsolt e colaboradores, sendo um dos testes mais comuns para avaliação do comportamento tipo depressivo em modelo murino. Neste teste, o animal é colocado em um recipiente cilíndrico transparente preenchido com água e é filmado durante 6 minutos por uma câmera (Becker; Pinhasov; Ornoy, 2021) (figura 3). A tendência inicial da resposta do animal consiste em movimentos vigorosos, como nado ou tentativa de escalar, até que os

animais passam por períodos de imobilidade. O tempo de imobilidade, ou seja, o tempo gasto pelo animal apenas flutuando com a cabeça sobre a água é contabilizado e usado para indicar o comportamento do tipo desesperança (Huang *et al.*, 2022).

5

**Figura 3 – Teste de nado forçado em camundongos.** A imagem mostra um camundongo durante o teste de nado forçado.



10

Fonte: Imagem de autoria própria

### 1.11.2 Comportamento tipo anedonia

A anedonia, um dos sintomas centrais do transtorno depressivo, que se refere à perda de capacidade de sentir satisfação ou motivação na execução de atividades prazerosas, pode ser avaliada no modelo animal por meio da oferta simultânea de solução ou alimento mais palatável e menos palatável (Gencturk; Unal, 2024). A preferência dos animais pelo consumo do suprimento mais palatável é calculada e interpretada como a capacidade de busca por atividade prazerosa (Verharen *et al.*, 2023). Dessa forma, o comportamento tipo anedonia é identificado por meio da diminuição ou ausência dessa preferência.

Um dos testes mais comuns nesse contexto é o teste de preferência por sacarose (SPT), que é baseado na preferência natural que os roedores têm pelo sabor doce (Gencturk; Unal, 2024). Nesse ensaio, os animais são expostos simultaneamente a dois bebedouros: um contendo apenas água filtrada, e outro com água adoçada. O consumo do líquido de cada bebedouro é mensurado durante alguns dias, para determinar o grau de preferência. Apesar de demandar tempo para a realização do teste, já que há necessidade de verificar o consumo basal e treinamento dos animais, tem como vantagem a menor exposição dos animais a situações estressantes (Hao *et al.*, 2019).

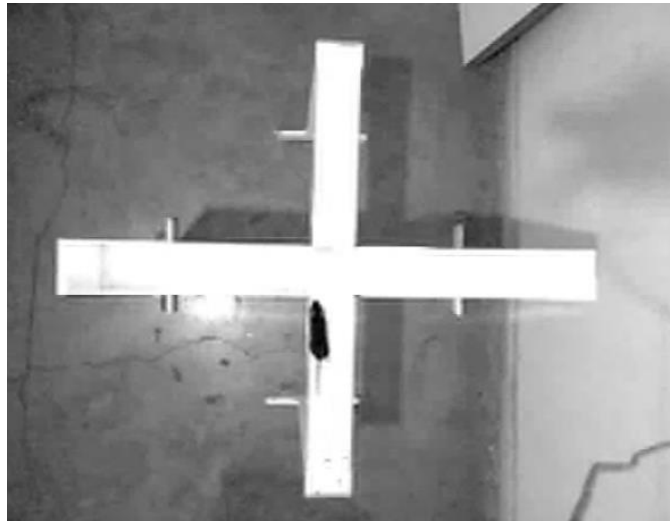
### 1.11.3 Comportamento tipo ansioso

A ansiedade corresponde a antecipação de risco ou perigo imaginado ou real, sendo um fenômeno adaptativo que contribui para a sobrevivência do animal, mas que quando ocorre de forma desproporcional em intensidade e/ou duração, afetando o funcionamento do indivíduo, deve ser vista como patológica (Penninx *et al.*, 2021). O transtorno ansioso é um dos transtornos psiquiátricos que mais ocorre como comorbidade do transtorno depressivo, sendo importante no esquema terapêutico (Penninx *et al.*, 2021).

Os testes desenvolvidos para a avaliação do comportamento tipo ansioso podem se basear em respostas condicionadas, quando o animal é exposto a um estímulo aversivo, como choque elétrico ou exposição a odor de predadores, por exemplo (Acikgoz; Dalkiran; Dayi, 2022). Ainda, pode se basear no conflito entre a curiosidade inata do animal em explorar ambientes novos em busca de recursos, e a preferência de permanecer em locais escuros e fechados evitando possíveis ameaças (Becker; Pinhasov; Ornoy, 2021).

Um dos testes que explora essa característica comportamental é o teste de labirinto em cruz elevado (EPM). Como o nome indica, o animal é colocado em um aparato em forma de cruz, elevada do piso, na qual dois dos braços possuem paredes fornecendo abrigo, enquanto outros dois braços são abertos (figura 4). A frequência da entrada e o tempo de permanência em cada tipo de braço é contabilizado e comparado, na qual o animal com maior grau de ansiedade tende a permanecer por maior tempo nos braços fechados (Guest, 2019). Já o número de entrada nos braços fechados é usado como parâmetro para verificar se a atividade locomotora está preservada nos animais (Walf; Frye, 2007). É um teste rápido, sem necessidade de treinamentos prévios para ser realizado.

**Figura 4 – Aparato do teste de labirinto em cruz elevado.** A imagem mostra o aparato em forma de cruz, utilizado neste teste.



5

Fonte: Imagem de autoria própria

Dessa forma, esse teste tem aplicação para avaliação de efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos de um determinado composto. Além disso, pode ser empregado para estudo da região límbica, hipocampo, amígdala e núcleo dorsal do rafe (Walf; Frye, 10 2007).

#### **1.11.4 Locomoção e atividade exploratória**

O teste de campo aberto (OFT), por sua vez, avalia a locomoção e a atividade exploratória do animal, além de poder ser usado para mensurar o comportamento 15 tipo ansioso por meio da observação da preferência do animal em permanecer em contato com algum objeto sólido (tigmotaxia), nesse caso, de se manter próximo as paredes do aparato (Gencturk; Unal, 2024).

Por meio do OFT, é possível averiguar se a atividade motora do animal encontra-se preservada. A maioria dos testes comportamentais envolvem atividade 20 motora do animal. Assim, por meio do OFT, é possível avaliar se a mudança no comportamento foi devido ao desafio proposto, ou se foi causado em consequência do déficit locomotor (Yu *et al.*, 2022). Devido a essa natureza, teste de campo aberto (OFT) é comumente empregado em conjunto com outros testes comportamentais.

Esse teste é realizado em um aparato com paredes cercando uma área 25 arredondada ou quadrangular (Himanshu *et al.*, 2020) (figura 5). A distância percorrida e o tempo em movimento podem ser usadas para a avaliação da atividade locomotora e atividade exploratória, enquanto a evitação pela área central

do aparato pode ser usada para inferir o comportamento tipo ansioso (Huang *et al.*, 2022).

- 5 **Figura 5 – Aparato do teste de campo aberto.** A imagem mostra o aparato de teste de campo aberto em formato circular. Além deste, pode ser utilizado aparatos em formato quadrado.



Fonte: Imagem de autoria própria

#### 10 1.11.5 Cognição

Apesar da maior atenção dirigida para os sintomas relacionados ao humor, podem ocorrer alterações cognitivas tanto na atenção quanto na memória no transtorno depressivo (Prévot; Sibille, 2020).

- 15 Existem, na literatura, inúmeros testes para a avaliação da cognição e memória de diversos tipos. Entre eles, o teste de labirinto em Y (YMT) é empregado para a avaliação da memória de trabalho e memória espacial (Guest, 2019). Esse teste é conduzido em um aparato com 3 braços formando um Y (Figura 6), na qual os animais são permitidos a explorar livremente o labirinto durante alguns minutos (Kim *et al.*, 2023).

- 20 Para a avaliação da memória, o critério considerado é a porcentagem de alternância entre os braços, já que os animais possuem menor tendência a explorar o braço mais recentemente visitado (Kim *et al.*, 2023). É um teste rápido, sem necessidade de treinamento do animal e sem exposição do animal ao estresse intenso.

**Figura 6 – Teste de labirinto em Y.** A imagem mostra o aparato em forma de Y utilizado no teste de labirinto em Y.



Fonte: Imagem de autoria própria

## 2. JUSTIFICATIVA

A depressão é um transtorno debilitante que atinge cerca de 280 milhões de pessoas no mundo. Apesar da sua alta prevalência, aproximadamente um terço dos pacientes não responde aos tratamentos farmacológicos convencionais. Os antidepressivos tradicionais apresentam efeitos adversos imediatos e demoram a produzir efeitos terapêuticos. Essa situação, somada à necessidade frequente de ajustes de doses ou troca de medicamentos, dificulta a adesão ao tratamento. Além disso, a alta taxa de recorrência dos episódios depressivos e sua comorbidade com outros transtornos psiquiátricos complicam ainda mais o manejo deste transtorno.

Nesse contexto, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras é essencial. A bactéria *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> é uma linhagem probiótica brasileira estudada pelo nosso grupo de pesquisa, que tem demonstrado, em diversos estudos pré-clínicos, ação imunomoduladora e indícios de efeitos sobre o SNC. Já a *Lactobacillus rhamnosus* (64) é uma linhagem com potencial probiótico, também estudado pelo nosso grupo de pesquisa, que demonstrou efeitos sobre a cognição em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Diante da alta prevalência do transtorno depressivo na população, das dificuldades no tratamento e do risco associado ao suicídio, torna-se essencial a busca por novas opções terapêuticas. Neste trabalho proposto, a hipótese é que a administração dessas linhagens bacterianas pode modular a microbiota intestinal, de forma a reduzir os sintomas depressivos por meio do eixo microbiota-intestino-cérebro. Assim, a proposta é avaliar se esses agentes podem oferecer uma abordagem terapêutica complementar, mais segura e eficaz para o tratamento da depressão.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

5 Avaliar o potencial psicobiótico de *B. longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> e *L. rhamnosus* (64) em camundongos com comportamento tipo depressivo induzido pela administração intraperitoneal de LPS.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 10 • Definir a dose de LPS para indução do comportamento tipo depressivo em animais C57BL/6 machos e fêmeas.
- Verificar se a administração de *B. longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> ou *L. rhamnosus* (64) é capaz de suprimir a manifestação do comportamento tipo depressivo em camundongos machos e fêmeas desafiados com LPS;
- 15 • Avaliar os efeitos da administração de *B. longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> ou *L. rhamnosus* (64) sobre o baço, sobre os níveis de AGCC e lactato no conteúdo do ceco e sobre níveis de BDNF no hipocampo e no soro.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismos

A bactéria B5<sup>1A</sup> foi cultivada em caldo de *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) enriquecida com L-cisteína (0,05%) e incubada a 37°C durante 48h, sem agitação, em uma câmara de anaerobiose contendo uma atmosfera de 80% de nitrogênio (N<sub>2</sub>), 10% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e 10% de hidrogênio (H<sub>2</sub>). Já a L64 foi cultivada em caldo MRS e incubada a 37°C durante 24h, sem agitação, em aerobiose. A concentração atingida pela cultura foi estimada por meio da contagem em placas no ágar MRS, expressa em Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL).

10

### 4.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) convencionais livres de germes patogênicos específicos (SPF), da linhagem C57BL/6, com 8 semanas de idade, de ambos os sexos. Embora a depressão seja mais comum em indivíduos do sexo feminino, a maior parte dos estudos do comportamento tipo-depressivo em camundongos submetidos a administração de LPS é realizada em machos. Dessa forma, optamos pela utilização de animais de ambos os sexos no trabalho.

15

Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UFMG com 5 semanas de idade, e aclimatados durante 3 semanas no “Biotério NB2 do Departamento de Microbiologia Prof.<sup>a</sup> Erna Geessien Kroon”, nível de biossegurança 2 (NB2), onde foram mantidos durante todo o período experimental, com um ciclo diurno/noturno de 12 horas, bem como controle de aeração, umidade (60-80%) e temperatura (22±1°C) monitorados por um termohigrômetro.

20

Os animais foram alojados em mini-isoladores modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), forrados com maravalha, com disponibilidade de ração sólida (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, Paraná, Brasil) irradiada e água filtrada *ad libitum*.

25

A limpeza das gaiolas, a reposição da água e ração, assim como a manipulação dos animais para a administração da bactéria e LPS foram realizadas sempre pelas mesmas experimentadoras, a fim de evitar interferências no comportamento dos animais.

30

O planejamento estatístico para a determinação do tamanho amostral foi realizado utilizando o programa G\*Power versão 3.1.9.7 para Windows, com base

em estudos prévios. O cálculo foi realizado considerando o tempo de imobilidade no teste de nado forçado por esse parâmetro apresentar a maior variação nos experimentos, além de ser padrão ouro para a avaliação do comportamento tipo depressivo.

5

### 4.3 Administração da bactéria

A cultura fresca de B5<sup>1A</sup> ou L64 foi centrifugada a 6000 RPM durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de solução salina (0,9%) esterilizada, a fim de atingir a concentração de 10<sup>10</sup> UFC/mL.

10 Cada animal recebeu 100 µL desta solução por dia, via gavagem, na qual o animal foi imobilizado e uma cânula foi inserida pelo canto da boca e o conteúdo dispensado no estômago.

### 4.4 Desafio com LPS

15 A endotoxina usada nos experimentos foi o LPS extraído e purificado da *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). Devido à propriedade de adsorção do LPS à superfície de plástico e vidro, principalmente em concentrações menores que 0,1 mg/mL, o preparo da solução com LPS na concentração desejada foi realizada momentos antes da administração aos animais.

20 Dessa forma, a cada experimento, o liofilizado foi pesado em microtubo de plástico e inicialmente dissolvido em solução salina (0,9%) esterilizada a fim de atingir uma concentração de 1 mg/mL, que segundo o fabricante, pode ter a propriedade de adsorção desprezada. A partir dessa solução inicial, diluições para atingir a concentração desejada foram realizadas e imediatamente administradas aos  
25 animais por injeção intraperitoneal (i.p.).

### 4.5 Avaliação do escore clínico

Para avaliação dos sinais clínicos, foi utilizado o método descrito por Murray *et al.* (2017), na qual foram observadas quatro características listadas na tabela 3, com pontuação ocorrendo pela ausência (0) ou presença (+1) de cada uma destas.  
30 Ou seja, a pontuação variou de 0 (ausência de todos os sinais) a 4 (presença de todos os sinais).

**Tabela 3 – Sinais utilizados para avaliação do escore clínico nos animais.** A avaliação do escore clínico foi realizada baseada em quatro parâmetros: piloereção, ptose, letargia e postura do animal.

Sinais	Caracterização
Piloereção	Pelos eretos involuntariamente, provocando impressão do animal estar inchado.
Ptose	Olhos fechados parcialmente ou completamente, com possível presença de secreção.
Letargia	Prejuízo observado na atividade do animal como locomoção lenta e/ou diminuída, ou falta de resposta a estímulos.
Postura curva	Postura do animal curvada, provocando impressão do animal estar em forma de bola

5 Fonte: adaptado de Murray *et al.* (2017)

## 4.6 Delineamento experimental

### 4.6.1 Experimento 1: Padronização da dose de LPS

10 Para determinar a dose ideal para indução do comportamento tipo depressivo nos animais, foi realizado um experimento piloto em camundongos machos. Foram testadas três doses diferentes de LPS: 1,5 mg/Kg, 3,0 mg/Kg e 5,0 mg/Kg.

Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos (tabela 4), com número amostral de 7 a 8 animais por grupo.

15 **Tabela 4 – Grupos e seus respectivos tratamentos no estudo piloto.** Neste experimento, foram utilizados apenas machos a fim de investigar a dose ideal para indução do comportamento tipo depressivo nos animais, baseada em literatura.

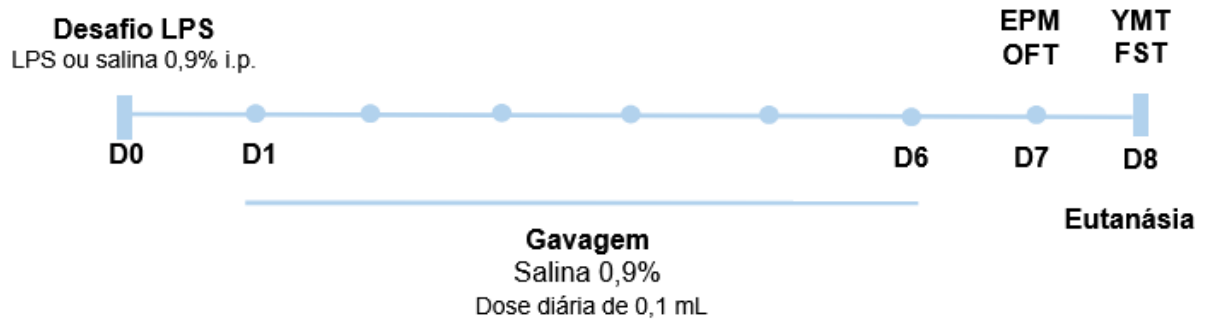
Grupos	Tratamento
CTL	Salina i.g. + Salina i.p.
LPS 1,5	Salina i.g. + LPS 1,5 mg/Kg i.p.
LPS 3,0	Salina i.g. + LPS 3,0 mg/Kg i.p.
LPS 5,0	Salina i.g. + LPS 5,0 mg/Kg i.p.

20 Fonte: Elaborada pela autora

Os testes realizados no piloto foram o labirinto em cruz elevado (EPM), teste de campo aberto (OFT), teste de labirinto em Y (YMT) e nado forçado (FST), conforme a figura 7.

25

**Figura 7 – Desenho experimental do estudo piloto.** O experimento teve duração de oito dias, no qual os testes comportamentais foram realizados a partir do 7º dia após o desafio com LPS.



5

Fonte: Elaborada pela autora

Após isso, uma série de experimentos foram realizados para ambos os sexos, com algumas modificações no desenho experimental, especificadas nos próximos tópicos.

10

#### 4.6.2 Experimento 2: Avaliação do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> em machos

Para a avaliação do potencial psicobiótico em camundongos machos, os animais foram divididos nos seguintes grupos (tabela 5):

15

**Tabela 5 – Grupos e seus respectivos tratamentos no estudo do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> em machos.**

Grupos	Tratamento
CTL	Salina i.p. + Salina i.g.
LPS	LPS 1,5 mg/Kg i.p.+ Salina i.g.
LPS+B5 <sup>1A</sup>	LPS 1,5 mg/Kg i.p + B5 <sup>1A</sup> i.g.
B5 <sup>1A</sup>	Salina i.p. + B5 <sup>1A</sup> i.g.

20

Elaborada pela autora

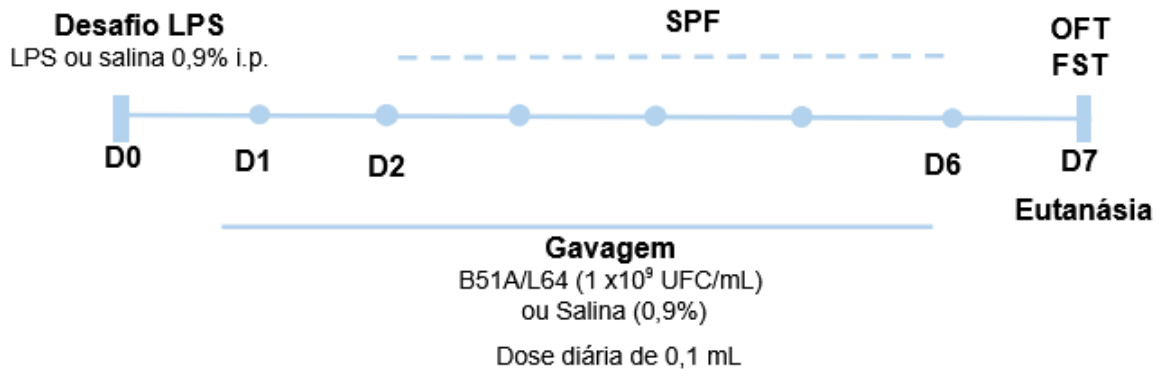
Já o desenho experimental sofreu algumas adaptações a partir daquele utilizado no experimento piloto, como mostra a figura 8:

25

30

35

**Figura 8 – Desenho experimental do experimento de avaliação do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> em machos.** Neste experimento, o teste de preferência por sacarose (SPF) foi realizado entre o 2º dia e 6º dia após o desafio com LPS, enquanto que os testes de campo aberto e nado forçado foram realizados no 7º dia (seguida de eutanásia). A gavagem foi realizada entre o 1º dia a 6º dia após o desafio com LPS.



Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.6.3 Experimento 3: Avaliação do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> e L64 em fêmeas

Excepcionalmente neste experimento, uma outra espécie de bactéria, denominada *Lactocaseibacillus rhamnosus* (64) (L64), isolada de leite materno de mães com índice de massa corporal (IMC) normal, foi testada nesse modelo devido aos resultados promissores observados em estudos anteriores (Costa, 2024). É importante ressaltar que apesar de termos optado por apresentar os resultados de forma segregada entre os camundongos tratados com B5<sup>1A</sup> e aqueles tratados com L64, a maior parte dos grupos CTL e LPS foram compartilhadas entre os experimentos, que ocorreram de forma concomitante (Tabela 6).

**Tabela 6 – Grupos e seus respectivos tratamentos do estudo do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> e L64 em fêmeas.**

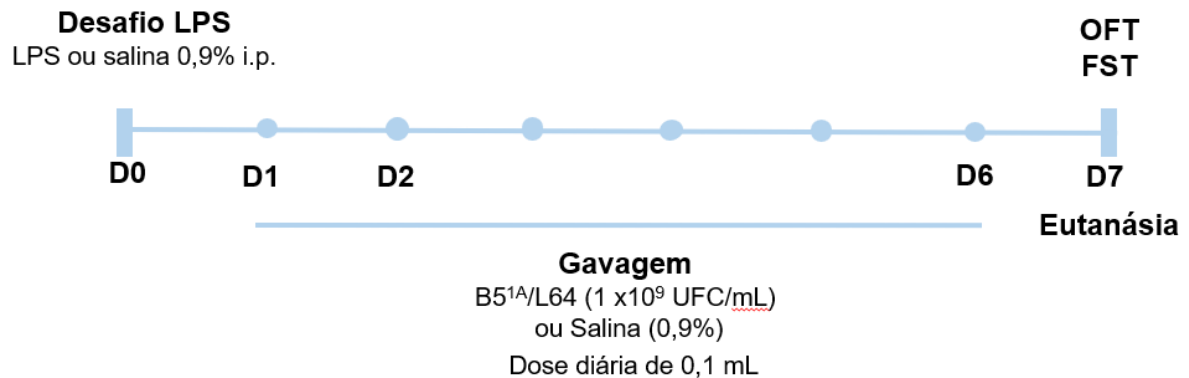
Grupos	Tratamento
CTL	Salina i.p. + Salina i.g.
LPS	LPS 1,5 mg/Kg i.p.+ Salina i.g.
LPS+B5 <sup>1A</sup>	LPS 1,5 mg/Kg i.p + B5 <sup>1A</sup> i.g.
B5 <sup>1A</sup>	Salina i.p. + B5 B5 <sup>1A</sup> i.g.
LPS+L64	LPS 1,5 mg/Kg + L64 i.g.
L64	Salina i.p. + L64 i.g.

Fonte: elaborada pela autora

Em relação ao desenho experimental, as primeiras duas rodadas do experimento contaram com os testes comportamentais EPM no 6º dia após o

desafio com LPS, como um estudo piloto. Após isso, as outras duas rodadas seguiram o seguinte desenho experimental (figura 9):

- 5 **Figura 9 – Desenho experimental de avaliação do potencial psicobiótico de B51A e L64 em fêmeas.** Neste experimento, os testes de campo aberto e nado forçado foram realizados no 7º dia, seguida de eutanásia. A gavagem foi realizada entre o 1º dia a 6º dia após o desafio com LPS.



Fonte: Elaborada pela autora

10

#### 4.7 Massa corporal e consumo de alimentar

Os animais e a ração foram pesados diariamente durante o período experimental, usando uma balança digital.

#### 15 4.8 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados no Laboratório de Neuropsicofarmacologia (LNP), localizado no Bloco A3 sala 162 do ICB, UFMG, em salas climatizadas e sem ruídos. Os animais foram aclimatados durante 1h antes da execução dos testes.

20

##### 4.8.1 Campo aberto (OFT)

O teste foi realizado como descrito por Ribeiro e colaboradores (2023), a fim de avaliar a atividade de locomoção e exploração do animal. Assim, o animal foi colocado no centro de um aparato circular de acrílico com 40 cm de diâmetro, cercada de parede de 50 cm de altura. A sua atividade foi monitorada por uma câmara acoplada sobre o aparato, durante 30 minutos. O parâmetro considerado foi o total de distância percorrida em metros (m). A gravação foi analisada por meio do software ANY-maze Video Tracking System Software (version 5.26, Stoelting®,

25

Estados Unidos). A cada teste, o aparato foi higienizado com etanol 30% para evitar interferência por odores.

#### **4.8.2. Nado forçado (FST)**

5 O teste foi baseado no método apresentado por Porsolt, Bertin e Jalfre (1978), com algumas modificações. Cada animal foi colocado em um béquer de vidro transparente com capacidade de 5L, preenchido com água até a marca dos 4L. O teste consistiu em 2 minutos de pré-teste, seguida de 4 minutos de avaliação de tempo de imobilidade, determinada como ausência de qualquer movimento, exceto o  
10 suficiente para manter a cabeça emersa sob a água. A cada animal, os frascos foram esvaziados e higienizados. A temperatura da água foi padronizada em aproximadamente 27°C. O tempo e a frequência de imobilidade foram contabilizados manualmente, por único indivíduo que desconhecia os tratamentos aplicados, com auxílio do programa X-PlorRat.

15

#### **4.8.2 Labirinto em cruz elevado (EPM)**

O teste foi realizado como descrito por Lister (1987), com algumas modificações. O aparato, confeccionado em acrílico de cor branca, possuía as seguintes medidas: 50 cm de altura do piso, com os braços medindo 30 cm de comprimento e 5 cm de largura, com área central medindo 5 cm<sup>2</sup>. O animal foi  
20 colocado no centro do aparato, com a cabeça virada para um dos braços abertos e a sua atividade foi monitorada durante 5 minutos por uma câmera acoplada sobre o aparato. A gravação foi analisada por meio do software ANY-maze Video Tracking System Software (version 5.26, Stoelting®, Estados Unidos). A cada teste, o aparato  
25 foi higienizado com etanol 30% para evitar interferência por odores.

#### **4.8.3 Teste de preferência por sacarose (SPF)**

O teste foi realizado como descrito por Pimenta *et al.* (2023), a fim de avaliar o comportamento tipo anedonia. O teste consistiu em dois dias de pré-teste, com  
30 disposição de duas garrafas de modelo igual em cada gaiola, ambas contendo água filtrada; seguidas de três dias de teste, na qual o conteúdo de uma das garrafas foi substituído por água filtrada com adição de sacarose na concentração de 2% (p/v).

Durante os três dias de teste, a posição das garrafas foi trocada diariamente, a fim de evitar preferência por local.

O consumo de água foi registrado diariamente e a preferência por água contendo sacarose foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Preferência por sacarose} = \frac{\text{ingestão de água contendo sacarose (mL)}}{\text{ingestão total de líquido (mL)}} \times 100$$

#### 4.8.4 Teste de labirinto em Y (YMT)

O teste foi realizado como descrito em um estudo anterior (Ribeiro *et al.*, 2023). Utilizamos um aparato cinza com 3 braços (nomeados A, B e C), com um ângulo de 120° entre todos os braços (medida: 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e cercadas por paredes com 20 cm de altura). O animal foi colocado na porção distal do braço A para explorar livremente o aparato durante 8 minutos, observado por uma câmera acoplada. A gravação foi analisada manualmente, adotando como o critério de entrada a presença das 4 patas do animal dentro da área do braço.

O percentual de alternância entre os braços foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ de alternância} = \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ de alternâncias}}{\text{n}^\circ \text{ total de entrada em um braço} - 2} \right) \times 100$$

#### 4.9 Dosagem de imunoglobulina A secretora (sIgA) no conteúdo intestinal

IgA secretora (sIgA) é um anticorpo polimérico predominante na secreção das mucosas, que protege, entre outros sítios, a barreira intestinal contra a adesão e penetração de patógenos, além de regular a composição da microbiota (Pirtrazak *et al.*, 2020). Dessa forma, a coleta e a dosagem foram realizadas seguindo o método descrito por Martins *et al.* (2009).

##### 4.9.1 Coleta

O conteúdo intestinal de cada animal foi coletado em tubo cônico para centrífuga de 15 mL e pesado. Para cada 500 mg de conteúdo intestinal, foi adicionado 2 mL de solução PBS 1X (pH 7,2) refrigerado contendo inibidores de protease (1 µM de aprotinina, 25 µM de leupeptina, 1 µM de pepstatina e 1 µM de fluoreto de fenilmetanosulfonil). Após a homogeneização, as amostras foram

centrifugadas a 9.500 RPM durante 30 minutos, em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -20°C até a análise.

#### 4.9.2 ELISA

5 A dosagem foi realizada por meio da técnica de Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA) de captura, utilizando anticorpo anti-IgA de camundongo desenvolvido em cabra (M-8769, Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), padrão de IgA de purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Estados Unidos) e anticorpo anti-IgA de camundongo conjugado à peroxidase.

10 A placa foi sensibilizada com anticorpo de captura anti-IgA de camundongo (5 µg/mL), por meio da adição de 100 µL do anticorpo diluído em tampão de revestimento carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9,6). Este foi incubado *overnight* a 4°C, coberto por papel alumínio. A placa foi esvaziada e foi adicionado 200 µL da solução de bloqueio, composto por PBS 1X suplementado com tween 20 (0,05%) e

15 albumina bovina (1%). Após uma hora de incubação, a placa foi esvaziada e lavada cinco vezes com PBS tween. Em seguida, foi adicionado 100 µL do branco (PBS tween, usado como diluente), o padrão de IgA e as amostras diluídas em 1:100 em seus respectivos poços. A placa foi coberta por papel alumínio e incubada durante uma hora a temperatura ambiente. Após isso, foi lavada cinco vezes com PBS

20 tween. O anticorpo de detecção anti-IgA conjugado com peroxidase diluído em PBS tween foi adicionado no volume de 100 µL por poço e a placa foi incubada novamente durante uma hora a temperatura ambiente, seguida de lavagem por cinco vezes com o PBS tween. Finalmente, foi adicionado 100 µL do substrato de peroxidase e a placa foi vedada. Após 10 minutos de incubação em temperatura

25 ambiente, a reação foi interrompida com adição de 20 µL da solução de parada H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M). A leitura foi realizada em 492 nm, em um leitor de microplacas. A concentração de sIgA foi expresso em µg/g de fluido intestinal.

#### 4.10 Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO)

30 A peroxidase eosinofílica é um dos principais componentes de grânulos liberados pelos eosinófilos, sendo um marcador interessante para determinar a inflamação eosinofílica. Após o processamento das amostras, a atividade de EPO foi determinada por ensaio colorimétrico conforme descrito por Miranda *et al.* (2023).

#### 4.10.1 Processamento das amostras

As amostras de tecido foram pesadas e homogeneizadas em PBS 1X, respeitando a proporção de 1,9 mL de solução a cada 100 mg de tecido. Em seguida, os microtubos contendo o material foram centrifugados durante 10 minutos a 10.000 RPM na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido à lise hipotônica em 500 µL de salina a 0,2% (p/v), seguida de adição de 500 µL de salina (1,6%, p/v) suplementada com glicose (5%, p/v). Após isso, o material foi centrifugado sob as mesmas configurações de velocidade, tempo e temperatura anteriormente utilizadas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em PBS suplementado com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) a 0,5% (p/v), na proporção usada no primeiro passo. Em seguida, as amostras passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante seguiu para ensaio da quantificação de EPO em placas de 96 poços.

15

#### 4.10.2 Ensaio colorimétrico

Em cada poço, foram pipetados 75 µL de amostra ou branco (PBS/HTAB 0,5%) e 75 µL do substrato *o*-fenilenodiamina (1,5 mM) em tampão Tris-HCl (0,075 M, pH 8,0) suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6,6 mM). A placa foi incubada a 20°C na ausência da luz por 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M). A leitura ocorreu no filtro de 492 nm em um leitor de microplacas.

20

#### 4.11 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

De forma semelhante ao EPO, a MPO é um dos principais componentes contidos nos grânulos liberados por neutrófilos, sendo marcador da sua atividade, permitindo estimar a quantidade destas células no tecido de interesse.

25

O ensaio de MPO foi realizado de acordo com o método descrito por Miranda *et al.* (2023).

#### 4.11.1 Processamento das amostras

As amostras de tecido foram pesadas e homogeneizadas em um tampão contendo NaCl (0,1 M), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O (0,02 M) e Na<sub>2</sub>-EDTA (0,015 M) com pH ajustado em pH 4,7, respeitando a proporção de 1,9 mL de solução a cada 100 mg

30

de tecido. Para a homogeneização, foi utilizado o homegeneizador de tecidos TissueLyser LT (QIAGEN). O material foi centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi submetido à lise hipotônica por meio da adição de 500 µL de solução de NaCl (0,2%, p/v), seguida de adição de 500 µL de salina (1,6%, p/v) suplementada com glicose (5%, p/v). Após isso, as amostras foram centrifugadas e o precipitado ressuspendido em tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% (p/v), na proporção usada no primeiro passo. Em seguida, as amostras passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante seguiu para ensaio da quantificação de MPO em microplacas de 96 poços.

#### 4.11.2 Ensaio colorimétrico

Em cada poço, foram pipetados 25 µL de amostra ou branco (tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M) e 25 µL do substrato TMB (1,6 mM). Após incubação da placa por 5 minutos a 37°C, foi adicionado 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,002%) em cada poço e a placa foi incubada novamente, sob as mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M). A leitura ocorreu no filtro de 450 nm em um leitor de microplacas.

#### 4.12 Dosagem de N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG)

NAG é uma enzima lisossomal abundante em macrófagos ativados, assim, a sua dosagem é utilizada para estimar o recrutamento de macrófagos para o foco inflamatório.

##### 4.12.1 Processamento das amostras

Após coleta e pesagem do tecido, estes foram homogeneizados em tampão citrato/fosfato 0,1M (pH 4,5), respeitando a proporção de 100 mg de tecido para 1,9 mL de tampão. Após a centrifugação por 10 minutos a 10.000 RPM em 4°C, o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 500 µL de NaCl 0,2% (p/v) ao *pellet*, e essa mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi adicionado 500 µL de NaCl 1,6% suplementado com 5% de glicose (p/v). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante novamente descartado. Adicionou-se 800 µL da

solução salina 0,9% (p/v) acrescido de Triton x-100 0,1% (v/v) ao *pellet*. Após homogeneização e centrifugação a 3000 RPM por 10 minutos a 4 °C o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

#### 5 4.12.2 Ensaio colorimétrico

Foi adicionado 100 µL do sobrenadante a cada poço, e o branco utilizado foi o tampão citrato/fosfato. Em seguida, 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada a 37 °C durante 10 minutos. Após a adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M (pH 10,6), a placa foi lida no filtro de 400 nm em um leitor de microplacas.

### 4.13 Dosagem de neurotrofina derivada do cérebro (BDNF) no hipocampo e soro

A dosagem de BDNF foi realizado por método de ELISA, seguindo o protocolo de Fernandes *et al.* (2024). O hipocampo foi retirado e armazenado na temperatura de -80°C até o processamento. O soro foi separado do sangue por centrifugação e armazenado em -20°C até o ensaio.

#### 4.13.1 Processamento do hipocampo:

Para o processamento, foi adicionado solução de extração contendo NaCl (0,4M), 0.05% (v/v) de Tween 20, 0.5% (p/v) de albumina sérica bovina, fluoreto de fenilmetanosulfonil (0,1mM), cloreto de benzetônio (0,1mM), EDTA (0,1mM) e 20 KIU/mL de aprotinina no tubo contendo as amostras. O material foi homogeneizado utilizando Ultra-Turrax. Após centrifugação em 16.000 RPM por 20 minutos a 4°C, o sobrenadando foi coletado e armazenado a -80°C para ser aplicado no ensaio de ELISA. O resultado foi expresso em picogramas por 100 mg de tecido.

#### 4.13.2 ELISA

Em cada poço, foi adicionado 50 µL de anticorpo de captura diluído em solução de PBS 1X e albumina sérica bovina (BSA) a 0,1% (p/v) e a placa foi selada e incubada por 16h a 4°C. Após isso, o conteúdo foi dispensado e a placa lavada por três vezes com tampão de lavagem contendo PBS 1X com 0,5% (v/v) de Tween-20. O tampão de bloqueio (PBS 1X + 1 % de BSA) foi adicionado a cada poço no

volume de 200 µL e a placa foi incubada em temperatura ambiente durante uma hora. Após três lavagens com o tampão de lavagem, foram adicionados os padrões e as amostras diluídas, ambos no volume de 50 µL, e a placa foi incubada durante 16h a 4°C. A placa foi esvaziada e lavada por três vezes para a adição do anticorpo de detecção biotinilado e incubado a temperatura ambiente por 2h. Novamente, a placa foi esvaziada e lavada por três vezes, para a adição de 50 µL de estreptavidina ligado a peroxidase em cada poço. Novamente, a placa foi incubada por 30 minutos, coberta por papel alumínio. O conteúdo da placa foi descartado e seguiu a lavagem por três vezes. Em seguida, foi adicionado 50 µL da solução de o-fenilenodiamina (OPD) e a placa incubada por 30 minutos ao abrigo da luz. Finalmente, a solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M) foi adicionada no volume de 50 µL por poço e seguiu para a leitura no comprimento de onda de 490 nm em um leitor de microplacas. O resultado foi apresentado em pg/100 mg de tecido.

#### 15 **4.14 Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no conteúdo cecal**

##### **4.14.1 Processamento das amostras**

Após coleta, 100 mg do conteúdo cecal de cada animal foi ressuspensionado em 1,2 mL da fase móvel (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 M). Essa mistura foi homogeneizada durante 3 minutos no homogeneizador de tecidos TissueLyser LT (Qiagen, Alemanha). Após isso, os microtubos contendo a amostra foram centrifugadas durante 10 minutos a 10.000 RPM, e o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de acetato de celulose com diâmetro de poro medindo 0,22 µm.

##### **4.14.2 HPLC**

25 Foi seguida o método apresentado por Huda-Faujan *et al.* (2010), com modificações. Assim, aproximadamente 50 µL do filtrado foi injetado no equipamento de HPLC, com coluna de troca iônica Supelcogel C-619H 6% (59320-U, Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e detector de ultravioleta na faixa de 210 nanômetros (nm). A concentração de AGCC foi representada em µmol/g de conteúdo cecal.

30

##### **4.15 Análise estatística**

O programa GraphPad Prism versão 8.00 para Windows (GraphPadSoftware, EUA) foi usado para análise estatística dos resultados. Para a comparação entre

dois grupos, foi utilizado o teste t de Student, após a confirmação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A correção de Welch foi aplicada no teste t caso os grupos não passassem no teste de homocedasticidade. Já para a comparação entre três grupos ou mais, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), também após a confirmação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Em caso de violação da homoscedasticidade, a correção de Welch foi utilizada. Os testes utilizados na análise *post hoc* foram especificados em cada gráfico. O valor de  $p < 0,05$  foi utilizado como valor significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Experimento 1: Padronização da dose de LPS em animais C57BL/6 machos

Na literatura, o LPS utilizado apresenta variações quanto à sua origem (diferentes sorotipos de *E. coli*), concentração e esquema de administração (dose única ou repetida, pré ou pós-tratamento), além do uso de diferentes linhagens de camundongos. Esses fatores tornam a reprodução dos experimentos desafiadora e dificultam tanto a interpretação quanto a replicação dos resultados. Assim, foi necessário a realização de um experimento piloto para determinar a dose ideal de LPS capaz de induzir comportamento do tipo depressivo em camundongos C57BL/6. Utilizou-se uma dose única de LPS extraído de *E. coli* O111:B4, com esquema de tratamento após o desafio com LPS. Para isso, os animais foram distribuídos em grupos de 7 a 8 indivíduos, testando-se três concentrações: 1,5 mg/kg, com base em Murray *et al.* (2019); 5,0 mg/kg, conforme Ramalho *et al.* (2022); e uma concentração intermediária de 3,0 mg/kg.

#### 5.1.1 Avaliação do consumo alimentar, massa corporal, escore clínico e peso relativo do baço

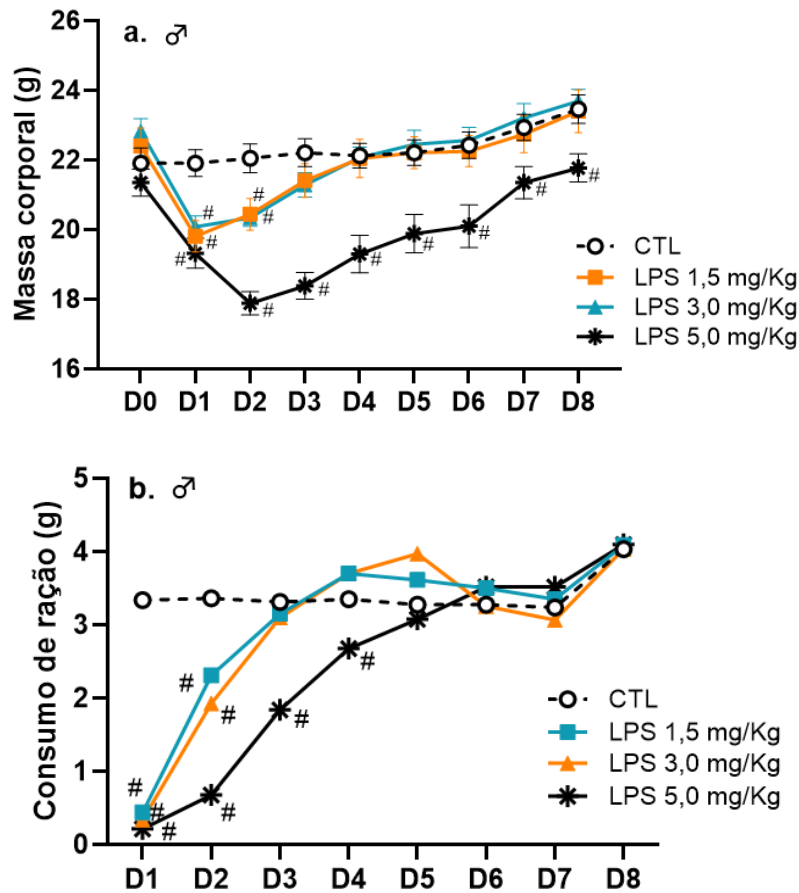
- **O desafio com LPS causa anorexia e perda de peso nos animais no experimento piloto**

É bem documentado na literatura a perda de peso e a diminuição do consumo alimentar causado por endotoxemia (Murray *et al.*, 2019). Por esta razão, esses parâmetros foram acompanhados durante todo o período experimental.

Antes do desafio com LPS (correspondente ao “D0” no gráfico), a média de peso corporal não diferiu entre os grupos, com média e desvio padrão (g): CTL – 21,91 ± 0,4299; LPS 1,5 mg/Kg – 22,40 ± 0,5233; LPS 3,0 mg/Kg – 22,83 ± 0,3550; e LPS 5,0 mg/Kg – 21,35 ± 0,3878, com  $p = 0,1093$  (ANOVA unidirecional). Dessa forma, asseguramos que os animais apresentavam condições semelhantes de massa corporal no dia da administração do LPS, garantindo assim uma comparação precisa das variações desse parâmetro ao longo do experimento.

A administração de LPS provocou uma redução significativa da massa corporal (Figura 9a) e do consumo de ração (figura 9b) nos animais tratados, em comparação ao grupo controle que recebeu aplicação de solução salina (CTL).

**Figura 9 – Acompanhamento da massa corporal e consumo de ração no estudo piloto.** O desafio com LPS em diferentes doses provocou perda de massa corporal (a) e diminuição no consumo de ração nos machos (b) desafiados com diferentes doses de LPS.



Fonte: Elaborada pela autora

O símbolo # representa diferença em relação ao grupo CTL (teste de Dunnet).  
Resultados representados em média  $\pm$  SEM.

5

10

Após 24h ("D1") da administração do LPS, houve diminuição significativa da massa corporal entre os animais desafiados com LPS em comparação com o grupo CTL, com valor de  $p < 0,05$  (teste de Dunnet) em todas as doses testadas.

Essa diferença foi revertida apenas após 72h (D3) nos grupos LPS 1,5 ( $p = 0,4226$ , teste de Dunnet) e LPS 3,0 ( $p = 0,3023$ , teste de Dunnet). Enquanto isso, os animais desafiados com dose de 5,0 mg/Kg de LPS permaneceram apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle até o último dia de pesagem ( $p = 0,0129$ , teste de Dunnet).

Quando a perda de peso foi transformada em porcentagem e cada grupo foi avaliado individualmente, temos que os grupos 1,5 mg/Kg e 3,0 mg/Kg apenas retornaram ao seu peso original ao 6º dia após desafio com LPS, com 99,36% e 98,87%, respectivamente. Já o grupo 5,0 mg/Kg atingiu seu peso original somente

20

no D7, com 100 %. Ainda, o maior pico de perda de peso ocorreu no D2 para os grupos 1,5 mg/Kg e 3,0 mg/Kg, com perda de 11,54 % e 12,02%, respectivamente; e no D3 para o grupo 5,0 mg/Kg, com perda de 16,22% em relação ao peso do D0, registrado momentos antes da administração de LPS. Enquanto isso, o grupo CTL manteve aumento de peso ao longo do experimento. Nenhum animal precisou ser eutanasiado por perda excessiva de massa corporal ( $\geq 20\%$ ).

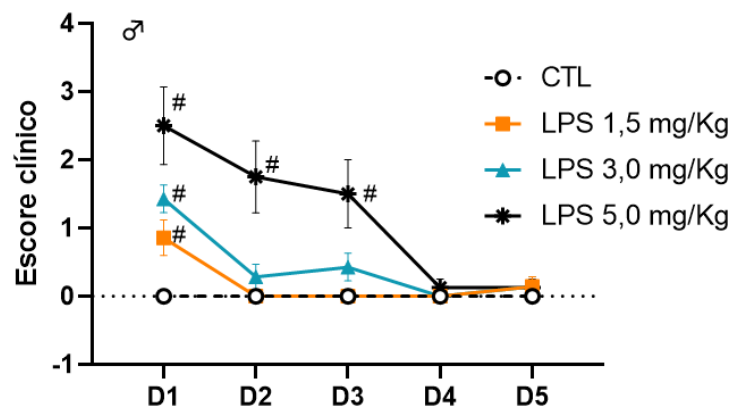
Em relação ao consumo de ração (figura 9b), todos os três grupos desafiados com LPS apresentaram diferença significativa em relação ao grupo CTL no D1, com  $p < 0,0001$  (teste de Dunnet). O grupo 1,5 mg/Kg passou a não apresentar diferença no D2 ( $p = 0,0927$ ) e o grupo 3,0 mg/Kg no D3 ( $p = 0,9493$ , teste de Dunnet). Enquanto isso, o grupo 5,0 mg/Kg passou a não apresentar diferença em relação ao grupo CTL somente no D4 ( $p = 0,3776$ , teste de Dunnet).

Dessa forma, a administração de LPS induziu anorexia acompanhada de perda de peso em todos os grupos, de forma mais acentuada e duradoura nos animais que receberam LPS na dose de 5,0 mg/Kg.

- **Desafio com LPS causa piora no escore clínico em todas as doses testadas**

A seguir, são apresentados os resultados da avaliação do escore clínico dos animais submetido a cada dose de LPS (figura 10):

**Figura 10 – Acompanhamento do escore clínico do experimento piloto.** O desafio com LPS em diferentes doses causou piora no escore clínico no estudo piloto.



25

Fonte: Elaborada pela autora  
 Legenda: # representa diferença em relação ao grupo CTL (teste de Dunnet).  
 Resultados em média  $\pm$  SEM

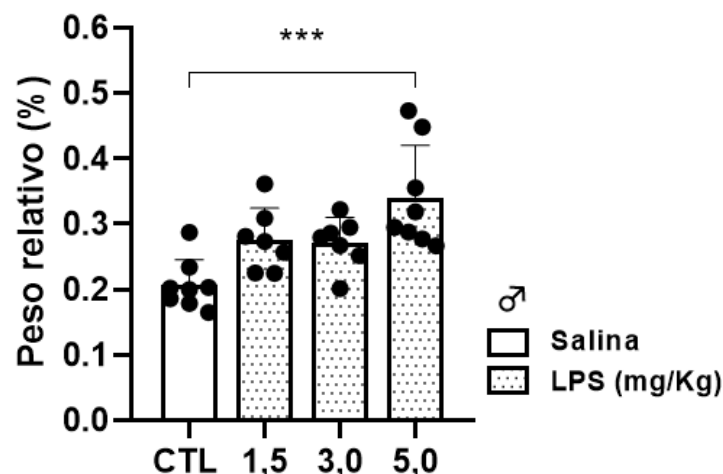
Em relação a avaliação do escore clínico, após 24h da aplicação de LPS, todos os grupos desafiados com LPS apresentaram aumento significativo da pontuação. A recuperação dos grupos 1,5 mg/Kg e 3,0 mg/Kg ocorreu rapidamente, sem diferença estatística em relação ao grupo CTL após 48h do desafio. No entanto, no grupo tratado com 5,0 mg/kg, a recuperação foi mais lenta, sendo observada apenas após 96h da administração do LPS.

Além dos parâmetros avaliados para a pontuação do escore clínico, os animais desafiados com LPS apresentaram sinais de diarreia e edema e/ou vermelhidão na região de aplicação do LPS. Especificamente no grupo que foi desafiado com 5,0 mg/Kg de LPS, foi observado que muitos animais apresentaram tremores e sinais de dor como focinho contraído, evidenciando que a piora no escore clínico ocorreu de forma dose dependente.

• **Desafio com LPS causa aumento do peso relativo do baço na dose de 5,0 mg/Kg**

O peso do baço, o maior órgão linfóide secundário, foi registrado devido à sua relação com a inflamação sistêmica. Além disso, a literatura descreve uma associação bem estabelecida entre a administração de LPS e o desenvolvimento de esplenomegalia (Ma *et al.*, 2022) (figura 11).

**Figura 11 – Avaliação do peso relativo do baço no experimento piloto.** O desafio com LPS 5,0 mg/Kg provocou aumento do peso relativo do baço em animais machos no experimento piloto.



Fonte: Elaborada pela autora

25 Legenda: \*\*\* representa diferença entre os grupos ( $p \leq 0,001$ ), teste de Dunnet. Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

O LPS administrado na dose de 5,0 mg/Kg provocou aumento do peso relativo do baço ( $p = 0,001$ , teste de Dunnet). Contudo, esse fenômeno não foi observado nos animais que receberam as doses de 1,5 mg/Kg ( $p = 0,0561$ , teste de Dunnet) e 3,0 mg/Kg ( $p = 0,0765$ , teste de Dunnet), com valor de  $p > 0,05$ . Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas, é provável que tenha ocorrido uma recuperação do tamanho do baço durante o período entre o desafio com LPS e o registro do peso do baço. Diversos estudos relatam aumento do tamanho do baço, mesmo no desafio com doses menores, com alterações observadas nos primeiros dias após o tratamento (Ma *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023). Além disso, um estudo anterior realizado neste projeto registrou aumento do baço 72h após o desafio com LPS na concentração de 0,5 mg/Kg (dados não apresentados). Assim, podemos sugerir que o intervalo entre a administração do LPS e o registro do peso do baço neste experimento foi suficiente para a normalização do tamanho do órgão nas doses de 1,5 e 3,0 mg/Kg.

15

### 5.1.2 Dosagem de sIgA

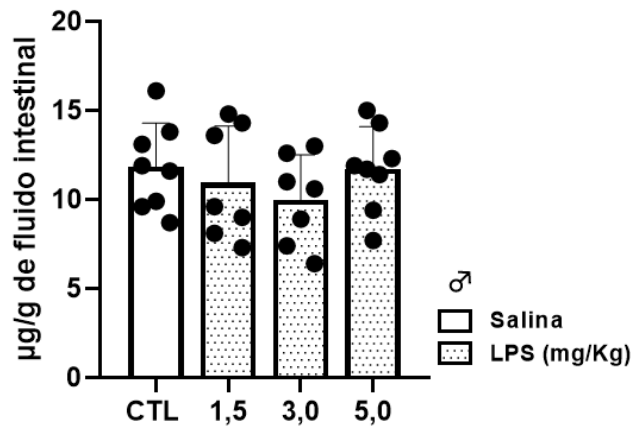
- **Desafio com LPS não provoca alteração nos níveis de sIgA**

A IgA secretora (sIgA) desempenha um papel crucial na imunidade das mucosas, contribuindo para a manutenção da barreira intestinal e a regulação da microbiota residente. Assim, sua quantificação pode fornecer dados importantes sobre possíveis alterações na homeostase intestinal associadas a distúrbios comportamentais, ajudando a esclarecer a relação entre o eixo microbiota-intestino-cérebro e transtornos como a depressão. Devido à escassez de dados na literatura sobre medidas de homeostase intestinal em modelo de indução de comportamento tipo depressivo, realizamos a dosagem de IgA secretora (figura 12).

20  
25

30

**Figura 12 – Dosagem de sIgA no experimento piloto.** O desafio com LPS em diferentes doses não provocou alterações nos níveis de sIgA no fluido intestinal nos animais machos no estudo piloto.



Fonte: Elaborada pela autora.

5 Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA unidirecional).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos testados no parâmetro avaliado. Ou seja, não encontramos alterações nos níveis de sIgA no intestino dos animais que receberam LPS.

### 5.1.3 Testes comportamentais: OFT, EPM, YMT e FST

- **Desafio com LPS causa prejuízo na locomoção dos animais na dose de 5,0 mg/Kg**

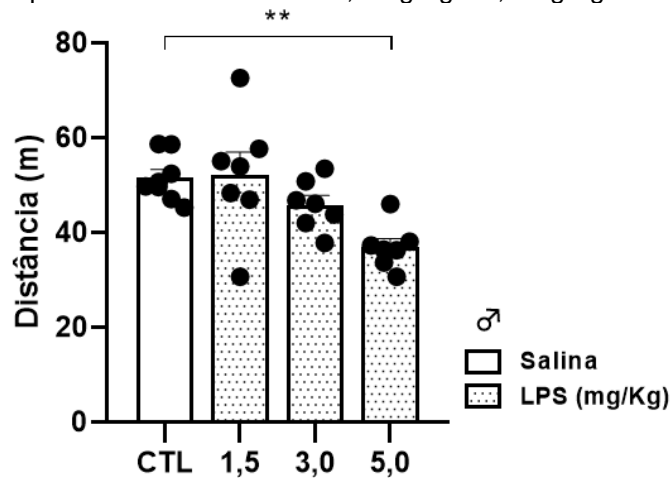
15 Embora o OFT (figura 13) não seja um teste específico para avaliar o comportamento tipo depressivo, ele foi incluído em todos os protocolos comportamentais devido à sua ampla utilização na análise da atividade locomotora e exploratória dos animais. Essa abordagem é essencial, pois muitos testes comportamentais dependem da integridade da função motora para uma

20 interpretação precisa dos resultados.

25

30

**Figura 13 – Resultado do teste de campo aberto no experimento piloto.** A locomoção foi preservada em animais que receberam a dose de 1,5 mg/Kg e 3,0 mg/Kg.



5

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \*\* representa diferença entre os grupos CTL e LPS 5,0 mg/Kg ( $p \leq 0,01$ ) no teste de Dunnet. Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM.

A média da distância total percorrida no campo aberto diferiu estatisticamente entre os grupos ( $p = 0,0026$ , ANOVA unidirecional), com análise *post hoc* indicando que apenas o grupo LPS 5,0 teve diminuição nesse parâmetro ( $p = 0,0028$ , teste de Dunnet). Ou seja, a locomoção e a atividade exploratória foram mantidas nos grupos que receberam 1,5 mg/Kg ou 3,0 mg/Kg de LPS.

#### 15 • **Desafio com LPS não provocou comportamento tipo ansioso em machos**

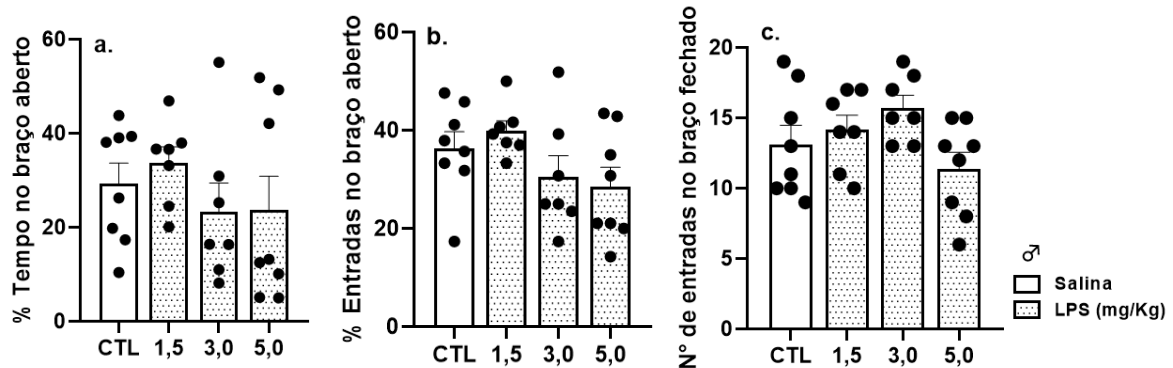
O comportamento tipo ansioso também foi avaliado nos animais, por meio do teste de labirinto em cruz elevado (figura 14), a fim de confirmar relatos da literatura que demonstraram a manifestação desse comportamento em animais desafiados com LPS (Mello *et al.*, 2018). Além disso, a investigação conjunta se torna relevante, já que o transtorno de ansiedade tem alta taxa de comorbidade com a depressão, que foi o foco do nosso estudo.

25

30

**Figura 14 – Resultados do teste de labirinto em cruz elevado no experimento piloto.** O desafio com LPS em diferentes doses não alterou a porcentagem de tempo no braço aberto e porcentagem de entradas no braço aberto, indicando ausência de comportamento tipo-ansioso.

5



Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM (ANOVA unidirecional).

10 Não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados: porcentagem de tempo no braço aberto ( $p = 0,5201$ , ANOVA unidirecional), porcentagem de entradas no braço aberto ( $p = 0,1171$ , ANOVA unidirecional) e número de entradas no braço fechado ( $p = 0,0841$ , ANOVA unidirecional). Assim, nas doses e regime de administração utilizadas, não foi observada manifestação do comportamento tipo ansioso nos animais machos usando o teste EPM.

15

Os parâmetros porcentagem de tempo no braço aberto e porcentagem de entradas no braço aberto passaram por normalização dos valores e análise em conjunto utilizando o escore Z, como realizado por Guilloux e colaboradores (2011). Esse procedimento teve como objetivo obter um *pool* de dados para o comportamento tipo ansioso, já que ambas avaliam o nível de ansiedade nos animais. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,1625$ , ANOVA unidirecional). O número de entradas no braço fechado não foi adicionado nessa análise, já que é usado como controle da atividade locomotora no aparato.

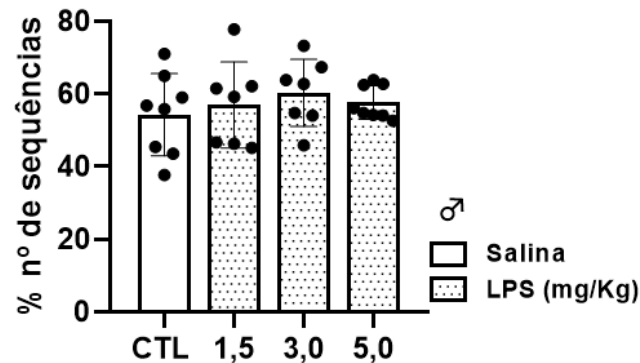
20

### 25 • Desafio com LPS não provoca déficit na memória de trabalho

Outro teste complementar realizado além do labirinto em cruz elevado foi o labirinto em Y (figura 15), que avalia a memória a curto prazo e a memória espacial. Esse teste foi empregado devido aos relatos na literatura de déficit cognitivo após administração de LPS nos animais (Zhao *et al.*, 2019a; Morimoto *et al.*, 2023).

30

**Figura 15 – Resultado do teste de labirinto em Y.** O desafio com LPS em diferentes doses não alterou a porcentagem do número de seqüências realizadas no teste de labirinto em Y.



5

Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM (ANOVA unidirecional).

Entretanto, nenhum dos grupos desafiados com LPS tiveram diminuição na porcentagem do número de alterações entre os braços. Assim, não foi possível identificar déficit na memória de curto prazo provocado por LPS nos animais

10

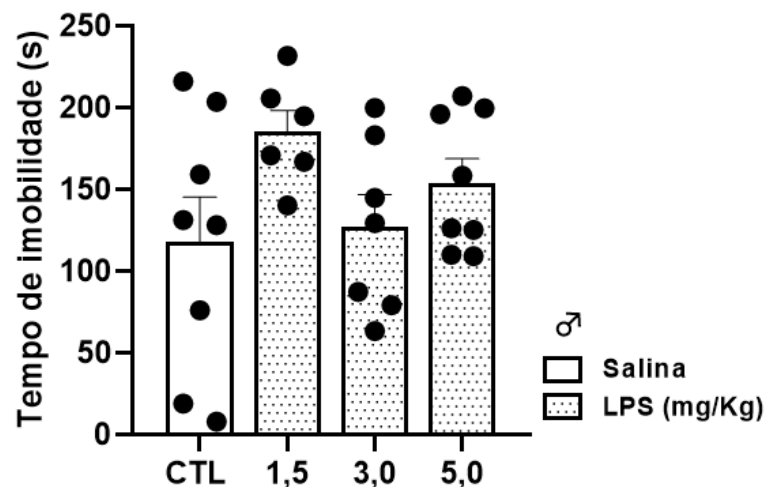
- **Desafio com LPS 1,5 mg/Kg aumenta o tempo de imobilidade no FST**

Em seguida, o tempo de imobilidade no nado forçado foi analisado (figura 16), já que este teste é considerado um padrão ouro para avaliação do comportamento tipo depressivo.

15

**Figura 16 – Resultado do teste de nado forçado no experimento piloto.** Apesar da ausência de diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ , ANOVA unidirecional), a dose de 1,5 mg/Kg se mostrou o mais promissor para o aumento de tempo de imobilidade no nado forçado entre as doses testadas.

20



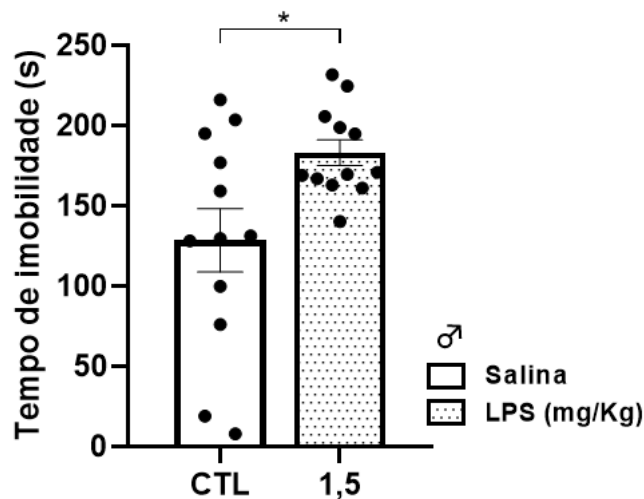
Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM (ANOVA unidirecional).

Em análise utilizando ANOVA, a média do tempo de imobilidade entre os grupos não diferiu entre si, com  $p = 0,1379$ . Mesmo quando os grupos CTL e 1,5 mg/Kg foram isolados do restante dos dados e passaram por análise por teste t, o valor do p foi ligeiramente maior que 0,05 ( $p = 0,0716$ , teste t bicaudal).

É importante ressaltar que o teste de nado forçado exige um número amostral maior devido à variabilidade dos resultados, conforme já relatado na literatura (Smalheiser *et al.*, 2021). Assim, foi realizado um segundo experimento para aumentar o número amostral nos grupos CTL e 1,5 mg/kg (Fig. 17), por esta concentração ter se mostrado a mais promissora entre as três concentrações testadas.

**Figura 17 – Resultado do nado forçado nos grupos CTL e LPS na dose de 1,5 mg/Kg, após ajuste no número amostral.** O desafio com LPS na dose de 1,5 mg/Kg aumentou o tempo de imobilidade no nado forçado de forma estatisticamente significativa.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \* representa diferença entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ), teste de t de Student.  
Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM

Com a inclusão de animais adicionais para que o tamanho amostral atingisse 12 animais em cada grupo, conforme determinado pelo planejamento estatístico, foi possível observar diferença significativa entre os grupos CTL e 1,5 mg/Kg ( $p = 0,0170$ , teste t bicaudal).

É importante ressaltar que os animais adicionais foram submetidos às mesmas condições de tratamento, porém participaram apenas dos testes OFT e FST. Além disso, devido ao número limitado de animais, em conformidade com as diretrizes do CEUA para redução (Brasil, 2023), esses animais adicionais pertencem

aos grupos CTL e LPS do experimento descrito no próximo tópico, que inclui os grupos tratados com B5<sup>1A</sup>. Ou seja, os dados do grupo CTL e LPS foram reutilizados.

## 5 5.2 Experimento 2: Avaliação do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> e L64 em machos e fêmeas desafiados com LPS na dose de 1,5 mg/Kg

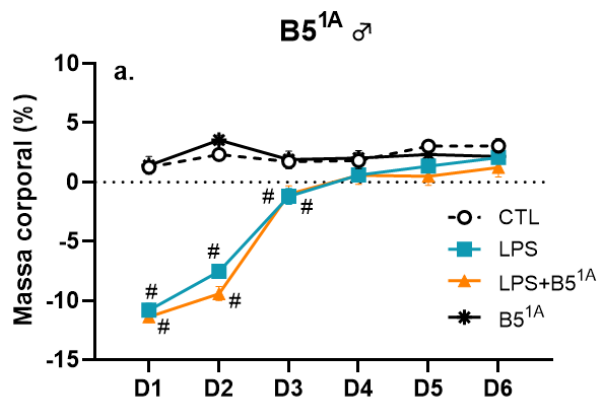
### 5.2.1 Massa corporal

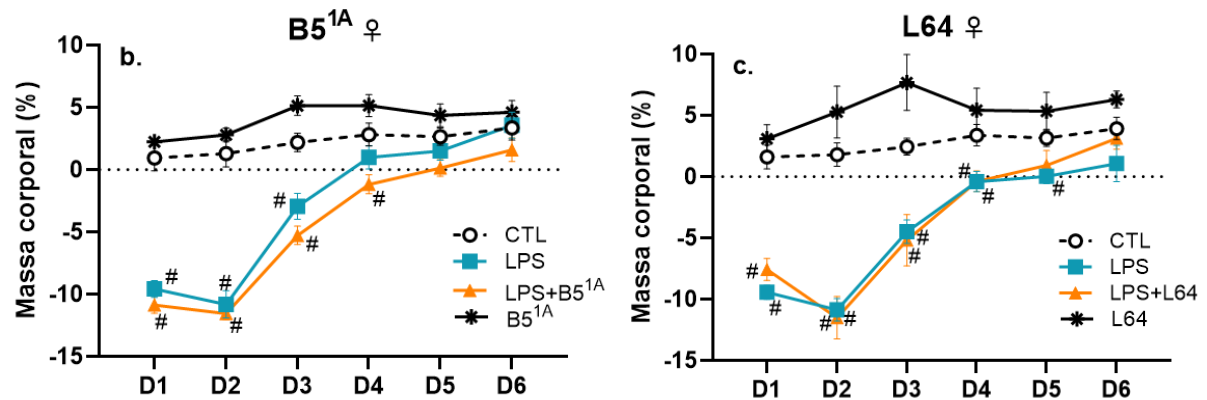
Assim como no estudo piloto, a massa corporal dos animais de todos os grupos e o consumo de ração foram registrados a partir do dia da administração do LPS (“D0”) até o penúltimo dia do experimento (“D6”) (figura 18) e comparados por ANOVA bidirecional.

#### • A administração das linhagens bacterianas não impede perda de massa corporal em ambos os sexos

Não foram observadas diferenças significativas entre a massa corporal dos grupos no momento do desafio com LPS, com valor de  $p = 0,6483$  (ANOVA unidirecional) para os machos, valor de  $p = 0,3827$  (ANOVA unidirecional) para as fêmeas tratadas com B5<sup>1A</sup> e  $p = 0,3081$  (ANOVA unidirecional) para as fêmeas tratadas com L64.

Figura 18 – Acompanhamento da porcentagem de massa corporal em machos e fêmeas desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup> ou L64. A administração de B5<sup>1A</sup> ou L64 não impediu a perda de massa corporal em machos (a) e fêmeas (b e c) submetidos ao desafio com LPS 1,5 mg/Kg.





Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: # representa diferença em relação ao grupo CTL (teste de Tukey).

Resultados apresentados em média (%) ± SEM.

5

Em machos, após 24h da administração do LPS, os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> apresentaram uma redução significativa da massa corporal em relação ao grupo CTL ( $p < 0,0001$ , teste de Tukey). Essa diferença se manteve até o D4, quando ambos os grupos deixaram de apresentar diferença estatística neste parâmetro em comparação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> (grupo tratamento) em nenhum dos dias analisados ( $p > 0,05$ , teste de Tukey). Dessa forma, a administração de B5<sup>1A</sup> não preveniu a perda de peso, nem favoreceu a sua recuperação.

10

15

Observou-se pico da perda de peso no D1 para ambos os grupos desafiados com LPS, com 10,84% (LPS) e 11,38% (LPS+B5<sup>1A</sup>) do peso original. O retorno ao peso original ocorreu no D3 para ambos, com 98,77% (LPS) e 98,93% (LPS+B5<sup>1A</sup>). Enquanto isso, os grupos CTL e B5<sup>1A</sup> passaram por ganho de peso ao longo de todo o período experimental. Esses dados indicam a falta de efeito de B5<sup>1A</sup> sobre a recuperação do peso nos animais desafiados com LPS.

20

25

No experimento para avaliação do potencial psicobiótico de B5<sup>1A</sup> em fêmeas, não houve diferença entre os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> em nenhum dos dias. Entretanto, o grupo LPS diferiu do grupo CTL durante os dias D1 à D3, ao passo que o grupo LPS+B5<sup>1A</sup> manteve diferença estatística em relação ao grupo CTL até o D4 ( $p = 0,0164$ ). O maior valor da perda de massa corporal ocorreu no D2, com -10,81% (grupo LPS) e -11,56% (LPS+B5<sup>1A</sup>). A recuperação do peso original no grupo LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> ocorreu no D4.

Da mesma forma, em fêmeas tratadas com L64, não houve diferença entre os grupos LPS e LPS+L64 em nenhum dos dias. A diferença entre os grupos CTL e LPS se manteve até o D5, ao passo que a diferença entre os grupos CTL e LPS+L64 se manteve somente até o D4, indicando possível efeito positivo da administração de L64 sobre a recuperação do peso, diferente do que ocorreu com as fêmeas tratadas com B5<sup>1A</sup>.

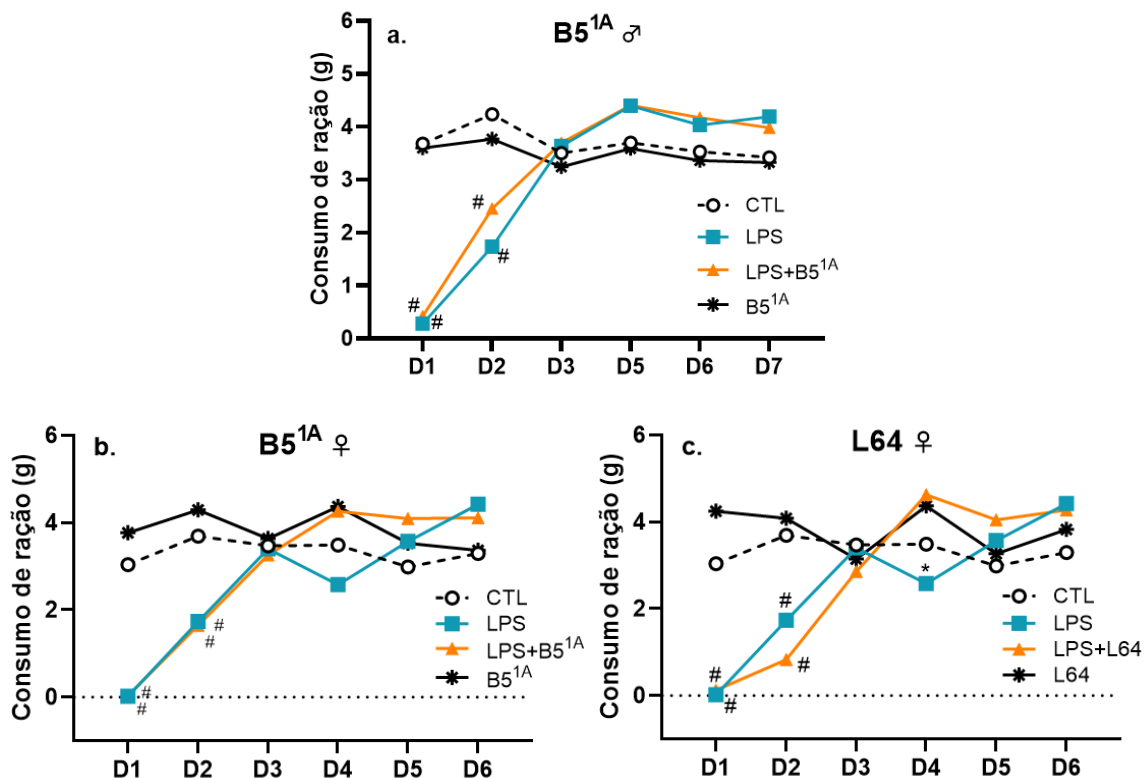
Em relação ao esquema experimental da L64, o maior pico para LPS foi de 10,87% e para o grupo LPS+L64 foi de 11,51 %, ambos no D2. A recuperação do peso original dos grupos LPS e LPS+L64 ocorreu no D4.

### 5.2.2 Consumo alimentar

#### • A administração de B5<sup>1A</sup> ou L64 não possui efeito sobre a anorexia causada pelo desafio com LPS

Em todos os três experimentos, os animais apresentaram sinais de anorexia (figura 19):

**Figura 19 – Acompanhamento do consumo de ração em machos e fêmeas desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup> ou L64.** A administração de B5<sup>1A</sup> ou L64 não demonstrou efeito sobre a anorexia causada pelo desafio com LPS 1,5 mg/Kg.



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: # representa diferença em relação ao grupo CTL (teste de Tukey) e \* ( $p \leq 0,05$ ) representa diferença entre os grupos LPS e LPS+L64 (teste de Tukey). Resultados apresentados em média.

Nos machos, após 24h da administração do LPS, os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> apresentaram uma redução significativa do consumo de ração em relação ao grupo CTL ( $p = 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , teste de Tukey) e ao grupo B5<sup>1A</sup> ( $p = 0,0002$  e  $p < 0,0001$ , teste de Tukey). Porém, não houve diferença significativa entre os grupos desafiados com LPS. Após 72h, ambos os grupos desafiados com LPS não diferiram em relação ao grupo CTL, com  $p = 0,9907$  entre os grupos CTL e LPS; e  $p = 0,9954$  entre CTL e LPS+B5<sup>1A</sup> (teste de Tukey). Assim, não foi possível observar efeito da administração da B5<sup>1A</sup> em relação ao consumo de ração. Já nas fêmeas, em ambos os tratamentos (B5<sup>1A</sup> ou L64), a diminuição do consumo de ração foi observada tanto no D1, quanto no D2, com normalização apenas no D3, e sem diferença entre os grupos tratados com LPS em nenhum dos três dias após desafio com LPS.

### 5.2.3 Escore clínico

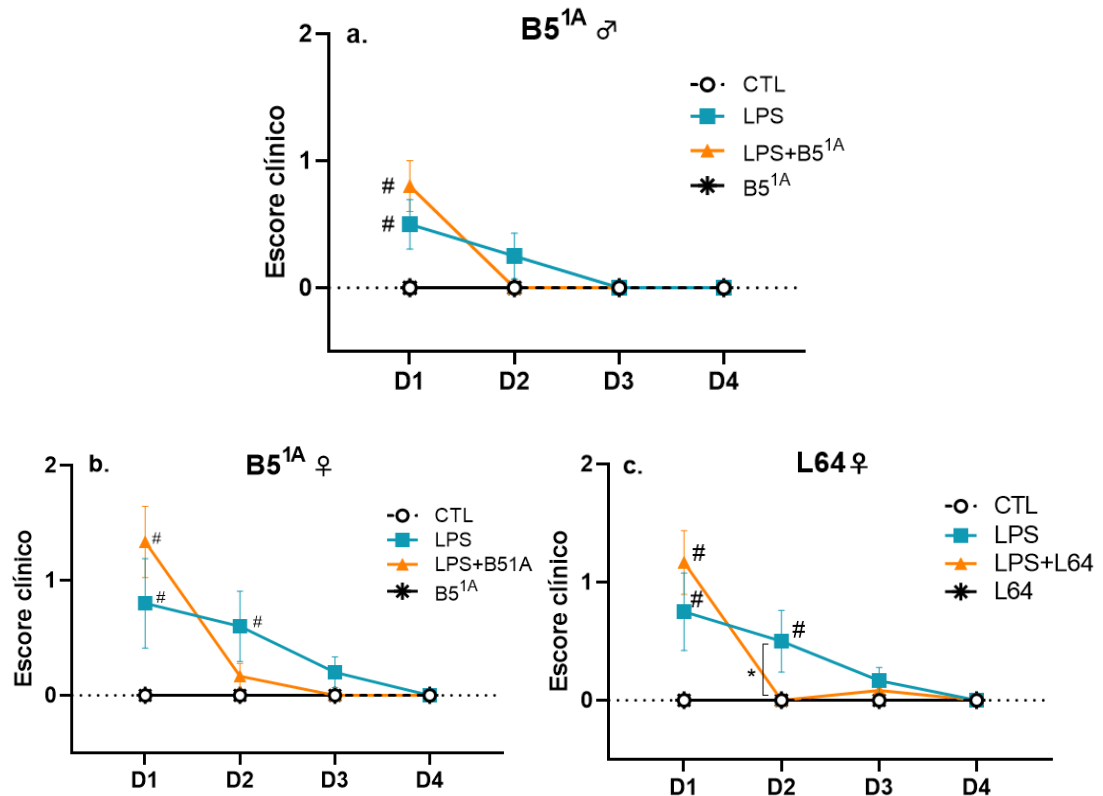
O escore clínico foi registrado todos os dias no mesmo horário, com a primeira avaliação após 24h do desafio do LPS e antes da administração da B5<sup>1A</sup> ou veículo i.g. Ou seja, o escore clínico do D1 reflete apenas o efeito da administração de LPS ou veículo i.p..

#### • A administração de L64 possui efeito positivo na recuperação de animais fêmeas

Em todos os três experimentos, o desafio com LPS provocou aumento no escore clínico (figura 20):

**Figura 20 – Acompanhamento do escore clínicos em machos e fêmeas desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup> ou L64. Houve melhora do escore clínico em fêmeas desafiadas com LPS e tratadas com L64 em comparação com o grupo que foi apenas desafiado com LPS.**

5



Fonte: elaborada pela autora

Legenda: # representa diferença em relação ao grupo CTL (teste de Tukey) e \* ( $p \leq 0,05$ ) representa diferença entre os grupos LPS e LPS+L64. Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM.

10

Nos machos, a análise por ANOVA bidirecional revelou diferença significativa no escore clínico no “D1” para os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup>, sem distinção entre eles. Isso indica que o LPS aumentou a pontuação do escore clínico de forma semelhante nos animais que o receberam. No entanto, no “D2”, ambos os grupos deixaram de apresentar diferença em relação ao grupo CTL. Isso sugere que a redução do escore clínico ocorreu independentemente da intervenção com o tratamento com B5<sup>1A</sup>. Ou seja, indica recuperação espontânea dos animais diante do desafio com LPS. Assim, não foi possível avaliar se a administração de B5<sup>1A</sup> é capaz de auxiliar a recuperação dos animais machos. Por outro lado, os resultados mostram que a administração de B5<sup>1A</sup> não agravou os sinais clínicos resultantes da endotoxemia em machos.

Nas fêmeas tratadas com B5<sup>1A</sup>, também foi observado diferença no escore clínico no “D1” dos grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> em comparação ao grupo CTL ( $p =$

0,0018 e  $p < 0,0001$ , teste de Tukey). Já no “D2”, somente o grupo LPS permaneceu apresentando diferença significativa em relação ao grupo CTL. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup> no “D2” ( $p = 0,1646$ ). Assim, não foi possível afirmar que houve melhora estatisticamente significativa nos animais tratados com B5<sup>1A</sup>.

Em contrapartida, a administração de L64 provocou melhora do escore clínico no “D2” em relação ao grupo LPS: foi observada diferença significativa entre os grupos CTL e LPS ( $p = 0,0352$ ), mas sem diferença entre os grupos CTL e LPS+L64 ( $p > 0,9999$ ), com diferença estatística entre os grupos LPS e LPS+L64 ( $p = 0,0352$ ) no “D1”.

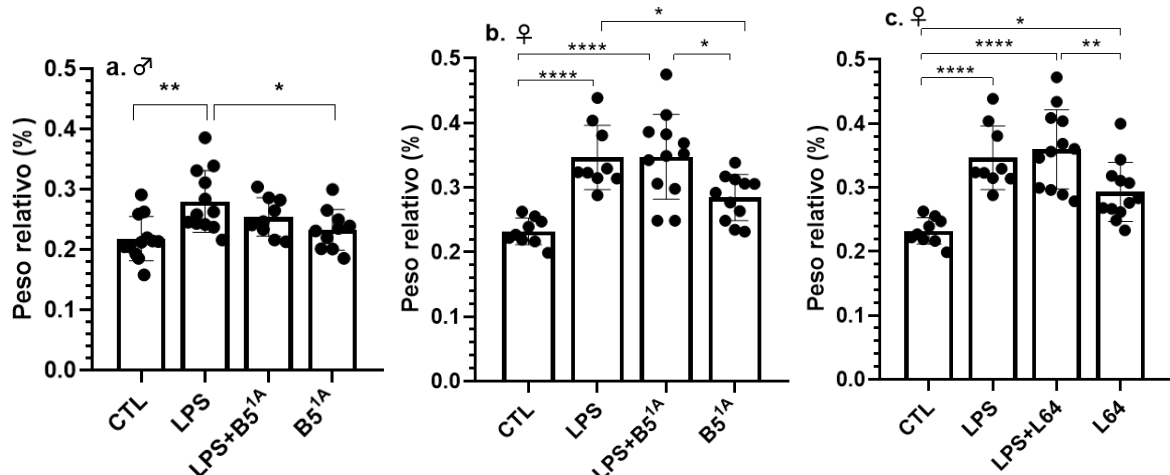
#### 5.2.4 Peso relativo do baço

O peso relativo do baço foi calculado a partir do peso do animal registrado no último dia do período experimental e o peso do baço registrado logo após eutanásia.

- **A administração de B5<sup>1A</sup> causa atenuação parcial do aumento do peso relativo do baço em machos, mas não em fêmeas**

O aumento do peso do baço foi observado em todos os três experimentos (figura 21):

**Figura 21 – Peso relativo do baço em machos e fêmeas desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup> ou L64. A administração de LPS provoca aumento do peso relativo do baço em ambos os sexos, sem reversão pela administração das linhagens bacterianas.**



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ) e \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ) representam diferença entre os grupos (teste de Tukey). Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

Nos machos, houve diferença significativa entre os grupos CTL e LPS no peso relativo do baço, com  $p = 0,0029$  (teste de Tukey), além da diferença entre os grupos LPS e B5<sup>1A</sup>, com  $p = 0,0437$  (teste de Tukey). Apesar da média do grupo CTL e do grupo LPS + tratamento (LPS+B5<sup>1A</sup>) não ter diferença significativa entre si no teste de Tukey ( $p = 0,1902$ ), indicando o peso relativo do baço foi semelhante entre esses dois grupos, não houve diferença significativa entre o grupo LPS e o grupo LPS+B5<sup>1A</sup> ( $p = 0,4774$ , teste de Tukey). Assim, a administração da B5<sup>1A</sup> não foi capaz de reverter completamente o aumento do tamanho de baço causado pela administração do LPS. Porém, esse resultado é sugestivo de que a B5<sup>1A</sup> reverte parcialmente o aumento do baço, provavelmente pela diminuição na resposta inflamatória, devido a sua ação imunomoduladora observado em estudos anteriores.

Em contraste com o que foi observado em machos, o tratamento com a B5<sup>1A</sup> em animais desafiados com LPS não teve nenhum efeito sobre o aumento do peso relativo do baço, com  $p > 0,9999$  entre os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup>, e  $p < 0,0001$  entre os grupos CTL e LPS+B5<sup>1A</sup>.

Além da diferença estatística entre os grupos CTL e LPS, houve diferença significativa entre o grupo CTL e os grupos que receberam L64, sejam aqueles expostos ao LPS ou não. Não houve diferença significativa entre os grupos LPS e LPS+L64, indicando que a administração de L64 em animais desafiados com LPS não agravou o aumento do baço. No entanto, a administração de L64 por si provocou aumento do peso relativo do baço nos animais. Esse resultado foi inesperado, devido a relatos de ação anti-inflamatória de L64 em trabalhos anteriores (Costa, 2024).

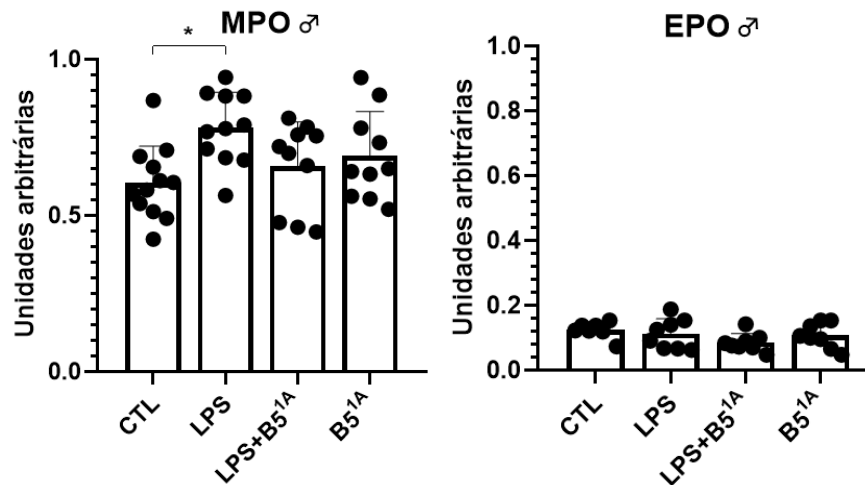
### 5.2.5 Parâmetros imunológicos do baço

Devido a alteração do peso relativo do baço, parâmetros imunológicos como a atividade de MPO, EPO e NAG foram avaliados neste órgão.

#### • O desafio com LPS causa aumento da atividade de MPO, mas não de EPO nos machos

A seguir os resultados da dosagem de MPO e EPO realizado nos baços extraídos de machos são apresentados (figura 22):

**Figura 22 – Dosagem de MPO e EPO no baço de machos desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup>. O tratamento com B5<sup>1A</sup> parece atenuar parcialmente o aumento de MPO no baço causado pelo desafio com LPS.**



5

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \* ( $p \leq 0,05$ ) representa diferença significativa entre os grupos (teste de Tukey).  
Resultados apresentados em média (%)  $\pm$  desvio padrão (ANOVA unidirecional).

10

Em concordância com o aumento do peso do baço, a atividade de mieloperoxidase (MPO) foi significativamente maior no grupo LPS, em relação ao grupo CTL ( $p = 0,0117$ , teste de Tukey). Em comparação com o grupo CTL, os grupos LPS+B5<sup>1A</sup> e B5<sup>1A</sup> não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0,7707$  e  $p = 0,4190$ , teste de Tukey). Entretanto, estes também não apresentaram diferença em relação ao grupo LPS ( $p = 0,3897$  e  $0,9431$ , respectivamente, teste de Tukey).

15

Dessa forma, não foi possível concluir que a administração de B5<sup>1A</sup> em animais desafiados com LPS tenha atenuado completamente o aumento da infiltração de neutrófilos no baço induzido pelo desafio com LPS.

20

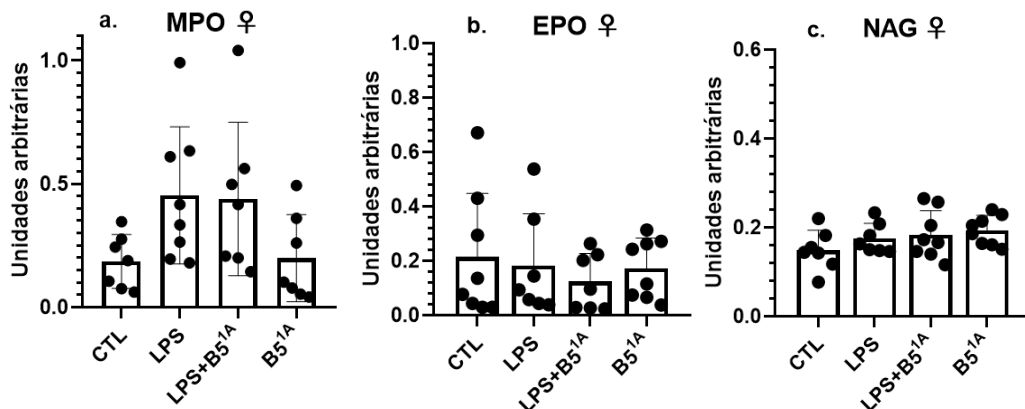
Em contraste, o desafio com LPS não causou alteração na atividade de EPO no baço, indicando que após sete dias do desafio com LPS, a atividade de EPO é semelhante entre os grupos.

#### • O desafio com LPS não provoca alteração no MPO, EPO e NAG em fêmeas

25

No baço das fêmeas, além do MPO e EPO, a atividade de NAG também foi avaliada (figura 23):

**Figura 23 – Dosagem de MPO, EPO e NAG em fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg e tratadas com B51A. Não houve diferença significativa entre os grupos nas atividades de MPO, EPO e NAG.**



5

Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA unidirecional).

A ANOVA unidirecional indicou valor de  $p$  ligeiramente acima de 0,05 ( $p = 0,0582$ ) na dosagem de MPO. Na análise pós-teste, não houve diferença significativa entre os grupos CTL e LPS ( $p = 0,1498$ , teste de Tukey), diferente do que ocorreu com os machos, no mesmo teste estatístico.

10

Para EPO e NAG, também foi verificado que não houve diferença significativa entre os grupos. Ou seja, tanto o LPS quanto a administração de B5<sup>1A</sup> não alteraram esses parâmetros imunológicos.

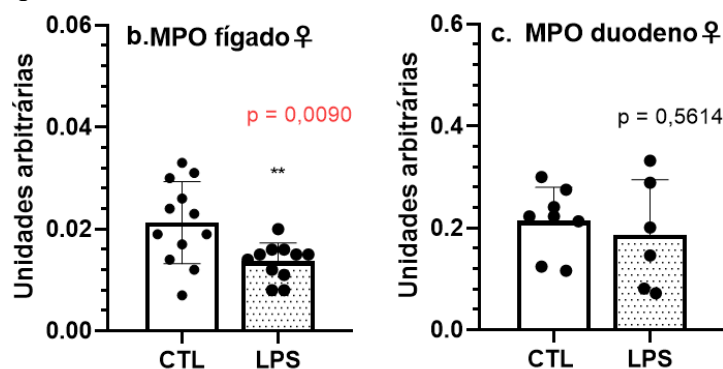
15

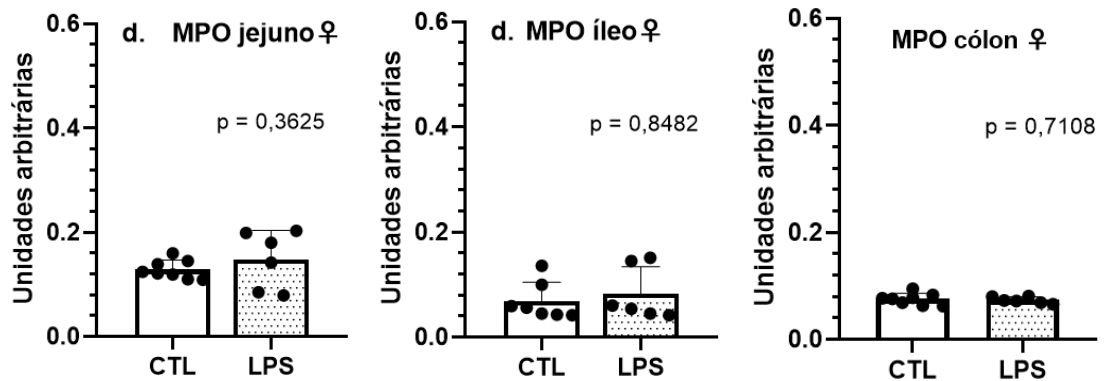
### 5.2.6 Caracterização do impacto na atividade de MPO e EPO no fígado, duodeno, jejuno, íleo e cólon em fêmeas

Outras regiões foram avaliadas quanto a atividade de MPO e EPO em fêmeas (figura 24 e 25):

20

**Figura 24 – Dosagem de MPO no fígado, regiões do intestino delgado e cólon em fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg. O teste t de Student bicaudal indicou alteração na medida da atividade de MPO no fígado de fêmeas desafiadas com LPS.**





Fonte: Elaborada pela autora

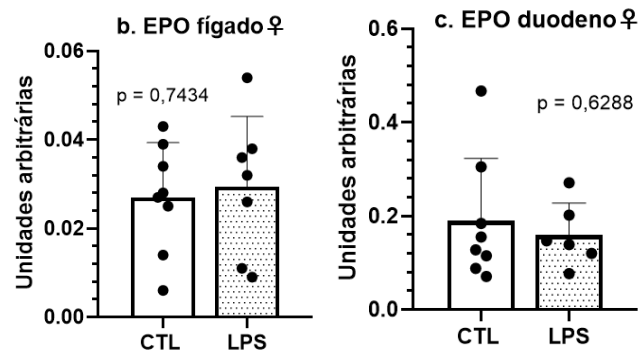
Legenda: \* ( $p \leq 0,05$ ) representa diferença entre os grupos (teste t de Student).  
Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

5

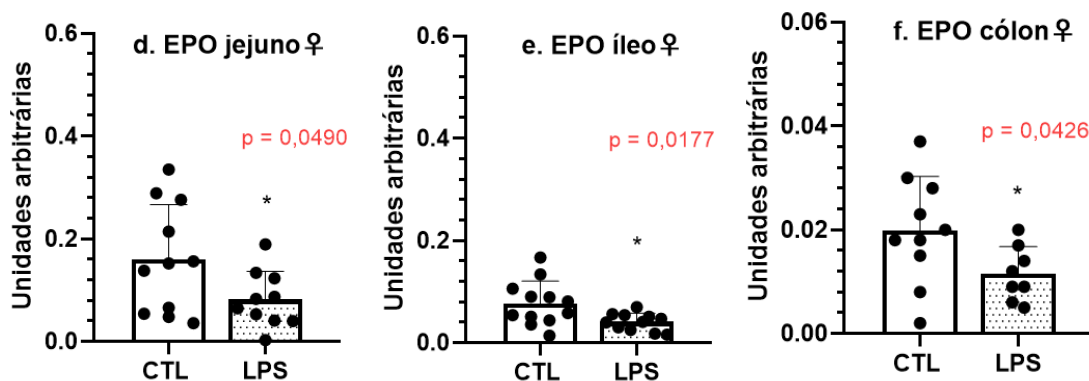
No MPO, em análise por teste t de Student bicaudal, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos CTL e LPS no duodeno ( $p = 0,5614$ ); jejunum ( $p = 0,3625$ ); íleo ( $p = 0,8482$ ); e cólon ( $p = 0,7108$ ). Assim, entre esses órgãos, apenas o fígado teve nível de infiltração de neutrófilos alterada pela administração de LPS.

10

**Figura 24 – Dosagem de EPO no fígado, regiões do intestino delgado e cólon em fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg.** O teste t de Student bicaudal indicou alteração na medida da atividade de EPO no jejunum, íleo e cólon.



15



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \* ( $p \leq 0,05$ ) representa diferença entre os grupos (teste t bicaudal).  
Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão

Já no EPO, não houve diferença significativa entre os grupos CTL e LPS no duodeno ( $p = 0,6288$ , teste t) e fígado ( $p = 0,7434$ , teste t). Em contrapartida, foi observada diferença estatística entre o CTL e LPS no jejuno ( $p = 0,0490$ ), íleo ( $p = 0,0177$ , teste t com correção de Welch) e cólon ( $p = 0,0426$ , teste t).

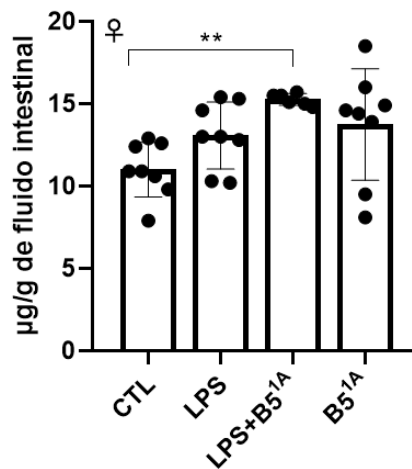
5

### 5.2.7 Dosagem de sIgA em fêmeas

- O nível de sIgA se encontra aumentado no grupo LPS+B5<sup>1A</sup> em fêmeas

Primeiramente, a diferença entre CTL x LPS foi analisada por meio do teste de Dunnet, como foi realizado no experimento piloto, mostrando que  $p = 0,1780$ . Ou seja, não houve diferença significativa entre estes dois grupos, corroborando com os resultados encontrados nos machos do experimento 1 (padronização da dose de LPS em machos). A seguir, são mostrados resultados da análise por ANOVA unidirecional, seguido de teste de Tukey (figura 26):

15 **Figura 26 – Dosagem de sIgA no conteúdo intestinal de fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg e tratadas com B5<sup>1A</sup>.** A administração B5<sup>1A</sup> em animais desafiados com LPS provoca aumento de sIgA do conteúdo intestinal.



20 Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: \*\* ( $p \leq 0,01$ ) representa diferença entre os grupos (teste de Tukey). Resultados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão.

Finalmente, em análise realizada por teste de Tukey, observou-se aumento de sIgA no grupo LPS+B5<sup>1A</sup> em relação ao grupo controle, mas não nos grupos LPS ou B5<sup>1A</sup>.

25

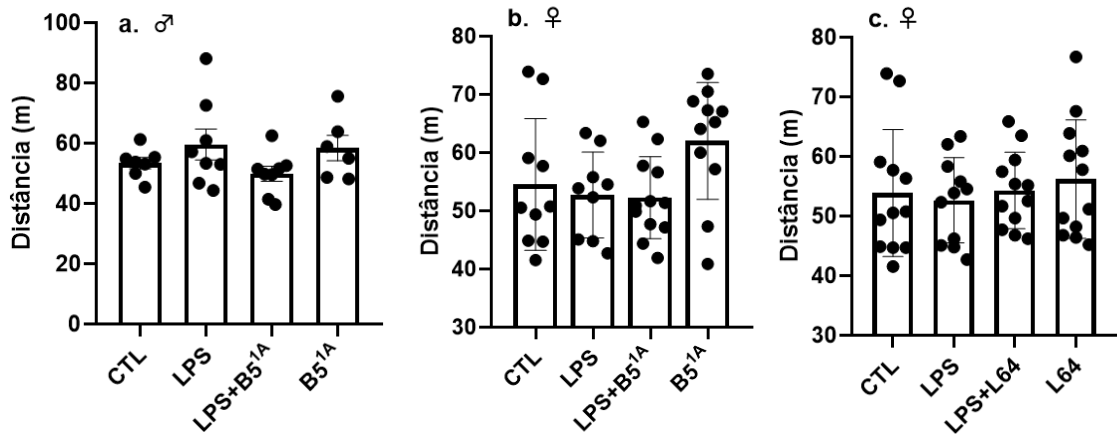
### 5.2.8 Testes comportamentais

- **O desafio com LPS não provoca prejuízo na locomoção tanto em machos quanto em fêmeas**

A fim de verificar a preservação da atividade motora, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (figura 27):

5

**Figura 27 – Resultado do teste de campo aberto em machos e fêmeas desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup> ou L64.** A administração de LPS e/ou B5<sup>1A</sup> não modificam a distância percorrida no campo aberto, indicando preservação da atividade motora nos animais.



10

Fonte: Elaborada pela autora.  
Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM (ANOVA unidirecional).

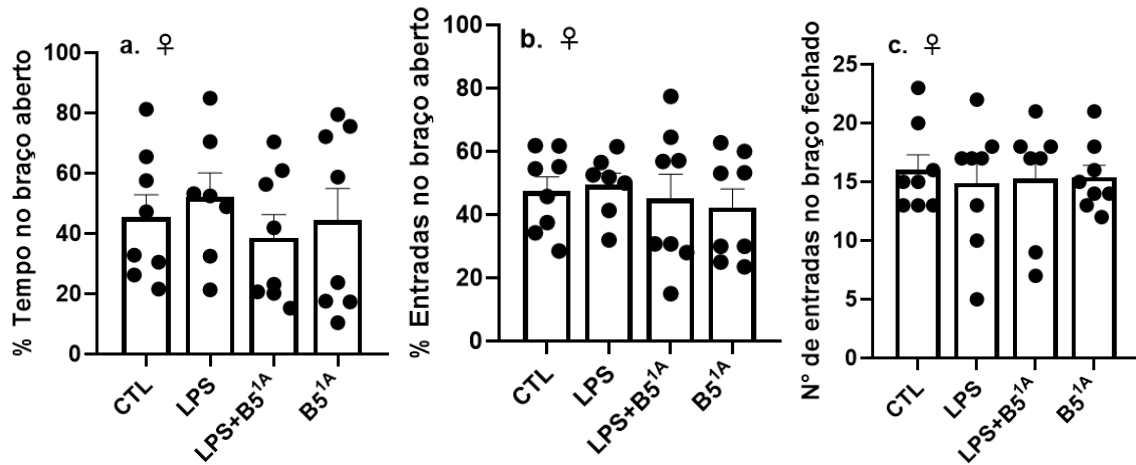
Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao parâmetro distância percorrida no campo aberto em machos ( $p = 0,2274$ , ANOVA unidirecional). O mesmo ocorreu com as fêmeas tratadas com B5<sup>1A</sup> ( $p = 0,0590$ , ANOVA unidirecional) ou L64, ( $p = 0,3993$ , ANOVA unidirecional). É importante comentar que apesar do grupo B5<sup>1A</sup> em fêmeas apresentar um valor elevado em sua média, não foi encontrada diferença estatística com o restante dos grupos no teste de Tukey. Ainda, o teste t foi empregado para comparação apenas entre o grupo CTL e B5<sup>1A</sup>, resultando em  $p = 0,1246$ , corroborando com a hipótese de que não houve diferença na locomoção no grupo B5<sup>1A</sup> em relação ao grupo CTL.

- **O desafio com LPS também não provoca comportamento tipo ansioso em fêmeas**

25

Como ocorreu na padronização da dose de LPS nos machos, as fêmeas foram submetidas ao teste de labirinto em cruz elevado (EPM), a fim de entender o efeito do LPS em relação ao comportamento tipo ansioso (figura 28).

**Figura 28 – Resultados do teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg e tratadas com B5<sup>1A</sup>.** O desafio com LPS não provocou alterações nos parâmetros avaliados, indicando ausência de comportamento tipo ansioso.



5

Fonte: Elaborada pela autora.  
Resultados apresentados em média ± SEM (ANOVA unidirecional)

De acordo com a análise estatística, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados no EPM: porcentagem de tempo no braço aberto (p = 0,7579, ANOVA unidirecional); porcentagem de entradas no braço aberto (p = 0,8372, ANOVA unidirecional); número de entradas no braço fechado (p = 0,9646, ANOVA unidirecional), indicando que a administração de LPS na dose e regime adotados, não há manifestação do comportamento tipo ansioso entre as fêmeas detectado pelo teste de EPM. Adicionalmente, o escore Z foi utilizado para análise de dados do EPM. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos, com p = 0,8217 (ANOVA unidirecional).

O teste de labirinto em cruz elevado (EPM) não foi realizado com os animais que receberam L64, devido à ausência de diferença significativa entre os grupos CTL e LPS no tratamento com B5<sup>1A</sup>.

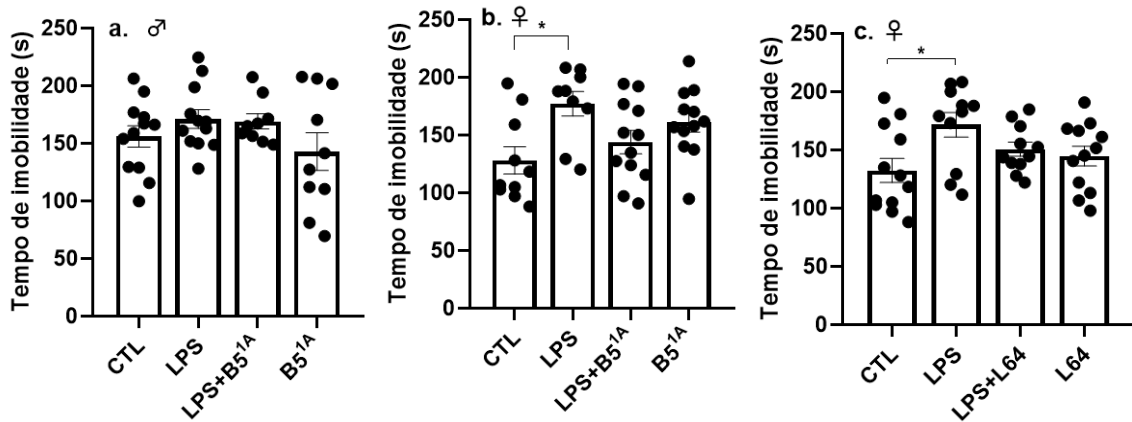
20

- **O desafio com LPS provoca aumento do tempo de imobilidade somente em fêmeas**

Os resultados do teste de nado forçado foram os seguintes (figura 29):

25

**Figura 29 – Resultado do teste de nado forçado em machos e fêmeas desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup> ou L64.** O desafio com LPS 1,5 mg/Kg aumentou o tempo de imobilidade no nado forçado (FST) entre as fêmeas.



5

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: \*( $p \leq 0,05$ ) representa diferença significativa entre os grupos (teste de Tukey).  
Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM

10

Entre os machos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p = 0,2327$ , ANOVA unidirecional), indicando que o LPS não alterou o tempo de imobilidade nos animais. Além disso, mesmo quando os grupo CTL e LPS foram comparados separadamente do restante dos resultados, por teste t bicaudal, o valor de  $p = 0,2300$ . Isso reforça a falta de efeito do LPS sobre esse comportamento em animais machos. Ainda, esses resultados sugerem uma falha na replicação dos achados do estudo piloto realizado com camundongos machos da mesma linhagem e idade.

15

Já nas fêmeas tratadas com B5<sup>1A</sup>, houve diferença significativa entre os grupos no teste de nado forçado, com  $p = 0,0158$  (ANOVA unidirecional). O teste *post-hoc* revelou que houve diferença significativa entre os grupos CTL e LPS ( $p = 0,0149$ , teste de Tukey), com aumento do tempo de imobilidade no grupo LPS, mostrando a manifestação do comportamento tipo depressivo nestes animais. Assim, o modelo de comportamento tipo-depressivo foi estabelecido em fêmeas.

20

25

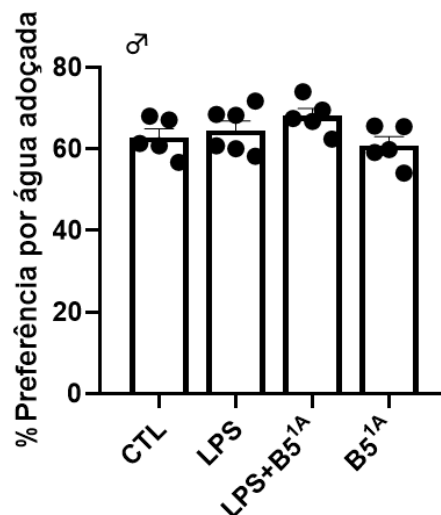
Apesar da média entre o grupo CTL e o grupo LPS+B5<sup>1A</sup> não ter diferença significativa entre si no teste de Tukey ( $p = 0,6937$ ), indicando que o tempo de imobilidade foi semelhante entre esses dois grupos, não houve diferença significativa entre o grupo LPS e o grupo LPS+B5<sup>1A</sup> ( $p = 0,1300$ , teste de Tukey). Portanto, não foi possível afirmar que a administração da B5<sup>1A</sup> foi capaz de reverter por completo a manifestação do comportamento tipo depressivo.

Da mesma forma como ocorreu com o grupo LPS+B5<sup>1A</sup>, a administração de L64 em animais desafiados com LPS não foi capaz de reverter por completo o aumento da imobilidade no nado forçado, com valor de  $p = 0,3931$  (teste de Tukey) entre os grupos CTL e LPS+L64; e  $p = 0,4956$  (teste de Tukey) entre os grupos LPS e LPS+L64.

• **LPS não provoca diminuição da preferência por sacarose no SPT**

O teste de preferência por sacarose (SPT) foi adicionado a bateria de testes comportamentais nos machos, pois permite a avaliação do comportamento anedônico nos animais (figura 30):

**Figura 30 – Resultado do teste de preferência por sacarose em machos desafiados com LPS 1,5 mg/Kg e tratados com B5<sup>1A</sup>.** O desafio com LPS não provocou diminuição da preferência por sacarose no SPT em machos.



Fonte: Elaborada pela autora.  
Resultados apresentados em média  $\pm$  SEM (ANOVA unidirecional).

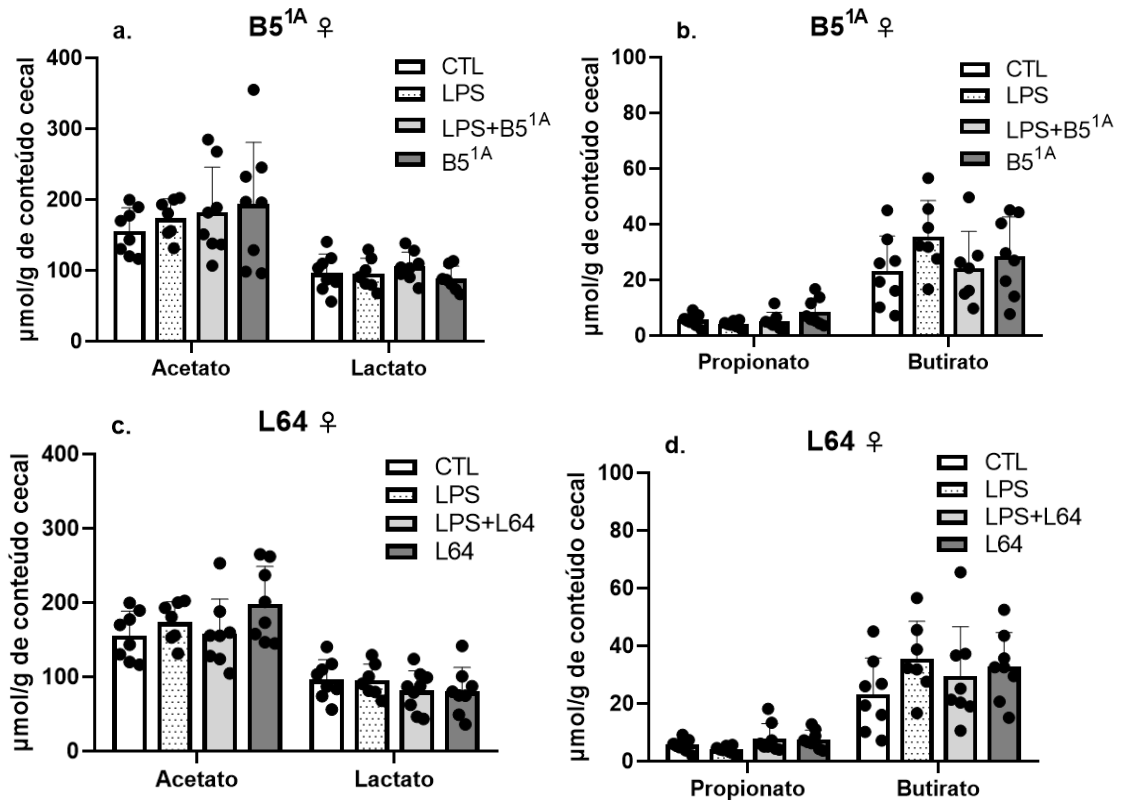
Em nossos resultados, não observamos diferenças significativas entre os grupos. Ou seja, não houve manifestação do comportamento tipo anedonia na dose de LPS utilizada entre os animais machos.

### 5.2.9 Medida de AGCC e lactato

Devido ao papel dos AGCC na comunicação entre o intestino e cérebro, as medidas de AGCC foram avaliadas no conteúdo cecal das fêmeas, visto que o

modelo de comportamento depressivo provocado por LPS foi estabelecido neste sexo. Ainda, nas mesmas amostras, ocorreu a quantificação do lactato (figura 31):

- 5 **Figura 31 – Dosagem de AGCC no conteúdo cecal em fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg e tratadas com B5<sup>1A</sup> ou L64.** O desafio com LPS não provocou alterações nos níveis de AGCC e lactato em fêmeas.



Fonte: Elaborada pela autora.

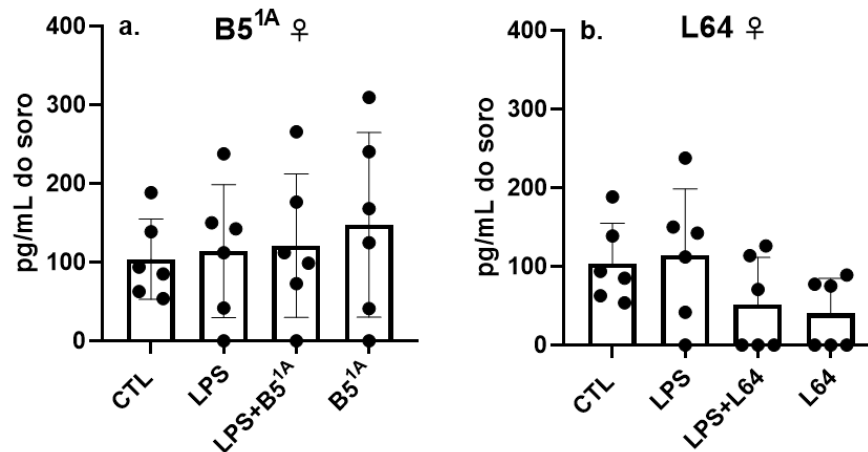
- 10 Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA unidirecional)

Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos em relação aos níveis de AGCC e lactato no conteúdo do ceco.

### 15 5.2.10 Dosagem de BDNF

Realizamos também a dosagem de BDNF em fêmeas, com os seguintes resultados para os grupos que receberam B5<sup>1A</sup> ou L64 (figura 32):

**Figura 32 – Dosagem de BDNF sérico em fêmeas desafiadas com LPS e tratadas com B5<sup>1A</sup> ou L64.** A administração de LPS, B5<sup>1A</sup> e/ou L64 não alteraram o BDNF sérico.



Fonte: Elaborada pela autora.  
Resultados em média  $\pm$  desvio padrão.

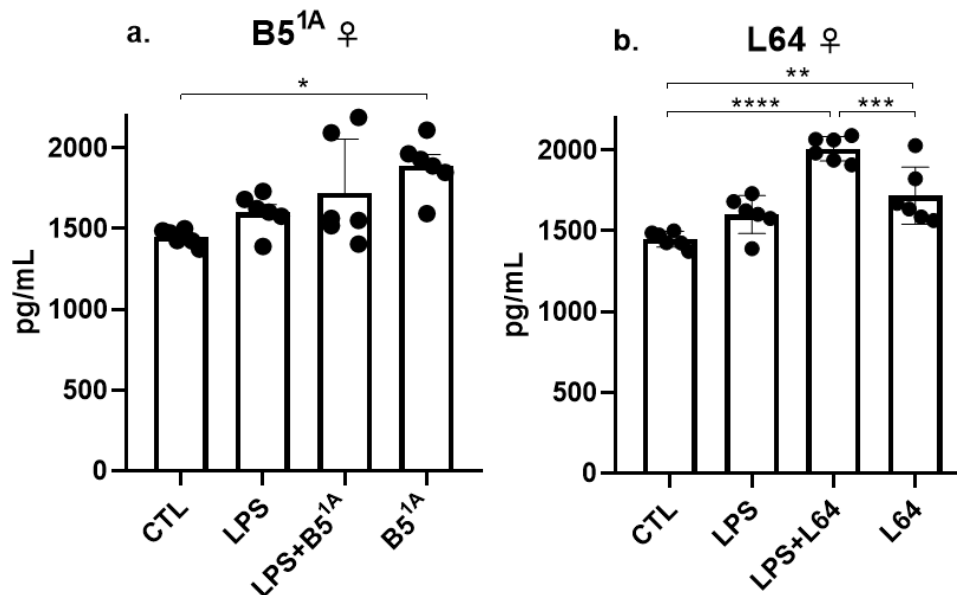
5

Não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos, com  $p = 0,8528$  (ANOVA unidirecional) para B5<sup>1A</sup> e  $p = 0,1277$  (ANOVA unidirecional) para L64.

Os níveis de BDNF também foram avaliados no hipocampo (figura 33).

10

**Figura 33 – Dosagem de BDNF hipocampal em fêmeas desafiadas com LPS e tratadas com B5<sup>1A</sup> ou L64.** A administração de B5<sup>1A</sup> e L64 aumentaram os níveis de BDNF hipocampal.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: \*( $p \leq 0,05$ ), \*\*( $p \leq 0,01$ ), \*\*\*( $p \leq 0,001$ ) e \*\*\*\*( $p \leq 0,0001$ ) representam diferença entre os grupos (teste de Tukey). Resultados em média  $\pm$  desvio padrão.

15

Não encontramos diferença na concentração hipocampal de BDNF entre os grupos CTL e o LPS nas análises realizadas por ANOVA unidirecional. No entanto,

20

ambos os grupos que receberam apenas o probiótico i.g. e salina i.p., isto é, os grupos controle das bactérias, apresentaram aumento de BDNF hipocampal, com valor de  $p = 0,0048$  no grupo B5<sup>1A</sup> (teste de Tukey) e  $p = 0,0032$  (teste de Tukey) no grupo L64. Ainda, de forma interessante, L64 administrado em animais expostos a

5 LPS teve níveis aumentados de BDNF em relação aos animais que receberam L64, mas que não foram desafiados com LPS.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Análise do consumo alimentar, massa corporal e escore clínico

A perda de massa corporal é uma característica importante no desafio com LPS, fortemente associada à anorexia (Khodaei *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023). Em todos os experimentos, foi observado perda de massa corporal em animais que receberam LPS, corroborando estudos anteriores. Um exemplo é o trabalho de Khodaei *et al.* (2022), no qual camundongos C57BL/6 machos que receberam 1,0 mg/Kg de LPS em dose única via intraperitoneal apresentaram um pico de perda de peso de até 14,4% no segundo dia, retornando ao peso original apenas no quinto dia após o desafio. No estudo de Yang *et al.* (2022), apesar de diferença no delineamento experimental, que consistiu na administração de LPS por uma semana na dose de 1,5 mg/Kg, também foram observadas perda de peso, anorexia e mudanças no metabolismo lipídico.

É bem estabelecido que a interação entre o sistema imune e o metabolismo é altamente conservada evolutivamente entre os metazoários, uma vez que o combate de patógenos demanda um alto custo energético (Yang *et al.*, 2022). Por isso, é essencial um controle refinado do gasto metabólico de forma sistêmica. Dessa forma, a infecção, ou no caso do nosso trabalho, a simulação de uma infecção por bactéria Gram-negativa provoca alterações profundas nas vias da glicose, lipídeos e proteína, mobilizando reservas do organismo. Esse processo é acompanhado de modificações comportamentais, como a anorexia, uma característica importante do *sickness behavior* (Yang *et al.*, 2022).

A administração B5<sup>1A</sup> em machos e fêmeas não foi capaz de atenuar esses efeitos do desafio com LPS, ou mesmo contribuir para a recuperação da massa corporal do animal, diferente do que foi relatado por outros trabalhos: no experimento realizado por Murray *et al.* (2019), a administração preventiva da cultura de kefir contendo *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus acidophilus*, além de leveduras, foi capaz de atenuar a perda de peso. Já a administração de L64 em fêmeas se mostrou promissor: no D5, entre os grupos desafiados com LPS, apenas o grupo tratado com L64 passou a não apresentar diferença significativa em relação ao grupo CTL, apesar de não termos encontrado diferença estatística entre os grupos LPS e LPS+L64.

Outra observação realizada foi a diferença entre os sexos na perda de peso após o desafio com LPS. Enquanto os machos registraram pico de perda de peso no D1 e recuperação até o D3, as fêmeas tiveram pico de perda de peso somente no D2, mas que perdurou até o D5, mostrando possível caráter sexo-dependente na resposta ao desafio com LPS.

Em relação ao escore clínico, a dose de 1,5 mg/Kg de LPS provocou, além dos sinais analisados para a pontuação do estado clínico do animal, alteração da consistência das fezes e observação de edema e/ou vermelhidão no local da aplicação. Mostramos também que o efeito da piora no escore clínico é dose dependente, com a dose de 5,0 mg/Kg provocando impactos maiores e mais prolongados que as doses menores testadas. Apesar do sucesso na observação de diferença estatística entre o grupo CTL e o grupo 1,5 mg/Kg tanto em machos, quanto em fêmeas, não foi possível avaliar se a administração de B5<sup>1A</sup> foi capaz de acelerar a recuperação dos machos, já que a recuperação ocorreu de forma rápida e espontânea neste sexo. Esses dados são consistentes com o estudo de Murray *et al.* (2019), no qual foi observado pico da piora do escore clínico entre 10 a 20 horas após o desafio com LPS na dose de 1,5 mg/Kg, com diminuição da pontuação a partir desse ponto, que se iguala ao grupo CTL após 40h. Entretanto, tivemos sucesso em observar a melhora do escore clínico nos animais fêmeas que receberam L64 após 24 horas do desafio, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos LPS e LPS+L64 após 48h do desafio com LPS. Já nos animais que receberam B5<sup>1A</sup>, observamos que no D2, entre os grupos desafiados com LPS, somente aquele tratado com a B5<sup>1A</sup> (grupo LPS+B5<sup>1A</sup>) passou a não apresentar diferença significativa em relação ao grupo CTL, apesar de não termos detectada diferença estatística entre os grupos LPS e LPS+B5<sup>1A</sup>.

Estes resultados sugerem diferenças entre os sexos na resposta e tempo de recuperação diante do desafio com LPS.

## 6.2 Impactos no órgão imune secundário: baço

Outra alteração característica causada pela administração de LPS é o aumento do tamanho do baço, que foi estimado nesse trabalho pelo registro da massa de cada baço coletado no momento da eutanásia. Houve aumento no peso relativo do baço em todos os grupos que receberam LPS, corroborando com os

estudos anteriores (Liu *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2023). De acordo com Ma *et al.* (2023), esse efeito possui relação com a inflamação sistêmica, principalmente com níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL6.

5       Devido a alteração no peso relativo do baço, algumas medidas imunológicas como MPO, EPO e NAG foram avaliadas neste órgão. Houve aumento significativo da atividade de MPO apenas entre os machos, indicando que o LPS causou infiltração de neutrófilos no baço. Os estudos sobre a infiltração de leucócitos nesse órgão geralmente focam em modelos de endotoxemia e sepse, que empregam doses elevadas de LPS, tornando a comparação com o presente estudo mais  
10       desafiadora. Entretanto, há registros na literatura de aumento da atividade de MPO em camundongos machos da linhagem *Swiss* após a administração de uma única dose de 10 mg/Kg de LPS (Alblihed *et al.*, 2020). Embora a dose utilizada em nosso estudo seja mais de seis vezes menor, nossos achados corroboram esses resultados.

15       Em contraste, não foi observada diferença significativa da atividade de MPO, EPO e NAG entre as fêmeas, sugerindo ausência de aumento do recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, respectivamente, no baço sete dias após o desafio com LPS. Assim, encontramos diferença na atividade de MPO entre os machos e fêmeas, o que pode ter sido resultante da menor infiltração de neutrófilos  
20       no baço e/ou *clearance* mais efetivo entre as fêmeas.

      Em relação a atividade de macrófagos no baço, esse achado contrasta com os resultados obtidos por Alblihed *et al.* (2020), que observaram um aumento na produção da citocina MCP1 no baço, responsável por estimular a migração e infiltração de monócitos/macrófagos.

25

### **6.3 Caracterização da atividade de MPO e EPO no fígado e regiões do intestino delgado e cólon**

      Durante a endotoxemia, isto é, presença de endotoxina no sangue, o balanço entre bactérias gram-positivas e gram-negativas se altera, levando ao aumento da  
30       permeabilidade intestinal (Sogut *et al.*, 2021). Ainda, o LPS provoca lançamento de mediadores como radicais livres, mieloperoxidase, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, impactando não somente o intestino, mas também outros órgãos e sistemas (Sogut *et al.*, 2021).

Em relação ao fígado, Sogut *et al.* (2021) observaram aumento de MPO após 24h no fígado de ratos que receberam LPS em dose única de 1,5 mg/Kg, além de aumento de marcadores de estresse oxidativo, caracterizando o efeito hepatotóxico do LPS em murinos. Entretanto, nossos dados mostraram uma diminuição significativa da atividade de MPO no fígado. Assim, esse resultado foi contrastante, e pode ser resultante do intervalo de tempo que o tecido foi coletado para a análise, além de variações na susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos, quanto a diferença na distribuição e intensidade da resposta imune apresentada por esses animais.

Em nosso trabalho, também caracterizamos a respostas das regiões do intestino e do cólon após a administração intraperitoneal de LPS em camundongos C57BL/6 e verificamos a diminuição de EPO no jejuno, íleo e cólon em animais desafiados ao LPS, apesar destes não apresentarem diferença para atividade de MPO.

#### 6.4 Dosagem de sIgA

Não houve diferença nos níveis de sIgA entre o grupo CTL e o grupo LPS em ambos os sexos. Porém, foi observado que o grupo LPS+B5<sup>1A</sup> teve aumento de sIgA em fêmeas, sem que o mesmo fenômeno fosse observado no grupo B5<sup>1A</sup>. Assim, é possível dizer que os níveis de sIgA aumentam quando há presença simultânea de LPS e B5<sup>1A</sup>.

O intestino delgado é uma região rica em IgA secretora (sIgA), produzida em resposta aos antígenos de origem alimentar ou de microrganismos, atuando como primeira linha de defesa imunológica na superfície das mucosas, exercendo importante papel na homeostase da barreira intestinal (Pietrzak *et al.*, 2020). Dessa forma, é possível que o LPS e B5<sup>1A</sup> tenham agido de forma sinérgica para o aumento de sIgA no conteúdo intestinal dos animais. Um dos mecanismos de proteção exercida por IgA baseia-se na ligação desta com microrganismos ou suas toxinas, impedindo a interação destes antígenos diretamente com o epitélio. (Ghosh *et al.*, 2020). Assim, é necessário experimentos para avaliação da translocação bacteriana e permeabilidade intestinal nesses animais, a fim de entender a natureza (deletéria ou protetora) da resposta causada por B5<sup>1A</sup> em animais desafiados com LPS.

## 6.5 Dosagem de AGCC

Apesar de relatos na literatura sobre o papel dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no eixo microbiota-intestino-cérebro, não encontramos diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos AGCC analisados no nosso estudo.

5 Esse resultado corrobora parcialmente com os achados de Yan *et al.* (2020), que realizaram dosagem de AGCC no conteúdo cecal de camundongos C57BL/6 24h após o desafio com LPS de *E. coli* O55:B5 (1 mg/Kg). Neste trabalho, os autores encontraram diminuição somente do nível de butirato em relação ao grupo CTL, porém, ausência de diferenças significativas para os outros AGCC. Em contraste,  
10 Bhatia *et al.* (2022) encontraram diminuição nos níveis de acetato, propionato, butirato e lactato 24h após os camundongos C57BL/6 serem desafiados com LPS (*E. coli* O55:B5, 10 mg/Kg). Essa diferença encontrada em literatura possivelmente resulta da dose de LPS utilizada.

Diante desses dados, é possível inferir que o intervalo de tempo entre o  
15 desafio do LPS e a coleta de amostras pode ter sido responsável pelos resultados encontrados no nosso estudo.

## 6.6 Dosagem de BDNF

Em relação a comparação entre os grupos CTL e LPS da dosagem de BDNF  
20 hipocampal, não foi encontrado diferença entre estes grupos na análise por ANOVA unidirecional. Na literatura, encontramos resultados divergentes em relação a esse parâmetro: Guo *et al.* (2014) observaram diminuição de BDNF hipocampal em camundongos ICR machos após 16 dias de administração diária de 0,83 mg/Kg de LPS. Já Zaichenko *et al.* (2023) relataram ausência de diferença significativa na  
25 expressão de BDNF hipocampal em ratos submetidos a LPS de forma aguda ou crônica, o que corrobora com os resultados encontrados em nosso trabalho. No nosso trabalho, a avaliação dos níveis de BDNF foi realizado em tecidos extraídos após sete dias da dose única de LPS em concentração intermediária. Esse intervalo pode ter sido responsável por esse resultado. Vale ainda destacar que quando os  
30 grupos CTL e LPS são isolados e avaliados pelo teste t de Student, é observado que a média no grupo LPS se encontra aumentado em relação a do grupo CTL. Esse resultado, embora contrastante, pode ser indicativo de um mecanismo de compensação, levando a um pico temporário de BDNF nesses animais.

De forma interessante, tanto B5<sup>1A</sup> quanto L64 foram capazes de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo. L64, em especial, provocou aumento de BDNF em animais desafiados com LPS, o que sugere um efeito neuroprotetor.

A literatura relata que as alterações dos níveis de BDNF depende do tipo de estressor, além da resposta ser diferente de acordo com a linhagem e idade dos animais no momento da exposição (Bath, Schilit; Lee, 2013). Assim, é necessário dados complementares como a dosagem de expressão do receptor de BDNF e dosagem do próprio BDNF em outras regiões do encéfalo para melhor entendimento da relação entre o desafio com LPS e os níveis de BDNF no hipocampo.

Já no soro, não foi observada diferença significativa quanto aos níveis de BDNF entre os grupos testados.

## **6.7 Experimentos comportamentais:**

### **6.7.1 Atividade locomotora e exploratória**

No experimento piloto utilizando animais machos, observamos déficit locomotor no grupo que recebeu dose de LPS 5,0 mg/Kg. Esse resultado foi contrastante com os achados de Ramalho *et al.* (2022) cujo estudo utilizou sorotipo da *E. coli* diferente do utilizado em nossos experimentos. No trabalho de Anderson *et al.* (2015), no qual animais CD-1 foram submetidos ao desafio com LPS da *E. coli* O111:B4, o déficit locomotor persistiu após 30 dias do desafio. Ainda, a atividade locomotora permaneceu prejudicada após 48h em camundongos C57BL/6 machos desafiados com dose única de 5,0 mg/Kg com LPS de *E. coli* O55:B5 (Bardaghi *et al.*, 2023).

Diante disso, é possível inferir que a origem do LPS e o intervalo entre o desafio e o teste comportamental sejam fatores responsáveis pela discrepância nos resultados obtidos no teste de campo aberto, usado como parâmetro para a locomoção e atividade exploratória do animal.

Em experimentos testando a dose de LPS 1,5 mg/Kg, tanto os animais machos quanto as fêmeas não apresentaram diminuição da distância percorrida no campo aberto. Esse dado corrobora os dados publicados por Murray *et al.* (2019), que submeteram camundongos com 6 semanas, uma fase correspondente à puberdade e mais susceptível aos efeitos do LPS, a um desafio com LPS na dose de 1,5 mg/Kg, na qual não foi observado diferença locomotora entre os grupos.

### 6.7.2 Cognição

É relatado em alguns trabalhos a presença de déficit cognitivo em animais desafiados com LPS. Em nossos resultados, não foram observados déficits na memória de curto prazo avaliada pelo Y-maze. Esse resultado está em concordância com o estudo de Morimoto *et al.* (2023), no qual camundongos machos C57BL/6 receberam uma dose única de 3,0 mg/Kg de LPS, proveniente de *E. coli* O111:B4. Sete dias após a administração, os animais foram submetidos a três testes de cognição. Os autores observaram diferenças significativas entre os grupos CTL e LPS apenas nos testes de reconhecimento e realocação de objetos, que avaliaram a memória de curto prazo, mas não identificaram diferenças no número de sequências realizadas no labirinto em Y.

No trabalho desenvolvido por Almeida (2022), B5<sup>1A</sup> melhorou a cognição em animais infectados com MHV-3 no teste de reconhecimento e realocação de objetos, realizados com intervalo curto entre a fase de treinamento e teste, avaliando, assim como Morimoto *et al.* (2023), a memória de curto prazo. Diante desses resultados, é possível que o teste aplicado em nosso trabalho, o teste de labirinto em Y, não tenha sido o mais adequado para capturar o efeito tanto do LPS quanto de B5<sup>1A</sup> sobre a memória.

### 6.7.3 Comportamento tipo depressivo e ansioso

No FST, tivemos sucesso em observar aumento do tempo de imobilidade entre as fêmeas desafiadas com LPS 1,5 mg/Kg, mas não em machos. Esse resultado corrobora com os achados de Murray *et al.* (2019), na qual camundongos CD-1 de 6 semanas foram desafiados a LPS de *E. coli* O26:B6 e avaliados uma semana após o desafio por FST: somente as fêmeas apresentaram diferença entre o grupo que recebeu salina i.p. e o grupo que recebeu LPS i.p. Ainda, foi observado diferença entre os sexos na inflamação central e periférica, com as fêmeas apresentando resposta inflamatória central mais robusta que os machos.

No EPM, nenhuma dose testada em machos provocou alterações nos parâmetros avaliados. Da mesma forma, as fêmeas também não apresentaram comportamento tipo ansioso nesse teste, em desafio com LPS na dose de 1,5 mg/Kg. Esses dados corroboram parcialmente com o que foi observado por Murray *et al.*, (2019), na qual as fêmeas apresentaram comportamento tipo ansioso avaliado

pelos parâmetros porcentagem de permanência no braço aberto e porcentagem de entradas no braço aberto. Essa discrepância pode ter ocorrido devido a diferença no sorotipo da *E. coli* da qual foi extraído o LPS.

5 Outra dificuldade na comparação com os trabalhos anteriores é a diferença no intervalo entre o desafio de LPS e a realização do teste de EPM, visto que na maioria dos trabalhos encontrados em literatura, os animais são submetidos ao EPM entre 24 e 48h após o desafio. Inclusive, no experimento anterior realizado no nosso projeto, as fêmeas apresentaram diminuição na porcentagem de permanência no braço aberto nas doses de 0,5 mg/Kg e 1,0 mg/Kg após 48h do desafio do LPS  
10 (dados não apresentados). Porém, o mesmo não ocorreu com os machos, evidenciando a diferença sexo e dose-dependente ao desafio.

Outra ressalva a ser realizada na análise do comportamento tipo depressivo e ansioso está nos parâmetros adotados. Neste trabalho, utilizamos critérios clássicos como o tempo de imobilidade no nado forçado para avaliação do comportamento do tipo depressivo; e porcentagem de tempo de permanência no braço aberto e porcentagem de entradas no braço aberto para avaliação do comportamento do tipo  
15 ansiedade. Entretanto, alguns trabalhos sugerem a inclusão de índices etológicos como registro do estilo do nado e tentativas de salto no FST (Juszczak *et al.*, 2008), bem como o registro de medidas de avaliação de risco como espreitas (o animal retorna a sua posição após estender o seu corpo para explorar, sem retirar as patas  
20 traseiras do local), *head-dipping* (o animal se posiciona com a cabeça e ombros para explorar o espaço abaixo do chão no braço aberto) e retorno aos braços fechados (Carobrez; Bertoglio, 2005).

## 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, observamos que o desafio com LPS provoca perda de massa corporal, anorexia, piora no escore clínico e aumento do peso relativo do baço tanto em machos quanto em fêmeas. Entre estes parâmetros, o tratamento com a L64 foi  
5 efetivo para melhora no escore clínico entre as fêmeas.

O aumento da atividade de mieloperoxidase no baço foi observada apenas entre os machos, sem reversão com a administração de B5<sup>1A</sup>. Já nos níveis de sIgA, apesar de não termos encontrado diferença entre os grupos CTL e o LPS, em ambos os sexos, o grupo LPS+B5<sup>1A</sup> teve aumento neste parâmetro entre as fêmeas.  
10 Os níveis de AGCC e lactato, por sua vez, não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Observamos, ainda, que a dose única de LPS 1,5 mg/Kg em camundongos C57BL/6 fêmeas é capaz de provocar comportamento tipo depressivo evidenciado pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado realizado sete dias  
15 após o desafio com LPS, sem que ocorra comprometimento da atividade locomotora dos animais. Todavia, o mesmo esquema de administração de LPS não provocou comportamento tipo depressivo em machos, o que corrobora com o caráter sexo-dependente dos efeitos da administração de LPS. Embora o modelo de comportamento tipo depressivo tenha sido estabelecido entre as fêmeas, a  
20 administração de B5<sup>1A</sup> ou L64 não apresentou efeito terapêutico no esquema de administração adotado neste estudo. Contudo, a administração de B5<sup>1A</sup> ou L64 aumentou os níveis de BDNF hipocampal, sugerindo possível efeito neuroprotetor.

Assim, temos como perspectivas a dosagem de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos cerebrais e soro coletados, além de realização de análises  
25 complementares dos testes comportamentais registrados, bem como experimentos de permeabilidade intestinal e translocação bacteriana para verificar a natureza do aumento de sIgA apresentada nos animais desafiados com LPS e tratados com B5<sup>1A</sup>. Além disso, há necessidade de mais estudos para averiguar o potencial psicobiótico da B5<sup>1A</sup> e L64.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, F. A. *et al.* Treatment with *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> attenuates intestinal damage and inflammatory response in experimental colitis. **Beneficial Microbes**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 47-57, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2019.0098>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- ACIKGOZ, B.; DALKIRAN, B.; DAYI, A. An overview of the currency and usefulness of behavioral tests used from past to present to assess anxiety, social behavior and depression in rats and mice. **Behavioural Processes**, [s.l.], v. 200, p. 1-8, ago. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2022.104670>. Acesso em: 08 set. 2024.
- ALBLIHED, M. *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates oxidative challenge and inflammatory response associated with lipopolysaccharide-mediated sepsis in mice. **Human & Experimental Toxicology**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 342-354, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0960327120949618>. Acesso em: 07 fev. 2025.
- ALMEIDA, V. M. *et al.* Gut microbiota from patients with COVID-19 cause alterations in mice that resemble post-COVID symptoms. **Gut Microbes**, [s.l.], v.15, n. 2, p. 1-22, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2249146>. Acesso em: 07 set. 2023.
- ALWINDI, M.; BIZANTI, A. Vesicular monoamine transporter (VMAT) regional expression and roles in pathological conditions. **Heliyon**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. 1-12, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22413>. Acesso em: 30 abr. 2024.
- ANDERSON, S. T. *et al.* Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 43, p. 98-109, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.007>. Acesso em: 24 jan. 2025.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA (APA) (org.). **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- BARDAGHI, Zahra *et al.* Memantine, an NMDA receptor antagonist, protected the brain against the long-term consequences of sepsis in mice. **Life Sciences**, [s.l.], v. 323, p. 1-11, jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121695>. Acesso em: 09 fev. 2025.
- BAUER, M. E.; TEIXEIRA, A. L. Neuroinflammation in Mood Disorders: role of regulatory immune cells. **Neuroimmunomodulation**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 99-107, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000515594>. Acesso em: 29 mar. 2024.
- BECKER, M.; PINHASOV, A.; ORNOY, A. Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? **Diagnostics**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 123-154, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010123>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- BATH, K.G.; SCHILIT, A.; LEE, F.S. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. **Neuroscience**, [s.l.], v. 239, p. 149-156, jun. 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.074>. Acesso em: 10 mar. 2025.

BENEDETTI, F. *et al.* Higher baseline interleukin-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  hamper antidepressant response in major depressive disorder. **European Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 42, p. 35-44, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.11.009>. Acesso em: 03 abr. 2024.

BHATIA, R. *et al.* Lactic Acid Bacterial Supplementation Ameliorated the Lipopolysaccharide-Induced Gut Inflammation and Dysbiosis in Mice. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 13, p. 1-16, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.930928>. Acesso em: 13 mar. 2025.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2023. 1107 p.

BROWN, S. J.; HUANG, X.; NEWELL, K. A. The kynurenine pathway in major depression: what we know and where to next. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 127, p. 917-927, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.05.018>. Acesso em: 26 fev. 2024.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 8, p. 1193-1205, mai. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>. Acesso em: 26 fev. 2025.

CASARO M. B. *et al.* A probiotic has differential effects on allergic airway inflammation in A/J and C57BL/6 mice and is correlated with the gut microbiome. **Microbiome**, [s.l.], v. 9, n. 134, p. 1-16, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01081-2>. Acesso em: 02 jun. 2023.

CAVALERI, D. *et al.* The role of BDNF in major depressive disorder, related clinical features, and antidepressant treatment: insight from meta-analyses. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 149, p. 1-8, jun. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105159>. Acesso em: 10 fev. 2024.

CHAMBERLAIN, S. R.; BALDWIN, D. S. Monoamine Oxidase Inhibitors (MAOIs) in Psychiatric Practice: how to use them safely and effectively. **Cns Drugs**, [s.l.], v. 35, n. 7, p. 703-716, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40263-021-00832-x>. Acesso em: 05 fev. 2024.

CHANG, J. P. *et al.* Antidepressant Drugs: mechanisms of action and side effects. In: DELLA SALA, Sergio (ed.). **Encyclopedia of Behavioral Neuroscience**. 2. Ed. Elsevier, 2022. p. 613-626. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819641-0.00105-5>. Acesso em: 07 mar. 2024.

CHEN, J.; CHEN, X.; HO, C. Recent Development of Probiotic Bifidobacteria for Treating Human Diseases. **Frontiers In Bioengineering and Biotechnology**, [s.l.], v. 9, p. 1-17, 22 dez. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.770248>. Acesso em: 09 fev. 2024.

CHENG, Y.; LIU, J.; LING, Z. Short-chain fatty acids-producing probiotics: a novel source of psychobiotics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 62, n. 28, p. 7929-7959, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1920884>. Acesso em: 31 ago. 2023.

CHOE, J. (ed.). **Encyclopedia of Animal Behavior**. 2. ed. Cambridge (EUA): Academic Press, 2019. 1 v.

CORREIA, A. S.; CARDOSO, A.; VALE, N. BDNF Unveiled: exploring its role in major depression disorder serotonergic imbalance and associated stress conditions. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 1-14, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082081>. Acesso em: 19 jan. 2025.

CORREIA, A. S.; VALE, N. Tryptophan Metabolism in Depression: a narrative review with a focus on serotonin and kynurenine pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 15, p. 8493-8510, jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23158493>. Acesso em: 18 jan. 2024.

COSTA, Bruno Gallotti. **Efeito probiótico de bactérias isoladas do leite materno humano como estratégia terapêutica em modelo de obesidade experimental**. 2024. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/79815>. Acesso em: 18 out. 2025.

DAMACENO, Q. S. *et al.* Isolation and Identification of Potential Probiotic Bacteria from Human Milk. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 491-501, 20 out. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-021-09866-5>. Acesso em: 21 dez. 2024.

DEMIN, K. A. *et al.* Animal models of major depressive disorder and the implications for drug discovery and development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 365-378, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1575360>. Acesso em: 02 fev. 2025.

DÍAZ, R. *et al.* Comparative Genomic Analysis of Novel *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Strains Reveals Functional Divergence in the Human Gut Microbiota. **Microorganisms**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. 1906-1924, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091906>. Acesso em: 05 de jan. 2024.

DINAN, T.G.; STANTON, C., CRYAN, J.F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 74, n. 10, p. 720-726, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DING, Y. *et al.* A next-generation probiotic: *Akkermansia muciniphila* ameliorates chronic stress-induced depressive-like behavior in mice by regulating gut microbiota and metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 105, n. 21-22, p. 8411-8426, 7 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11622-2>. Acesso em: 17 mar. 2024.

DIONISIE, V. *et al.* The anti-inflammatory role of SSRI and SNRI in the treatment of depression: a review of human and rodent research studies. **Inflammopharmacology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 75-90, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00777-5>. Acesso em: 21 set. 2024.

EDINOFF, A. N. *et al.* Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: a narrative review. **Neurology International**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 387-401, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/neurolint13030038>. Acesso em: 02 mar. 2024.

FERNANDES, H. B. *et al.* Behavioral, neurochemical and neuroimmune features of RasGEF1b deficient mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 129, p. 1-16, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110908>. Acesso em: 01 fev. 2024.

FERRARI, A. J. (org.). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Psychiatry**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 137-150, fev. 2022. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00395-3](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00395-3).

FONSECA, J. F. *et al.* Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> and *Weissella paramesenteroides* WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 127, n. 4, p. 1184-1191, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14338>. Acesso em: 05 jul. 2023.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Rome: FAO, 2002.

FREIS, E. D. Mental Depression in Hypertensive Patients Treated for Long Periods with Large Doses of Reserpine. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 251, n. 25, p. 1006-1008, dez. 1954. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/nejm195412162512504>. Acesso em: 04 jun. 2023.

FRIES, G. R. *et al.* Molecular pathways of major depressive disorder converge on the synapse. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 284-297, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01806-1>. Acesso em: 29 nov. 24.

FUKUMORI, C. *et al.* Maternal supplementation with a synbiotic has distinct outcomes on offspring gut microbiota formation in A/J and C57BL/6 mice, differentially affecting airway inflammatory cell infiltration and mucus production. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 61, n.1, p. 1-10, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103496>. Acesso em: 05 abr. 2023.

FURUYAMA, N.; SIRCILI, M. P. Outer Membrane Vesicles (OMVs) Produced by Gram-Negative Bacteria: structure, functions, biogenesis, and vaccine application. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2021, p. 1-16, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/1490732>. Acesso em: 28 fev. 2024.

FUX, A. C. *et al.* Heterogeneity of Lipopolysaccharide as Source of Variability in Bioassays and LPS-Binding Proteins as Remedy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 24, n. 9, p. 1-34, maio 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24098395>. Acesso em: 04 set. 2024.

GARCEZ, M. L. *et al.* Sodium butyrate improves memory and modulates the activity of histone deacetylases in aged rats after the administration of d-galactose. **Experimental Gerontology**, [s.l.], v. 113, n. 1, p. 209–217, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.10.005>. Acesso em: 04 set. 2023.

- GENCTURK, S.; UNAL, G. Rodent tests of depression and anxiety: construct validity and translational relevance. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 191-224, 27 fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3758/s13415-024-01171-2>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- GHOSH, S. *et al.* Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. **Journal of the Endocrine Society**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 1-15, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz039>. Acesso em: 06 mar. 2025.
- GUERRA, P. V. P. *et al.* Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium* containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World Journal of Gastroenterology**, [s.l.], v. 17, n. 34, p. 3916-3921, set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i34.3916>. Acesso em: 05 jul. 2023.
- GUEST, P.C. (ed.). **Pre-Clinical Models**: techniques and protocols. Nova Iorque (EUA): Humana New York, 2019. 343 p.
- GUILLOUX, J. P. *et al.* Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. **Journal Of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 197, n. 1, p. 21-31, abr. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019>. Acesso em: 30 jan. 2025.
- GUO, J. *et al.* Etazolate abrogates the lipopolysaccharide (LPS)-induced downregulation of the cAMP/pCREB/BDNF signaling, neuroinflammatory response and depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, [s.l.], v. 263, p. 1-14, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.008>. Acesso em: 06 mar. 2025.
- HAN, K.; HAM, B. How Inflammation Affects the Brain in Depression: a review of functional and structural MRI studies. **Journal of Clinical Neurology**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 503-515, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3988/jcn.2021.17.4.503>. Acesso em: 16 maio 2024.
- HAO, Y. *et al.* Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 19, p. 4827-4843, set. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20194827>. Acesso em: 06 fev. 2024.
- HELLMANN-REGEN, J. *et al.* Effect of Minocycline on Depressive Symptoms in Patients With Treatment-Resistant Depression. **Jama Network Open**, [s.l.], v. 5, n. 9, p. 1-13, 14 set. 2022. Disponível em: [10.1001/jamanetworkopen.2022.30367](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.30367). Acesso em: 02 mar. 2024.
- HIMANSHU, K. *et al.* A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. **Clinical Psychopharmacology And Neuroscience**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 341-351, 31 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.9758%2Fcpn.2020.18.3.341>. Acesso em: 16 fev. 2024.
- HOU, K. *et al.* Microbiota in health and diseases. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-28, 23 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>. Acesso em: 30 mar. 2024.
- HUANG, L. *et al.* Behavioral tests for evaluating the characteristics of brain diseases in rodent models: optimal choices for improved outcomes. **Molecular Medicine**

**Reports**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 1-11, 28 mar. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2022.12699>. Acesso em: 20 mar. 2024.

HUDA-FAUJAN, N. *et al.* The Impact of the Level of the Intestinal Short Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease Patients Versus Healthy Subjects. **The Open Biochemistry Journal**, [s.l.], v. 4, p. 53-58, 13 maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1874091x01004010053>. Acesso em: 01 dez. 2024.

INSTITUTE OF HEALTH METRICS AND EVALUATION (IHME). **Global Health Data Exchange** (GHDx). Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results?params=gbd-api-2019permalink/e6b0021f96d36a5de8647bd90b309713>. Acesso em: 18 de jun. 2023.

JIANG, Y. *et al.* Monoamine Neurotransmitters Control Basic Emotions and Affect Major Depressive Disorders. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 15, n. 10, p. 125-129, 28 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15101203>. Acesso em: 09 abr. 2024.

JOHNSTON, J. N. *et al.* Inflammation, stress and depression: an exploration of ketamine's therapeutic profile. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 28, n. 4, p. 1-13, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103518>. Acesso em: 06 jul. 2024.

JUSZCZAK, G. R. *et al.* Computer assisted video analysis of swimming performance in a forced swim test: simultaneous assessment of duration of immobility and swimming style in mice selected for high and low swim-stress induced analgesia. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 95, n. 3, p. 400-407, out. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.003>. Acesso em: 04 fev. 2025.

KANDEMIR, Ü. Etiopathogenesis of depression and experimental depression models used in preclinical studies. **European Journal of Life Sciences**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 78-90, 28 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.55971/EJLS.1327521>. Acesso em: 08 abr. 2024.

KHODAEI, S. *et al.* The Impact of Inflammation and General Anesthesia on Memory and Executive Function in Mice. **Anesthesia & Analgesia**, [s.l.], v. 136, n. 5, p. 1-13, 30 set. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0000000000006221>. Acesso em: 19 fev. 2025.

KIM, J. A quantitative analysis of spontaneous alternation behaviors on a Y-maze reveals adverse effects of acute social isolation on spatial working memory. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 1-13, 7 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41996-4>. Acesso em: 17 maio 2024.

KNIGHT, R. *et al.* The Microbiome and Human Biology. **Annual Review Of Genomics And Human Genetics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 65-86, 31 ago. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022438>. Acesso em: 08 dez. 2023.

KOH, A. *et al.* From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, [s.l.], n. 165, v. 6, p. 1332-1345, jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>. Acesso em: 25 mai. 2023.

LASSELIN, J. *et al.* Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: relevance for symptoms of anxiety and depression.

**Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 115, p. 15-24, ago. 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.001>. Acesso em: 08 abr. 2024.

LI, W. *et al.* Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s.l.], v. 92, p. 10-24, fev. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.008>. Acesso em: 28 abr. 2024.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.

**Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, jun. 1987. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/BF00177912>. Acesso em: 06 mar. 2024.

LIU, G. *et al.* Prophylactic effects of arketamine, but not hallucinogenic psychedelic DOI nor non-hallucinogenic psychedelic analog lisuride, in lipopolysaccharide-treated mice and mice exposed to chronic restrain stress. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 233, p. 1-7, dez. 2023. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2023.173659>. Acesso em: 01 fev. 2025.

LIU, Y. *et al.* Proteomics analysis of the gut–brain axis in a gut microbiota-dysbiosis model of depression. **Translational Psychiatry**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-8, 8 nov. 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01689-w>. Acesso em: 16 maio 2024.

LORENZO, F. D. *et al.* A Journey from Structure to Function of Bacterial

Lipopolysaccharides. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 122, n. 20, p. 15767-15821, 21 jul.

2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01321>. Acesso em: 11 jan. 2024.

MA, L. *et al.* Effects of spleen nerve denervation on depression–like phenotype, systemic inflammation, and abnormal composition of gut microbiota in mice after administration of lipopolysaccharide: A role of brain–spleen axis. **Journal of Affective Disorders**, [s.l.], v. 317, p. 156–165, nov. 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.08.087>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MARTINS, F. S. *et al.* Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 191, n. 8, p. 623-630, 13 jun. 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00203-009-0491-x>. Acesso em: 21 jul. 2023.

MATHIPA-MDAKANE, Moloko G.; THANTSHA, Mapitsi S.. *Lacticaseibacillus rhamnosus*: a suitable candidate for the construction of novel bioengineered probiotic strains for targeted pathogen control. **Foods**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. 785, 8 mar. 2022.

MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11060785>.

MAZGAEEN, L.; GURUNG, P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 379-

397, 7 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>. Acesso em: 16 jan. 2024.

MELLO, Bruna Stefânia Ferreira *et al.* Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Journal Of Neuroimmunology**, [s.l.], v.

320, p. 133-142, jul. 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.04.009>. Acesso em: 01 fev. 2024.

MENDES, E. *et al.* Prophylactic Supplementation of *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> Protects Mice from Ovariectomy-Induced Exacerbated Allergic Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-14, set. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01732>. Acesso em: 05 jul. 2023.

MICHÁN-DOÑA, A.; VÁZQUEZ-BORREGO, M.C.; MICHÁN, C. Are there any completely sterile organs or tissues in the human body? Is there any sacred place? **Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 1-4, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14442>. Acesso em: 29 out. 2024.

MILLS, S. Efficacy of *Bifidobacterium longum* alone or in multi-strain probiotic formulations during early life and beyond. **Gut Microbes**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 1-41, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2186098>. Acesso em: 15 ago. 2023.

MIRANDA, V. C *et al.* A Next-Generation Bacteria (*Akkermansia muciniphila* BAA-835) Presents Probiotic Potential Against Ovalbumin-Induced Food Allergy in Mice. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-15, 25 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10076-4>. Acesso em: 18 set. 2023.

MITHAIWALA, Mustafa N. *et al.* Neuroinflammation and the Kynurenine Pathway in CNS Disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Cells**, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 1-42, 19 jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10061548>. Acesso em: 09 nov. 2024.

MODESTO, M. *Bifidobacterium longum* subsp. *iuvenis* subsp. nov., a novel subspecies isolated from the faeces of weaning infants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 10, p. 1-13, 18 out. 2023. Disponível em: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.006013>. Acesso em: 30 jan. 2025.

MONTANO, C. B. *et al.* Considerations when selecting an antidepressant: a narrative review for primary care providers treating adults with depression. **Postgraduate Medicine**, [s.l.], v. 135, n. 5, p. 449-465, 5 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00325481.2023.2189868>. Acesso em: 08 mar. 2024.

MORIMOTO, K. *et al.* Short-term memory impairment following recovery from systemic inflammation induced by lipopolysaccharide in mice. **Frontiers in Neuroscience**, [s.l.], v. 17, p.1-15, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1273039>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MOSIOIEK, A. *et al.* Effects of Antidepressant Treatment on Neurotrophic Factors (BDNF and IGF-1) in Patients with Major Depressive Disorder (MDD). **Journal of Clinical Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 15, p. 1-17, 30 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm10153377>. Acesso em: 17 fev. 2025.

MURRAY, E. *et al.* Probiotic consumption during puberty mitigates LPS-induced immune responses and protects against stress-induced depression- and anxiety-like behaviors in adulthood in a sex-specific manner. **Brain, Behavior, And Immunity**,

[s.l.], v. 81, p. 198-212, out. 2019. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.016>. Acesso em: 13 out. 2024.

NAKAGAWASAI, O. *et al.* Long-term effects of a single high-dose intraperitoneal injection of lipopolysaccharide on depression-like behavior in adolescent mice. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 842, p. 1-5, 12 set. 2024. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2024.137989>. Acesso em: 17 jan. 2025.

NAYEM, J. *et al.* Altered serum TNF- $\alpha$  and MCP-4 levels are associated with the pathophysiology of major depressive disorder: a case-control study results. **Plos One**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 1-17, 15 nov. 2023. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294288>. Acesso em: 01 mar. 2021.

NETTIS, M. A. *et al.* Augmentation therapy with minocycline in treatment-resistant depression patients with low-grade peripheral inflammation: results from a double-blind randomised clinical trial. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 939-948, 28 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00948-6>. Acesso em: 02 abr. 2024.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 528-543, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1415-4714.2014v17n3p528-10>. Acesso em: 19 jan. 2025.

OBERMANN, J. *et al.* Analysis of cytokine levels, T regulatory cells and serotonin content in patients with depression. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 53, n. 10, p. 3476-3489, maio 2021. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1111/ejn.15205>. Acesso em: 01 mar. 2024.

OGLODEK, E. Changes in the Serum Levels of Cytokines: il-1 $\beta$ , il-4, il-8 and il-10 in depression with and without posttraumatic stress disorder. **Brain Sciences**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 387-400, 14 mar. 2022. Disponível em:  
<https://doi.org/10.3390/brainsci12030387>. Acesso em: 01 mar. 2024.

PAUL, E. R. *et al.* Peripheral and central kynurenine pathway abnormalities in major depression. **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 101, p. 136-145, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.01.002>. Acesso em: 09 fev. 2024.

PENNINX, B. W. *et al.* Anxiety disorders. **The Lancet**, [s.l.], v. 397, n. 10277, p. 914-927, mar. 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00359-7). Acesso em: 23 jan. 2025.

PIETRZAK, B. *et al.* Secretory IgA in Intestinal Mucosal Secretions as an Adaptive Barrier against Microbial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 23, p. 1-15, 4 dez. 2020. Disponível em:  
<https://doi.org/10.3390/ijms21239254>. Acesso em: 10 fev. 2025.

PIMENTA, J. *et al.* A suitable model to investigate acute neurological consequences of coronavirus infection. **Inflammation Research**, [s.l.], v. 72, n. 10-11, p. 2073-2088, 14 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00011-023-01798-w>. Acesso em: 22 mar. 2024.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of**

**Pharmacology**, [s.l.], v. 51, n. 3, p. 291-294, out. 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90414-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90414-4). Acesso em: 12 mar. 2023.

PRÉVOT, T.; SIBILLE, E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 151-167, 28 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0727-3>. Acesso em: 26 jan. 2024.

QUINTANILHA, M. F. *et al.* *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, [s.l.], v. 289, n. 1, p. 1-10, jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120243>. Acesso em: 26 jul. 2023.

RADFORD-SMITH, D.E.; ANTHONY, D. C. Prebiotic and Probiotic Modulation of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Depression. **Nutrients**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 1880-1908, 13 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu15081880>. Acesso em: 07 abr. 2024.

RAMALHO, J. B. Beneficial effects of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 treatment in an LPS-induced depression-like model in mice. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 426, p. 1-7, maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113847>. Acesso em: 15 out. 2024.

RAO, J. *et al.* Fecal microbiota transplantation ameliorates gut microbiota imbalance and intestinal barrier damage in rats with stress-induced depressive-like behavior. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 53, n. 11, p. 3598-3611, 10 maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ejn.15192>. Acesso em: 15 mar. 2024.

RIBEIRO, R. *et al.* Chronic hyperpalatable diet induces impairment of hippocampal-dependent memories and alters glutamatergic and fractalkine axis signaling. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 1-19, 29 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42955-9>. Acesso em: 22 mar. 2024.

RIBEIRO, W.R. *et al.* Preventive oral supplementation with *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> alleviates oxazolone-induced allergic contact dermatitis-like skin inflammation in mice. **Beneficial Microbes**, [s.l.], v. 12, n.2, p.199-209, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2020.0134>. Acesso em: 26 jul. 2023.

RUSTENHOVEN, J.; KIPNIS, J. Brain borders at the central stage of neuroimmunology. **Nature**, [s.l.], v. 612, n. 7940, p. 417-429, 14 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05474-7>. Acesso em: 06 out. 2024.

SANTOS, S. S. *et al.* *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5<sup>1A</sup> Attenuates Signs of Inflammation in a Murine Model of Food Allergy. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 63-73, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09846-9>. Acesso em: 27 jul. 2023.

SARKAR, S. *et al.* Influence of gender on cytokine induced depression and treatment. **Journal of Affective Disorders**, [s.l.], v. 292, p. 766-772, set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.05.087>. Acesso em: 24 mar. 2024.

SCHAUB, A. C. *et al.* Clinical, gut microbial and neural effects of a probiotic add-on therapy in depressed patients: a randomized controlled trial. **Translational**

**Psychiatry**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-10, 3 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01977-z>. Acesso em: 25 mar. 2024.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **Plos Biology**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 1-14, 19 ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>. Acesso em: 17 jun. 2024.

SETTANNI, C. R. *et al.* Gut microbiota alteration and modulation in psychiatric disorders: Current evidence on fecal microbiota transplantation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 109, n. 1, p. 1-15, jul. 2021. Acesso em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110258>. Acesso em: 27 jul. 2023.

SHARMA, N. *et al.* Beyond probiotics: a narrative review on an era of revolution. **Food Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 413–421, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01212-x>. Acesso em: 28 ago. 2023.

SHARMA, R. *et al.* Psychobiotics: The Next-Generation Probiotics for the Brain. **Current Microbiol**, [s.l.], v. 78, n. 2, p. 449–463, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02289-5>. Acesso em: 15 jun. 2023.

SILVA, A. K. S. *In vitro* evaluation of antagonism, modulation of cytokines and extracellular matrix proteins by *Bifidobacterium* strains. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 5, p. 497-505, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.13062>. Acesso em: 28 ago. 2023.

SIOPI, E. *et al.* Gut microbiota changes require vagus nerve integrity to promote depressive-like behaviors in mice. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 28, n. 7, p. 3002-3012, mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02071-6>. Acesso em: 08 mai. 2024.

SKRZYPCZAK-WIERCIOCH, A.; SAIAT, K. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: mechanisms of action, research application and future directions for its use. **Molecules**, [s.l.], v. 27, n. 17, p. 1-24, 26 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27175481>. Acesso em: 05 abr. 2024.

SMALHEISER, N. R. *et al.* Effect size, sample size and power of forced swim test assays in mice: Guidelines for investigators to optimize reproducibility. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p.1-12, 24 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243668>. Acesso em: 02 fev. 2024.

SOGUT, I. *et al.* The Comparative Effects of Inulin and *Bacillus clausii* on LPS-Induced Endotoxemic Rat Liver. **Journal Of Investigative Surgery**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 1322-1328, 21 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08941939.2022.2052210>. Acesso em: 09 fev. 2025.

SOUZA, T. C. *et al.* Cell viability and immune stimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> are differentially affected by technological variables in fermented milks. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 112, n. 6, p. 1184-1192, mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05280.x>. Acesso em: 27 jul. 2023.

SOUZA, T. C. *et al.* *In vitro* evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial Microbes**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 179-186, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2012.0052>. Acesso em: 27 jul. 2023.

TARTT, A. N. *et al.* Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 2689-2699, 30 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01520-y>. Acesso em: 01 mar. 2024.

TEWARI, N.; DEY, P. Navigating commensal dysbiosis: gastrointestinal host-pathogen interplay orchestrating opportunistic infections. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 286, p. 1-15, set. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127832>. Acesso em: 27 jul. 2024.

TIAN, P. *et al.* *Bifidobacterium breve* CCFM1025 attenuates major depression disorder via regulating gut microbiome and tryptophan metabolism: a randomized clinical trial. **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 100, p. 233-241, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.11.023>. Acesso em: 25 mar. 2024.

VERHAREN, J. P. H. *et al.* A computational analysis of mouse behavior in the sucrose preference test. **Nature Communications**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 1-13, 27 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38028-0>. Acesso em: 16 fev. 2024.

VIEIRA, A. T. *et al.* Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup>. **Microbes and Infection**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 180-189, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.10.008>. Acesso em: 26 jul. 2023.

VIEIRA, A.T. *et al.* Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> reduced inflammation in a murine experimental model of gout. **Beneficial Microbes**, [s.l.], v.6, n.6, p. 799-806, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2015.0015>. Acesso em: 26 jul. 2023.

WALF, A.; A FRYE, C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 322-328, fev. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>. Acesso em: 23 ago. 2024.

WANG, J. *et al.* The Dopamine Receptor D3 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 448-460, 30 jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy005>. Acesso em: 28 mar. 2024.

WEI, H. *et al.* Butyrate ameliorates chronic alcoholic central nervous damage by suppressing microglia-mediated neuroinflammation and modulating the microbiome-gut-brain axis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 160, n. 1, p.1-18, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114308>. Acesso em 4 set. 2023.

WU, S.; YIN, Y.; DU, L. Blood–Brain Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Major Depressive Disorder. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 42, n. 8, p. 2571–2591, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01153-9>. Acesso em: 05 jun. 2023.

YADAV, R.; GATI, C. Packaging monoamine neurotransmitters. **Cell Research**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 185-186, 19 jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00922-z>. Acesso em: 09 abr. 2024.

YAN, T. *et al.* Schisandra chinensis ameliorates depressive-like behaviors by regulating microbiota-gut-brain axis via its anti-inflammation activity. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 289-296, 5 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6799>. Acesso em: 10 mar. 2025.

YANG, Y. *et al.* Sustained Inflammation Induced by LPS Leads to Tolerable Anorexia and Fat Loss via Tlr4 in Mice. **Journal of Inflammation Research**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 5635-5648, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/JIR.S358518>. Acesso em: 26 fev. 2025.

YU, X. *et al.* Comparison of LPS and MS-induced depressive mouse model: behavior, inflammation and biochemical changes. **BMC Psychiatry**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 1-11, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12888-022-04233-2>. Acesso em: 05 ago. 2023.

ZAICHENKO, M. I. *et al.* Acute and Chronic Lipopolysaccharide-Induced Stress Changes Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in the Rat Brain Region-Specifically and Affects Learning and Memory. **Biochemistry**, [s.l.], v. 88, n. 4, p. 526-538, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0006297923040089>. Acesso em: 17 fev. 2025.

ZHANG, C. *et al.* Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 53, n. 1, p. 157-165, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.022>. Acesso em: 18 ago. 2023.

ZHANG, Q. *et al.* Gut Microbiome Composition Associated with Major Depressive Disorder and Sleep Quality. **Frontiers in Psychiatry**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-15 mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.645045>. Acesso em: 22 ago. 2023.

ZHANG, X. *et al.* Investigation of anti-depression effects and potential mechanisms of the ethyl acetate extract of *Cynomorium songaricum* Rupr. through the integration of in vivo experiments, LC-MS/MS chemical analysis, and a systems biology approach. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 14, p. 1-18, 25 out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1239197>. Acesso em: 29 abr. 2024.

ZHAO, H. *et al.* A pilot exploration of multi-omics research of gut microbiome in major depressive disorders. **Translational Psychiatry**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-12, 10 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01769-x>. Acesso em: 13 mar. 2024.

ZHAO, J. *et al.* Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-12, abr. 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>. Acesso em: 13 mar. 2024.

ZHAO, X. *et al.* Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 364, n. 1, p. 494-502, mai. 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.064>. Acesso em: 11 ago. 2023.

ZHENG, P. *et al.* Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 21, n.6, p. 786–796, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.44>. Acesso em: 05 jul. 2023.

ZUO, C. *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation exerts anti-inflammatory effects via modulating glial activation in mice with chronic unpredictable mild stress-induced depression. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 109, p. 1-5, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108788>. Acesso em: 29 abr. 2024.

## APÊNDICE A

**Quadro 1 – Experimentos *in vitro* realizados com B5<sup>1A</sup>.**

Fonte	Experimento	Resultados
Souza <i>et al.</i> , 2013	Avaliação de taxa de crescimento, aerotolerância, hidrofobicidade, atividade antagonista contra patógenos e sensibilidade a antimicrobianos de B5 <sup>1A</sup>	<p><b>B5<sup>1A</sup> apresentou:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Taxa de duplicação de <math>2.2 \pm 0.2h</math>, com taxa de crescimento máximo após 24 de incubação;</li> <li>• Aerotolerância em exposição ao oxigênio por 72 horas;</li> <li>• Hidrofobicidade <math>24,4 \pm 3,1\%</math>;</li> <li>• Halo de inibição contra <i>Bacillus cereus</i>, <i>Bacteroides fragilis</i>, <i>Bacteroides vulgatus</i>, <i>Clostridioides difficile</i>, <i>Clostridioides perfringens</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Shigella flexneri</i>, <i>Shigella sonnei</i>, <i>Salmonella Typhi</i>, <i>Salmonella Typhimurium</i> e <i>Vibrio cholerae</i>, mas não a <i>Candida albicans</i>.</li> <li>• Sensibilidade aos antimicrobianos cloranfenicol, penicilina G, piperacilina e vancomicina, mas resistência a neomicina.</li> </ul>
Silva <i>et al.</i> , 2018	Avaliação de atividade antagonista contra patógenos de pele, citotoxicidade, taxa de adesão e internalização, modulação de produção de citocinas e proteínas da matriz extracelular de B5 <sup>1A</sup> .	<p><b>B5<sup>1A</sup> apresentou:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade antagonista contra <i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 6919 e 51277; <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 51277, 25923 e 29213; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC, <i>Candida albicans</i> ATCC 18804; <i>Malassezia furfur</i> ATCC 44342; <i>Malassezia slooffiae</i> ATCC 44343);</li> <li>• Ausência de diminuição da taxa de viabilidade do cultivo de fibroblastos e queratinócitos em contato;</li> <li>• Alta capacidade de adesão, mas baixa capacidade de internalização;</li> <li>• Diminuição de IL-6 e IL-8 na cultura de fibroblastos previamente expostos ao patógeno <i>S. aureus</i> inativado, mas sem diferença para IL-1<math>\beta</math>, IL-18, IL-10, IL-17 e IL-19;</li> <li>• Ausência de diferença para a produção de colágeno pelos fibroblastos;</li> <li>• Aumento da produção de lumicana pelos fibroblastos.</li> </ul>

Quadro 2 – Estudos pré-clínicos realizados com B5<sup>1A</sup>.

Fonte	Experimento	Resultados
Vieira <i>et al.</i> , 2015	<p><b>Modelo de gota induzida por cristais de urato monossódico injetado na articulação tibiofemoral</b></p> <p><b>Animais:</b> Camundongos C57BL/6; machos; 8-10 semanas.</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amenização da hipernocicepção;</li> <li>• Reversão do aumento da contagem de leucócitos na área afetada, principalmente de neutrófilos;</li> <li>• Reversão do aumento da mieloperoxidase (MPO) no tecido periarticular;</li> <li>• Aumento de IL-10 no tecido periarticular após 6h;</li> <li>• Aumento de IL-1<math>\beta</math> no tecido periarticular após 6h, com diminuição significativa após 15h, revertendo o aumento de IL-1<math>\beta</math> causado por administração de MSU.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da quimiocina CXCL1 no tecido periarticular após 15 horas.</li> </ul> <p><b>Conclusão:</b> B5<sup>1A</sup> possui ação anti-inflamatória, com efeito de diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 em tratamento profilático.</p>
Vieira <i>et al.</i> , 2016	<p><b>Modelo de infecção pulmonar por <i>Klebsiella pneumoniae</i></b></p> <p><b>Animais:</b> Camundongos C57BL/6; 8-10 semanas.</p> <p><b>OBS:</b> <b>Grupo BL:</b> administração de B5<sup>1A</sup> viável. <b>Grupo BLi:</b> administração de B5<sup>1A</sup> inativado. <b>Ac:</b> administração de acetato</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Queda da taxa de mortalidade dos animais (BL e BLi);</li> <li>• Menor perda de massa corporal (BL e BLi);</li> <li>• Redução do número de leucócitos recrutados no lavado broncoalveolar (BL e BLi);</li> <li>• Aumento da capacidade dos macrófagos alveolares de produzirem ROS (BL e BLi);</li> <li>• Redução do dano, edema e infiltrado inflamatório no pulmão causado pela infecção, principalmente no BL;</li> <li>• Contagem reduzida de <i>K. pneumoniae</i> no lavado broncoalveolar (BL e BLi);</li> <li>• Reversão do aumento de IL-6 e TNF-<math>\alpha</math> no tecido pulmonar (BL e BLi);</li> <li>• Aumento de IL-10 no tecido pulmonar (BL e Ac).</li> </ul> <p><b>Conclusão:</b> B5<sup>1A</sup> possui ação protetora contra infecção por <i>K. pneumoniae</i> e estimula a produção de IL-10.</p>

<p>Mendes <i>et al.</i>, 2017</p>	<p><b>Modelo de inflamação pulmonar provocado por ovoalbumina em animais ovariectomizados</b></p> <p><b>Animais:</b> Balb/c; fêmea; 18-20g</p>	<p><b>A administração preventiva de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução da eosinofilia;</li> <li>• Redução da hiper-responsividade ao desafio com ovoalbumina;</li> <li>• Atenuação do aumento de IL5 no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Redução da produção exacerbada de muco;</li> <li>• Aumento do percentual de T<sub>reg</sub> no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Aumento da concentração de acetato nas fezes;</li> <li>• Aumento de IFN-<math>\gamma</math> no lavado broncoalveolar.</li> </ul> <p><b>No entanto:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não houve diferença significativa para IL10 no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Não houve diferença na concentração de butirato nas fezes.</li> </ul> <p><b>Conclusão:</b> B5<sup>1A</sup> atenuou a inflamação e responsividade exacerbada no modelo, quando administrada de forma preventiva, mas não foi capaz de atenuar a inflamação quando administrada após a instauração da doença.</p>
<p>Fonseca <i>et al.</i>, 2019</p>	<p><b>Modelo de infecção por <i>Giardia lamblia</i></b></p> <p><b>Animais:</b> Gerbos de ambos os sexos; 2-4 semanas</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor carga de trofozoítos no lúmen ou aderidos a vilosidades intestinais;</li> <li>• Aumento no número e tamanho das células caliciformes;</li> <li>• Aumento da produção de muco.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da profundidade das criptas intestinais;</li> <li>• Infiltração celular na lâmina própria do duodeno;</li> </ul> <p><b>Conclusão:</b> Uso de B5<sup>1A</sup> via oral reduz a carga de <i>Giardia lamblia</i> em animais infectados</p>

Fukumori <i>et al.</i> , 2019	<p><b>Modelo de inflamação pulmonar induzida por ovalbumina</b></p> <p><b>Animais:</b> Camundongos A/J e C57BL/6; administração de simbiótico em fêmeas durante a gestação e amamentação; avaliação da ninhada.</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> nos animais A/J resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reversão do aumento da neutrofilia no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Exacerbação da expressão de <i>Il13</i>, apresentando taxa superior a aqueles animais desafiados com ovoalbumina sem tratamento;</li> <li>• Redução de IgG2a específico à ovoalbumina;</li> <li>• Aumento da biodiversidade da microbiota.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da contagem total de células no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Aumento da eosinofilia no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Piora no escore clínico da região peribronquial;</li> <li>• Aumento da expressão de genes para <i>Il4</i> e <i>Il5</i> no tecido pulmonar, mas sem diferença para IFN-<math>\gamma</math>;</li> <li>• Aumento de IgG1 específico a ovoalbumina no soro;</li> <li>• Aumento da produção de muco.</li> </ul>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> nos animais C57BL/6 resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reversão do aumento da eosinofilia;</li> <li>• Diminuição da expressão de <i>Il5</i> no tecido pulmonar;</li> <li>• Redução da produção exacerbada de muco;</li> <li>• Melhora no escore clínico da região peribronquial;</li> <li>• Aumento da abundância relativa de <i>Lactobacillus</i>.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da contagem total de células no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Aumento de neutrofilia no lavado broncoalveolar;</li> <li>• Aumento da expressão de <i>Il4</i>, <i>Il13</i> e IFN-<math>\gamma</math> no tecido pulmonar;</li> <li>• Aumento de anticorpos IgG2a e IgG1 específicos a OVA no soro.</li> </ul>
		<p><b>Conclusão:</b> o mesmo simbiótico tem desdobramentos diferentes na ninhada dependendo da linhagem de camundongos.</p>	

<p>Abrantes <i>et al.</i>, 2020</p>	<p><b>Modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio</b></p> <p><b>Animais:</b> Camundongos Balb/c; fêmeas; 6-8 semanas</p> <p><b>OBS:</b> <b>Grupo T:</b> colite + tratamento com B5<sup>1A</sup> (somente após a indução da colite, ou seja, d10-d17) <b>Grupo TT:</b> colite + tratamento com B5<sup>1A</sup> (durante todo o período experimental, ou seja, d0-d17).</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Melhora no escore clínico (consistência de fezes e sangue oculto nas fezes);</li> <li>• Reversão no aumento da permeabilidade intestinal (T);</li> <li>• Atenuação da alteração da arquitetura do órgão (T e TT), da gravidade e extensão das lesões (T e TT) e infiltrados de inflamação (T);</li> <li>• Atenuação do aumento de IL-1<math>\beta</math> (T), MPO (T), EPO (T e TT) e sIgA (T);</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da massa corporal;</li> <li>• Diminuição do comprimento do cólon;</li> <li>• Aumento de CXCL1 e CCL1.</li> </ul> <p><b>Conclusão:</b> Administração de B5<sup>1A</sup> preservou a arquitetura intestinal, reduziu a permeabilidade intestinal e lesão no cólon, assim como atenuou a inflamação.</p>
<p>Casaro <i>et al.</i>, 2021</p>	<p><b>Modelo de inflamação pulmonar induzida por OVA</b></p> <p><b>Animais:</b> Camundongos A/J; machos; 5 semanas</p> <p><b>BL:</b> tratados com B5<sup>1A</sup> viável <b>Ac:</b> tratado com acetato i.p.</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução do infiltrado inflamatório no lavado broncoalveolar, com aumento de células mononucleares e diminuição de eosinófilos (BL e Ac);</li> <li>• Redução da produção exacerbada de muco no pulmão (BL e Ac);</li> <li>• Reversão do aumento da IL-4 no lavado broncoalveolar (BL e Ac);</li> <li>• Aumento de IFN-<math>\gamma</math> (BL) e diminuição em Ac;</li> <li>• Redução da produção de IgE específico a OVA (BL);</li> <li>• Aumento da indução de IgG2 específico a OVA (BL);</li> <li>• Redução de EPO;</li> <li>• Menor hiper-responsividade brônquica (BL);</li> <li>• Menor quantidade de Treg nos pulmões (BL);</li> <li>• Aumento da dosagem de acetato no soro;</li> <li>• Aumento da abundância de Lachnospiraceae, <i>Akkermansia</i>, <i>Clostridium</i>, <i>Eubacterium</i>, Muribaculaceae e <i>Oscillospira</i>.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• IgG1 específico a OVA</li> </ul> <p>* O mesmo tratamento não surtiu efeitos em camundongos C57BL/6; camundongos A/J implantados em fêmeas C57BL/6 apresentaram resultados semelhantes a C57BL/6.</p> <p><b>Conclusão:</b> o uso do mesmo probiótico causa diferentes consequências de acordo com a composição da microbiota do hospedeiro.</p>
Ribeiro <i>et al.</i> , 2021	<p><b>Modelo de inflamação de pele semelhante à dermatite provocado por oxalozona</b></p> <p><b>Animais:</b> Balb/c; fêmeas; 6 semanas;</p> <p><b>OBS:</b> <b>BL:</b> tratados com B5<sup>1A</sup> viável <b>BLi:</b> tratados com B5<sup>1A</sup> inativado <b>Ac:</b> tratado com acetato i.p.</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição do inchaço da orelha (BL e Ac);</li> <li>• Redução da infiltração de leucócitos (BL);</li> <li>• Reversão da hiperplasia dérmica (BL e Ac);</li> <li>• Redução de IL-33 e IL-10 no tecido da orelha (BL e Ac);</li> <li>• Redução de CCL2 e CCL5 no tecido da orelha (BL);</li> <li>• Redução de TNF-<math>\alpha</math>.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH da superfície da pele;</li> <li>• Perda de água da pele.</li> </ul> <p>*Apenas a administração antes da sensibilização (tratamento preventivo) demonstrou efeitos; a administração após o estabelecimento da doença não mostrou efeito significativo.</p> <p><b>Conclusão:</b> o tratamento profilático com B5<sup>1A</sup> diminuiu a inflamação do local.</p>

<p>Santos <i>et al.</i>, 2021</p>	<p><b>Modelo de alergia alimentar por sensibilização por ovoalbumina</b></p> <p><b>Animais:</b> Balb/c; fêmeas; 6-8 semanas;</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor perda de massa corporal;</li> <li>• Redução de IgE específico à OVA;</li> <li>• Menor produção de sIgA;</li> <li>• Menor permeabilidade intestinal;</li> <li>• Redução da diminuição das vilosidades no jejuno;</li> <li>• Redução da infiltração inflamatória e atividade das células de Paneth no jejuno;</li> <li>• Redução da produção exacerbada de muco no jejuno;</li> <li>• Redução do aumento de peroxidase eosinofílica (EPO) e MPO;</li> <li>• Reversão do aumento de CXCL1;</li> <li>• Redução do aumento de IL4, IL6, IL5, IL13, TNF;</li> <li>• Aumento de IL10.</li> </ul>
<p>Quintanilha <i>et al.</i>, 2022</p>	<p><b>Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano</b></p> <p>Balb/c; fêmea; 6-8 semanas;</p>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução da perda de massa corporal;</li> <li>• Melhora na consistência de fezes;</li> <li>• Redução da permeabilidade intestinal;</li> <li>• Diminuição de EPO e MPO;</li> <li>• Reversão da diminuição de sIgA causado por irinotecano; mas aumento nos grupos sem mucosite.</li> <li>• Reversão do aumento de enterobactérias na microbiota intestinal;</li> <li>• Proteção das vilosidades e criptas intestinais, redução de edema, menor formação de úlcera e menor infiltração por células polimorfonucleadas;</li> <li>• Menor produção de CXCL11;</li> <li>• Redução do aumento da taxa de expressão de <i>tnf</i>, <i>Il1β</i>, <i>Il6</i> e <i>il10</i>;</li> <li>• Redução da expressão de iNOS;</li> <li>• Reversão do aumento de MDA, produção de hiperóxido e atividade de SOD.</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Supressão da produção de leucócitos na medula óssea;</li> <li>• População de bactérias lácticas na microbiota intestinal.</li> </ul>

Almeida <i>et al.</i> , 2023	<b>Modelo de infecção por coronavírus usando MHV-3</b>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor perda de massa corporal;</li> <li>• Menor inflamação no tecido pulmonar;</li> <li>• Redução do dano cognitivo provocado pela infecção;</li> <li>• Aumento de infiltração inflamatória em animais sem infecção</li> </ul> <p><b>Sem observação de efeito da administração de B5<sup>1A</sup> sobre:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de infiltração de células no lavado broncoalveolar</li> </ul>
------------------------------	--	--

**Quadro 3 – Estudo clínico realizado com B5<sup>1A</sup>.**

Fonte	Experimento	Resultados
Guerra <i>et al.</i> , 2011	<b>Tratamento da constipação crônica funcional infantil</b>	<p><b>A administração de B5<sup>1A</sup> resultou em:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento na frequência de defecação;</li> <li>• Melhora na consistência das fezes;</li> <li>• Redução da dor abdominal e dor durante a defecação,</li> </ul>

## ANEXO A



UFMG

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:** 1/2024**Título do projeto:** Avaliação do potencial psicobiótico de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 51A em modelo experimental de depressão induzida por lipopolissacarídeo**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Flaviano dos Santos Martins**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Microbiologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado no dia 07/03/2024. Validade: 07/03/2024 à 06/03/2029 Aprovação será homologada na reunião de 11/03/2024.

Belo Horizonte, 07/03/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](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](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)